UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

“Revisão das espécies de *Macrobrachium*, Bate, 1868,
pertencentes ao complexo *M. olfersii* (Crustacea, Palaemonidae):
análises morfológicas e moleculares”

Natália Rossi

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da USP, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

“Revisão das espécies de *Macrobrachium*, Bate, 1868,
pertencentes ao complexo *M. olfersii* (Crustacea, Palaemonidae):
análises morfológicas e moleculares”

Natália Rossi
Orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
– USP, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Rossi, N.

Revisão das espécies de *Macrobrachium*, Bate, 1868, pertencentes ao complexo *M. olfersii* (Crustacea, Palaemonidae): análises morfológicas e moleculares.

--Ribeirão Preto, 2012.

135 f.

Tese (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Biologia Comparada) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1.Taxonomia 2.Filogenia 3.*Macrobrachium* 4. Genes mitocondriais 5. Genes nucleares

*Dedico ao Guilherme com carinho e
gratidão por todo amor, paciência e ajuda.*

Agradecimentos

Ao Profº Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto pela excelente oportunidade de realizar o mestrado no programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada e concluir este projeto de pesquisa sob sua supervisão, por disponibilizar parte do seu tempo precioso em ensinamentos, incentivos, ajudas, discussões e correções.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (Processo No 2009/12409-5), assim como aos projetos que proporcionaram todo o apoio financeiro e logístico, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento desta pesquisa junto ao Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC), concedidos ao e/ou coordenados por Prof. Dr. Fernando Mantelatto: FAPESP – Procs. No 1998/07454-5 e 2002/08178-9 (Projetos Individuais de Pesquisa), 2010/50188-8 (Projeto Temático Biota), 2009/54931-0 (Projeto Coleções Científicas); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Proc. No 315/2009 (Projeto Cooperação Internacional); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Procs. 472746/2004-9, 471794/2006-6, 473050/2007-2, 471011/2011-8 (Edital Universal, Auxílio Individual a Pesquisa), 491490/2004-6, 490122/2006-0, 490353/2007-0 (Projetos Cooperação Internacional); 301359/2007-5, 302748/2010-5 (Produtividade em Pesquisa).

À Universidade de São Paulo, pelo oferecimento de um ensino de qualidade gratuito. Ao suporte e assistência do Programa de Biologia Comparada da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Sou grata também aos professores e funcionários desta Faculdade.

Ao museu “Senckenberg Naturmuseum und Forschungsinstitut” por subsidiar parte da minha viagem à Frankfurt, Alemanha, para participar do XXI Simpósio de Senckenberg - Biologia de Decapoda de Água Doce. Ao Prof. Dr. Michael Türkay por permitir a concessão desse auxílio, pela orientação no pedido de empréstimo do material do “Museum of Natural History” da Genebra, Suíça, pela disponibilização de espaço e do uso dos equipamentos para análise do material e por toda atenção. Agradeço ao curador do “Museum of Natural History” pelo empréstimo e ao Prof^o Dr. Sérgio Bueno por transportar o material até Frankfurt. Também quero agradecer a Elena Thomsen por toda a ajuda durante o período do simpósio.

Ao Smithsonian Tropical Research Institution (STRI), pelo financiamento da inscrição, da minha estadia e alimentação durante o curso Taxonomia e Biologia de Decapoda, agradeço também pelo apoio nas coletas realizadas em Bocas del Toro, Panamá e a todos os integrantes do curso, aos professores Darryl Felder e Fernando Mantelatto e às amigas Tati e Kana pelos ensinamentos, auxílios e companhia agradável.

Sou muito grata ao meu orientador Fernando Mantelatto por sempre se lembrar do meu projeto e por nunca hesitar em coletar, contatar curadores para empréstimos ou doações de animais para esta pesquisa e por transportar muitas vezes esse material. Conseguindo, desse modo, os animais para minhas análises durante suas viagens ao EUA, México, Costa Rica, Panamá, Europa e diferentes locais do Brasil.

Gostaria de agradecer aos pesquisadores: Alexandre Almeida (UESC), Darryl Felder (ULLZ), Emerson Mossolin (UFG), Fernando Alvarez (CNCR), Fernando Mantelatto

(CCDB), Georgina B. Buckup (UFRS), Héctor Suárez (IVIC), Rólier L. Hernández e Ingo Werthmann (UCR), Izak Johannes Smit (RMNH), José Luis Villalobos (CNCR), Juan Bolaños (IVIC), Luis Ernesto Arruda Bezerra (UFPE), Marcos Tavares (MZUSP), Michael Türkay (SFNF), Peter Schwendinger (MNH) e Rodrigo Johnson (UFBA) que contribuíram para coleção de espécimes por meio de doações, disponibilização, empréstimos e transporte de animais.

Em especial, quero agradecer a todos os membros do Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC) do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP: Ana Francisca, Camila, Douglas, Edvanda, Fabrício, Gabriela, Isabela, Leonardo, Lucas, Mariana (Mari), Mariana (Kana), Natalia, Nicole, Patrício, Rafael, Raquel e Tatiana pela ajuda nas coletas, pelo transporte de animais, por grandes ensinamentos, correções e discussões durante o desenvolvimento do projeto. Agradeço muito ao Álvaro Costa por toda ajuda durante as coletas e pela organização do material para as viagens de campo, além de muitos outros auxílios no decorrer do projeto. Essas pessoas foram muito importantes para mim e tornaram grandes amigos. Agradeço pela companhia no dia a dia, nas viagens, passeios, churrascos, congressos, cursos, disciplinas e pelo incentivo e diversão em todos os momentos.

À Mari, Rafael, Leonardo e Ivana pelos conselhos, sugestões, respostas aos meus inúmeros questionamentos, e por todo o ensinamento tanto na execução de procedimentos técnicos, como nas obtenções e análises dos resultados de molecular. Agradeço muito à Mari por trazer material de Leiden, Holanda após sua viagem a Espanha e por me ensinar muito, como por exemplo, o uso dos programas de análise de genética

populacional. Aos meus amigos Vanda e Fabrício por coletarem e trazerem material da Bahia. Ao Rafa por me emprestar seu computador pessoal para conseguir executar as análises rapidamente e por suas importantes contribuições nas discussões e conclusões destas, além de fornecer diversos papers para minha revisão bibliográfica. À Camila e Vanda por me ajudarem a tomar o material. À Kana pelos conselhos para enviar as sequências ao GenBank. A Ana (Kelps) e o Patrício por me ajudarem usar o photoshop. E aos ex-membros do LBSC, Fernanda Vergamini e Emerson Mossolin, pelo empréstimo dos primeiros artigos e livros utilizados na elaboração do projeto, além de transmitirem valiosos conhecimentos.

Aos membros da banca do exame de qualificação Prof^o Dr. Ricardo Macedo Correa Castro e Prof^o Dr. Vagner Eustáquio Paiva Avelar, pelas discussões e sugestões. Assim como o assessor do relatório parcial e a assessoria ad hoc da FAPESP, pelas críticas, sugestões e correções.

Agradeço as “chicas super poderosas” Nicole e Isabela pela amizade sincera e por me ajudarem em todos os momentos. Aos meus amigos que sempre me deram apoio, mesmo que distantes: Paula, Duda, Josiane, Taise, Alinne, Pedro (Mygou), Tavani (Campi), Ana Carolina (Vovó), Natália (Lipo), Mariana (Catu), Juliana (Balão) Taís (Amarula), Catarina (Bava), Daniela (Ypi) e as novas manguacitchas.

As minhas irmãs e amigas Paula e Bia, ao Augusto, Felipe, meu amore Guilherme e meus maravilhosos pais Sandra e Santiago por me compreenderem, alegrarem, incentivarem, financiarem e por todo carinho e amor incondicional. Sem a presença deles a conclusão deste

projeto seria muito mais difícil, principalmente sem os intensos esforços da minha mãe para sempre me proporcionar o melhor e realizar meus sonhos.

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma e, infelizmente, não foram lembrados.

“Everything you can imagine is real”.

Pablo Picasso

[...]

Por seres tão inventivo
E pareceres contínuo
Tempo tempo tempo tempo
És um dos deuses mais lindos
Tempo tempo tempo tempo...

Que sejas ainda mais vivo
No som do meu estribilho
Tempo tempo tempo tempo
Ouve bem o que te digo
Tempo tempo tempo tempo...

Peço-te o prazer legítimo
E o movimento preciso
Tempo tempo tempo tempo
Quando o tempo for propício
Tempo tempo tempo tempo...

De modo que o meu espírito
Ganhe um brilho definido
Tempo tempo tempo tempo
E eu espalhe benefícios
Tempo tempo tempo tempo...

O que usaremos prá isso
Fica guardado em sigilo
Tempo tempo tempo tempo
Apenas contigo e comigo
Tempo tempo tempo tempo...

E quando eu tiver saído
Para fora do teu círculo
Tempo tempo tempo tempo
Não serei nem terás sido
Tempo tempo tempo tempo...

Oração ao tempo- Caetano Veloso

Resumo

RESUMO

Rossi, N. **Revisão das espécies de *Macrobrachium*, Bate, 1868, pertencentes ao complexo *M. olfersii* (Crustacea, Palaemonidae): análises morfológicas e moleculares.** 2012. 135f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Pesquisas envolvendo a sistemática e a taxonomia de camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 ainda são pouco elucidativas para alguns de seus membros. Este é o caso de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) que ocorre desde o sudeste dos Estados Unidos até o sul do Brasil e é comumente confundido com espécies que ocorrem preferencialmente na América Central (*M. faustinum* (de Saussure, 1857), *M. digueti* (Bouvier, 1895), *M. crenulatum* Holthuis, 1950, *M. hancocki* Holthuis, 1950 e *M. acanthochirus* Villalobos, 1967). Em 1969 estas espécies foram designadas por Villalobos como complexo *M. olfersii*, por compartilharem características morfológicas, principalmente quanto ao segundo par de pereópodos. Outras citações afirmaram esta forte afinidade, colocando algumas espécies em sinonímia. Diante deste problema, realizou-se uma revisão taxonômica e utilizaram-se dados moleculares para verificar a validade destas espécies e explorar as relações evolutivas entre elas. As hipóteses filogenéticas foram baseadas em sequências parciais dos genes 16S rDNA, COI mtDNA, H3 e 18S nDNA por meio de análise de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Embora detalhada a descrição das espécies, ressaltando as diferenças entre elas, as análises morfológicas não foram suficientes para inferir a filogenia desse grupo, devido a presença de caracteres plásticos e variáveis entre indivíduos da mesma espécie e outros conservados interespecificamente no gênero. Porém, todas as identidades foram suportadas com a análise molecular complementar baseada nos quatros marcadores, rejeitando a existência de sinonímias. Foi demonstrado através da análise baseada no gene 16S rDNA que estas espécies são evolutivamente relacionadas com *M. zariquelyi* Holthuis, 1949, da costa oeste da África, como compartilham características morfológicas, acredita-se que ela deva pertencer ao complexo *M. olfersii*, porém há a necessidade de verificar a taxonomia, analisar a morfologia e investigar outras sequências desta espécie. Os genes COI mtDNA e 16S rDNA apresentaram um amplo sinal filogenético permitindo uma boa resolução dos dendrogramas e H3 e 18S nDNA mostraram a recente divergência entre algumas espécies do grupo.

Palavras-chave: Taxonomia, Filogenia, *Macrobrachium*, Genes mitocondriais, Genes nucleares.

Abstract

ABSTRACT

Rossi, N. **Revision of species from *Macrobrachium*, Bate, 1868, that belonging *M. olfersii* complex (Crustacea, Palaemonidae): morphologic and molecular analysis.** 2012. 135f. Thesis (master science) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Studies on systematic and taxonomy of freshwater shrimp of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 are still unclear for some of its members, such as *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836). This species occurs from the southeastern United States to southern Brazil and is commonly mistaken with species that occur mainly in Central America (*M. faustinum* (de Saussure, 1857), *M. digueti* (Bouvier, 1895), *M. crenulatum* Holthuis, 1950, *M. hancocki* Holthuis, 1950 e *M. acanthochirus* Villalobos, 1967). In 1969 these species have been designated as a species-complex by Villalobos, because they share morphological characteristics, particularly in the second pair of pereopod. This strong affinity and proposed some synonyms species is pointed by other authors. Faced with this problem, the validity of these species and the evolutionary relationships between them were verified by a wide taxonomic and molecular data. The phylogenetic hypotheses were based on partial sequences of 16S rDNA, COI mtDNA, 18S and H3 nDNA using analysis of Maximum Likelihood and Inference Bayesian. The diagnoses of the species were detailed, highlighting the differences between them. Nevertheless the morphological analysis were not enough to infer the phylogeny of this group because of the presence of plastic and variables characters among individuals of the same species and other preserved characters among different species of the genus. However, all identities were supported with additional molecular analysis based on four markers, rejecting the existence of synonymy. These species are evolutionarily related to *M. zariquelyi* Holthuis, 1949, from the west coast of Africa and share morphological character. The latter species could also belong to the *M. olfersii* complex because has phylogenetic closeness, but before this affirmation it may be verified by morphological and molecular analysis. The mitochondrial genes (COI and 16S) showed a broad phylogenetic signal allowing a good resolution of the dendrograms. The nuclear genes (H3 and 18S) showed the recent divergence between some members of the group.

Keywords: Taxonomy, Phylogeny, *Macrobrachium*, Mitochondrial genes, Nuclear genes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Distribuição geográfica das espécies pertencentes ao complexo *Macrobrachium olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*). 32
- Figura 2: Esquema das estruturas mensuradas para análise da variabilidade morfológica latitudinal de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836). 36
- Figura 4: Representação do leque caudal e do sexto segmento abominal de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836), em vista ventral, com destaque nas variações da carena pré-anal. 48
- Figura 3: Representação das estruturas de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836). Caracteres com variação intraespecíficas: A) Vista lateral do rostro com destaque nas variações da margem pós-orbital; B) Quarto esternito torácico T4, com destaque nas variações do processo mediano; C) Epístoma, com destaque na posição das carenas. 48
- Figura 5: Representação do quelípodo (segundo pereópodo) maior de espécies do gênero *Macrobrachium*, revelando as principais estruturas de identificação das espécies pertencentes ao complexo *M. olfersii*. 50
- Figura 6: *Macrobrachium acanthochirus* Villalobos, 1967, macho, vista lateral, CNCR-UNAM 10114 54
- Figura 7: *Macrobrachium crenulatum* Holthuis, 1950, macho, vista lateral, UCR 303 59
- Figura 8: *Macrobrachium digueti* (Bouvier, 1895), macho, vista lateral, CNCR-UNAM 24811 64
- Figura 9: *Macrobrachium faustinum* (De Saussure, 1857), macho, vista lateral, ARCMD 1248 69
- Figura 10: *Macrobrachium hancocki* Holthuis, 1950, macho, vista lateral, CCDB 3756 75
- Figura 11: *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836), macho, vista lateral CCDB 3754 85
- Figura 12: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium digueti* (Bouvier, 1895) 86
- Figura 13: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium crenulatum* Holthuis, 1950 87

- Figura 14: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium faustinum* (De Saussure, 1857) 87
- Figura 15: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) 87
- Figura 16: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium digueti* (Bouvier, 1895) 88
- Figura 17: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium acanthochirus* Villalobos, 1967 88
- Figura 18: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium crenulatum* Holthuis, 1950 88
- Figura 19: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium hancocki* Holthuis, 1950 89
- Figura 20: Perfil morfométrico de populações de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) relacionado com a latitude 91
- Figura 21: Representação das variações do segundo pereópodo de *Macrobrachium olfersii*, (Wiegmann, 1836) 93
- Figura 22: Foto de uma eletroforese em gel de agarose 1% mostrando fragmentos amplificados de 16S rDNA mais de 500 pares de bases (pb) de acordo com o marcador de peso molecular de 1Kb de espécies pertencentes ao complexo *M. olfersii* 94
- Figura 23: Cromatograma do sequenciamento insatisfatório da fita COIf do gene COI mtDNA de *Macrobrachium olfersii* 95
- Figura 24: Cromatograma do sequenciamento bem sucedido da fita L2 do gene 16S rDNA de *Macrobrachium hancocki* 96
- Figura 25: Visualização parcial do alinhamento das sequências do gene 16S das espécies *Macrobrachium olfersii*, *M. crenulatum*, *M. digueti* e *M. faustinum* no programa computacional BioEdit 97
- Figura 26: Dendrograma das espécies do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*) baseado em Inferência Bayesiana obtido pela análise de sequências parciais do gene 16S nDNA 106
- Figura 27: Dendrograma das espécies do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M.*

olfersii) baseado em Inferência Bayesiana obtido pela análise de sequências parciais do gene COI mtDNA 107

Figura 28: Dendrograma das espécies do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*) baseado em Inferência Bayesiana obtido pela análise de sequências parciais do gene 18S nDNA 109

Figura 29: Dendrograma das espécies do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*) baseado em Inferência Bayesiana obtido pela análise de sequências parciais do gene H3 nDNA 112

Figura 30: Rede de Haplótipos baseada em análises de Median-Joining, com a indicação da distribuição de cada de cada haplótipo encontrado (H) em *Macrobrachium olfersii* de diferentes populações. A identificação de cada haplótipo está abaixo de cada círculo. Cada pequeno traço representa um passo mutacional. As linhas entre os círculos indicam uma substituição simples entre diferentes haplótipos (o pequeno símbolo representa a perda de um haplótipo, inferidos por duas sequências que diferem em duas substituições), e não são proporcionais a distância genética entre haplótipos. O padrão das tramas revela a origem e a frequência de haplótipos compartilhados, indicado na legenda a direita 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies do complexo <i>Macrobrachium olfersii</i> : <i>M. acanthochirus</i> , <i>M. crenulatum</i> , <i>M. digueti</i> , <i>M. faustinum</i> , <i>M. hancocki</i> e <i>M. olfersii</i> , e outras espécies que foram utilizadas nas análises moleculares: <i>M. americanum</i> , <i>M. lar</i> , <i>M. zariqueyi</i> e <i>C. caementarius</i>	41
Tabela 2. Média dos valores mensurados e desvio padrão para comprimento da carapaça CC, largura da pleura LP, comprimento do quelípodo maior CQ e do própodo quelar CP de machos e fêmeas de diferentes populações (Local.) de <i>Macrobrachium olfersii</i> de cada latitude geográfica (Lat.) analisada.....	90
Tabela 3: Divergência genética intra (negrito) e interespecífica encontrada para o gene COI mtDNA nos exemplares do complexo <i>M. olfersii</i> (<i>M. acanthochirus</i> , <i>M. crenulatum</i> , <i>M. digueti</i> , <i>M. faustinum</i> , <i>M. hancocki</i> e <i>M. olfersii</i>).....	99
Tabela 4: Divergência genética intra (negrito) e interespecífica encontrada para o gene 16S rDNA nos exemplares do complexo <i>M. olfersii</i> (<i>M. acanthochirus</i> , <i>M. crenulatum</i> , <i>M. digueti</i> , <i>M. faustinum</i> , <i>M. hancocki</i> e <i>M. olfersii</i>).....	101
Tabela 5: Divergência genética intra (negrito) e interespecífica encontrada para o gene 18S nDNA nos exemplares do complexo <i>M. olfersii</i> (<i>M. acanthochirus</i> , <i>M. crenulatum</i> , <i>M. digueti</i> , <i>M. faustinum</i> , <i>M. hancocki</i> e <i>M. olfersii</i>).....	102
Tabela 6: Divergência genética intra (negrito) e interespecífica encontrada para o gene H3 nDNA nos exemplares do complexo <i>M. olfersii</i> (<i>M. acanthochirus</i> , <i>M. crenulatum</i> , <i>M. digueti</i> , <i>M. faustinum</i> , <i>M. hancocki</i> e <i>M. olfersii</i>).....	103
Tabela 7. Distribuição dos haplótipos encontrados em <i>Macrobrachium olfersii</i> de diferentes localidades.....	114
Tabela 8. Resultados das análises de variância molecular (AMOVA) realizadas com espécimes de <i>Macrobrachium olfersii</i> provenientes de diversas populações.....	113

SUMÁRIO

1 Introdução	21
2 Objetivos	26
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 Material & Métodos	28
3.1 Coleta dos exemplares	29
3.2 Obtenção e análise dos dados morfológicos	33
3.3 Obtenção e análise dos dados moleculares	37
4 Resultados & Discussão	46
4.1 Análise morfológica	47
4.2.1 Revisão taxonômica	50
<i>Macrobrachium acanthochirus</i> Villalobos, 1967	50
<i>Macrobrachium crenulatum</i> Holthuis, 1950	55
<i>Macrobrachium digueti</i> (Bouvier, 1895)	60
<i>Macrobrachium faustinum</i> (de Saussure, 1857)	64
<i>Macrobrachium hancocki</i> Holthuis, 1950	70
<i>Macrobrachium olfersii</i> (Wiegmann, 1836)	75
4.2.2 Chave pictórica para as machos adultos das espécies do complexo <i>Macrobrachium olfersii</i>	86
4.2.3 Análise da variabilidade morfométrica em espécimes de <i>M. olfersii</i>	89
4.3 Análise dos dados moleculares	93
4.3.1 Extração, Amplificação e Sequenciamento	93
4.3.2 Distância genética e análise filogenética	97
4.3.3 Estrutura genética da população de <i>Macrobrachium olfersii</i>	113
5 Conclusão	119
6 Referências	123

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

O gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 pertencente à família Palaemonidae Rafinesque, 1815, é representado por um grupo muito diversificado de espécies de camarões com amplo sucesso na colonização de ambientes estuarinos e de água doce em todo o mundo. Muitas espécies necessitam de ambos ambientes para completar seu ciclo de vida (Holthuis, 1952; Dugger & Dobkin, 1975; Barros, 1995; Pereira, 1997; Bowles *et al.*, 2000; Pereira & Garcia, 2002; Murphy & Austin, 2004; Valencia & Campos, 2007). A transição e a adaptação a ambientes distintos durante sua história evolutiva e a ocorrência em vastas áreas de distribuição podem ser responsáveis por sua complexa biologia e ecologia (Holthuis, 1952; Camacho *et al.*, 1997; Pereira, 1997; Porto, 2004; García-Dávila *et al.*, 2005).

De acordo com De Grave e Fransen (2011) são reconhecidas 243 espécies de camarões do gênero *Macrobrachium*, porém em uma revisão das espécies que ocorrem no Brasil, evidenciaram-se alguns casos de sinonímia, em particular para *M. birai* Lobão, Melo & Fernandes, 1986 e *M. holthuisi* Genofre & Lobão, 1978 que foram consideradas sinônimos de *M. olfersii* (Wiegmann, 1836) (Pileggi & Mantelatto, 2010). As principais características desse gênero são à presença dos primeiros dois pares de pereópodos quelados, sendo o segundo maior que o primeiro, o carpo não subdividido e o rostro com dentes (Williams, 1984). Os membros desse grupo se distinguem dos outros indivíduos da família Palaemonidae pela presença de

mandíbula com palpo tri-articulado, espinho hepático e ausência de espinho branquiostegal (Holthuis, 1952; Camacho *et al.*, 1997; Bowles *et al.*, 2000).

Devido à sua relativa abundância e grande importância econômica, pelo alto potencial na aquicultura e utilização na pesca artesanal e comercial (Sawaya, 1946; Bowles *et al.*, 2000; Murphy & Austin, 2005; Valenti & Tidwell, 2006; Valencia & Campos, 2007), algumas espécies do gênero têm sido objeto de pesquisas que abrangem estudos sobre fisiologia e biologia (McNamara *et al.*, 1985; McNamara *et al.*, 1990; Müller & Prazeres, 1992; Lima *et al.*, 1997; Müller *et al.* 1999), reprodução (Ammar *et al.*, 2001; Mossolin & Bueno, 2002), desenvolvimento morfológico e larval (Dugger & Dobkin, 1975; Lima *et al.*, 1997; Gamba, 1982; Pereira & Garcia, 2002; Mossolin & Bueno, 2003; Müller *et al.*, 2003; Anger & Hayd, 2009; Pantaleão *et al.*, 2011), comportamento, biologia de populações e ecologia (Barki *et al.*, 1991; 1992; 1997; JaliHall *et al.*, 1993; Ammar *et al.*, 2001; Bauer & Delahoussaye, 2008; Chen *et al.*, 2009).

Também foram realizados diversos estudos sobre a taxonomia e a sistemática de *Macrobrachium*, destacando-se entre eles: Ortmann (1897), Hedgpeth (1949), Holthuis (1952), Holthuis & Provenzano (1970), Gomes Corrêa (1977), Pereira (1997), Bowles *et al.* (2000), Pereira & Garcia (2002), Murphy & Austin (2002, 2004, 2005), Short (2004), Valencia & Campos (2007), Page *et al.* (2008), Bracken *et al.* (2009), Pileggi (2009), Wowor *et al.* (2009), Pileggi & Mantelatto (2010) e Vergamini *et al.* (2011). Apesar deste elevado número de

estudos, erros de identificação e possíveis sinonímias, ainda permanecerem na taxonomia do grupo, muitas vezes decorrente da presença de espécies gêmeas (Holthuis, 1952) e complexos de espécies crípticas (Villalobos, 1969; Cai *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2004; Short 2004).

Uma das incertezas que norteiam o gênero refere-se à forte semelhança e o questionamento da separação de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836), que ocorre desde o sudeste dos Estados Unidos até o sul do Brasil, das espécies que ocorrem preferencialmente na América Central, algumas estendem-se ao sul e sudeste da América do Norte e ao norte da América do Sul como *M. faustinum* (de Saussure, 1857), *M. digueti* (Bouvier, 1895), *M. crenulatum* Holthuis, 1950, *M. hancocki* Holthuis, 1950 e *M. acanthochirus* Villalobos, 1967.

Estas espécies foram designadas por Villalobos (1969) como complexo *M. olfersii*, por compartilharem características semelhantes, principalmente quanto ao segundo par de pereópodos. *Macrobrachium olfersii* foi considerada a espécie ancestral do complexo, devido a sua ampla distribuição e abundância (Villalobos, 1969).

Uma das principais características compartilhadas é a presença de heteroquelia, *i.e.*, quelípodos (segundo pereópodo) desiguais em tamanho e forma. No pereópodo menor os dedos são curvados e formam um grande hiato entre eles, que é completamente preenchido por cerdas, existentes nas margens cortantes. O

pereópodo maior tem a quela (dedos e própodo) robusta, e há fileiras de fortes espinhos nas margens inferior e superior.

As características que diferenciam as espécies do complexo *M. olfersii* de acordo com Holthuis (1952) e Villalobos (1969) são: distribuição de dentes no rostro e as proporções entre carpo e mero do segundo par de pereópodo, no maior pereópodo há diferenças na dentição da margem cortante dos dedos e no formato da margem inferior da palma. Essas pequenas variações podem ser muitas vezes interpretadas como plasticidade fenotípica, ou seja, características adquiridas por populações de uma mesma espécie, devido a sua vasta dispersão em ambientes diferentes que as distinguem do padrão (Sawaya, 1946; Villalobos, 1969).

Além de Villalobos (1969), outros estudos também mencionaram a forte afinidade morfológica entre os integrantes deste grupo (Holthuis, 1952; Holthuis & Provenzano, 1970; Bowles *et al.*, 2000; Valencia & Campos, 2007) e alguns consideraram a possibilidade de *M. faustinum* ser um sinônimo de *M. olfersii* (Rathbun, 1900; Sawaya, 1946); e *M. acanthochirus* constituir um sinônimo de *M. digueti* (Hernandez *et al.*, 2007).

Como observado na literatura (Holthuis, 1952; Murphy *et al.*, 2004; Valencia & Campos, 2007; Pileggi & Mantelatto, 2010), há uma grande dificuldade para separar algumas espécies de camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* utilizando-se apenas de dados morfológicos. Tal condição deve-se ao fato de que os caracteres tradicionalmente utilizados são geralmente variáveis entre os indivíduos

da mesma espécie e altamente conservados entre as espécies do gênero (Pileggi & Mantelatto, 2010). Portanto, faz-se necessário ampliar o número de caracteres utilizados e combinar tais fatores com outras ferramentas que podem auxiliar a classificação, como por exemplo, a estrutura populacional, ecologia e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos desses animais.

Uma dessas ferramentas é a biologia molecular aplicada às relações filogenéticas, que reúne entre suas vantagens a presença de caracteres universais e conservativos (Murphy & Austin, 2005; Page *et al.*, 2008). Em testes de hipóteses filogenéticas tais parâmetros revelaram ser eficientes em elucidar muitos aspectos sobre a sistemática de *Macrobrachium* (Pereira *et al.*, 2002; Murphy & Austin, 2002; 2004; 2005; De Bruyn *et al.*, 2004; Pileggi & Mantelatto, 2010; Vergamini *et al.*, 2011) e de outros crustáceos decápodes, como lagostins, caranguejos, ermitões e outros grupos de camarões (Crandall *et al.*, 2000; Mantelatto *et al.*, 2006, 2007, 2009; Baker *et al.*, 2008; Crandall & Buhay, 2008; Page *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2009; Rintelen *et al.*, 2012).

Dessa forma, a realização de uma revisão taxonômica aliada às análises moleculares com diferentes marcadores, além de uma investigação da variação morfométrica e genética de *M. olfersii* poderá contribuir de forma consistente com a resolução do status taxonômico das espécies do complexo *M. olfersii*, o qual, frequentemente, vem sendo questionado quanto à sua existência.

Objetivos

2 – OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Este estudo teve como objetivo revisar as espécies de camarão de água doce pertencentes ao complexo *M. olfersii*, utilizando-se análises morfológicas aliadas às análises moleculares.

2.2 *Objetivos específicos*

2.2.1 Realizar uma revisão taxonômica de todas as espécies pertencentes ao complexo *M. olfersii* por meio de análise morfológica focado na obtenção de caracteres informativos;

2.2.2 Realizar uma análise morfométrica entre espécimes de diferentes populações de *M. olfersii* ao longo do gradiente latitudinal de ocorrência;

2.2.3 Realizar análises de cluster baseadas nas divergências genéticas (mitocondriais: 16S, COI e nuclear: H3 e 18S) entre as espécies do complexo *M. olfersii* e compará-las com outras espécies do gênero *Macrobrachium*;

2.2.4 Avaliar o status das espécies pertencentes ao complexo *M. olfersii* por meio da análise conjunta dos dados morfológicos e moleculares;

2.2.5 Estudar as relações evolutivas entre as espécies do complexo *M. olfersii*, por meio dos dados moleculares;

2.2.6 Analisar a estrutura genética populacional de diferentes populações de *M. olfersii*.

Material & Métodos

3 – MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Coleta dos exemplares

Buscou-se a obtenção de exemplares pertencentes ao complexo *M. olfersii* ao longo da distribuição geográfica de cada espécie (Figura 1). Grande parte dos lotes examinados, oriundos de diversas localidades da região neotropical estão depositados na Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia, Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CCDB LBSC/FFCLRP/USP). Outros espécimes foram obtidos por empréstimos, doações ou visitas in loco das coleções carcinológicas das seguintes instituições: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP); Museu de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA); Colección Nacional de Crustáceos, Instituto de Biología (CNCR) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela (IVIC); Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica (MZUCR); Zoological Collections da University of Louisiana-Lafayette, Estados Unidos (ULLZ); Museum of Natural History, Genebra, Suíça (MNH); The Netherlands Centre of Biodiversity Naturalis, Leiden, Holanda (RMNH) e Museum für Naturkunde, Berlim, Alemanha (MFN).

Foi incluído na análise molecular desse estudo representante de *Macrobrachium americanum* Bate, 1868, *Macrobrachium lar* (Fabricius, 1798),

Macrobrachium zariqueyi Holthuis, 1949 e *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) por estarem evolutivamente relacionados a algumas espécies do complexo *M. offersii* em análises filogenéticas prévias (Murphy & Austin, 2005; Liu *et al.*, 2007; Bracken *et al.*, 2009a e b, 2010; Pileggi & Mantelatto, 2010).

Macrobrachium americanum tem mesmo estilo de vida (desenvolvimento larval estendido), ocorre em simpatria com as espécies estudadas da costa Pacífica das Américas (Holthuis, 1952; Anderson & Filingame, 1980; Bowles *et al.*, 2000; Melo, 2003). Ela apresenta caracteres ímpares ao do grupo de estudo e é a espécie-tipo do gênero. *Macrobrachium lar* é amplamente distribuída no Indo-Pacífico, apresenta desenvolvimento larval estendido. Outro exemplar escolhido como grupo externo para as análises filogenéticas baseadas nos dados moleculares foi *Cryphiops caementarius*, por seu relacionamento com *Macrobrachium* (Bracken *et al.*, 2009a e b, 2010; Pileggi & Mantelatto, 2010: Fig.3, Grupo III).

Macrobrachium zariqueyi ocorre na costa oeste da África apresenta desenvolvimento larval estendido e ocorre no Indo-Pacífico. Apresenta outras características compartilhadas ao complexo *M. offersii* (Holthuis, 1949). Além de estar evolutivamente relacionada a este grupo em análises filogenéticas prévias (Murphy & Austin, 2005: Fig. 3, Sam, WAF; Liu *et al.*, 2007: Fig. 2, S/C AM).

Coletas foram realizadas visando à obtenção de exemplares frescos para as análises morfológicas e moleculares. As coletas foram suportadas pela Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico (nº 11777-1 MMA/IBAMA/SISBIO de

16/09/07 concedida para Fernando Luis Medina Mantelatto), válida para todo território nacional. No Brasil, foram realizadas na cidade de Natal (RN), em Ilhéus (BA), e em Ubatuba, Santos, São Vicente, Bertioga, Pariquera-açu, Cananéia e Iguape (SP). Também foram coletados animais frescos em Bocas del Toro (Panamá) e em várias localidades da Costa Rica, suportadas por licenças locais obtidas por pesquisadores locais e pelo Fernando Luis Medina Mantelatto. Os animais foram capturados com peneiras, de 70 cm de diâmetro com malha de sete mm, com movimentos ascendentes junto à vegetação marginal e fundos rochosos. Foram utilizadas também armadilhas feitas com potes plásticos (com 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 25 cm de altura) e iscadas com ração para gatos. Os animais capturados foram triados no local, preservados diretamente em álcool etílico 75-90% e incorporados à CCDB/ FFCLRP/USP.

Figura 1: Distribuição geográfica das espécies pertencentes ao complexo *Macrobrachium olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*).

3.2 Obtenção e análise dos dados morfológicos

A revisão taxonômica do grupo iniciou com a identificação dos exemplares, realizada com base nas características morfológicas diagnósticas das espécies previamente descritas na literatura (Holthuis, 1952; Villalobos, 1969; Gomes Corrêa, 1977; Melo, 2003; Pileggi, 2009). Foi possível o exame do material-tipo de, *M. acanthochirus*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *Macrobrachium olfersii*.

O holótipo (número de catálogo CNCR: 52461) e parátipos de *M. acanthochirus* são originários do México e foram depositados na Coleção Carcinológica de la Sección de Hidrobiología del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Villalobos, 1967), os quais encontram-se em péssimo estado de conservação, porém foi possível analisar o quelípodo maior de dois exemplares e comprovar as principais características desta espécie – presença de uma região submarginal proximal da superfície externa do própodo com pubescência e nua de espinhos e espínulos.

O holótipo de *M. crenulatum* é originário do Panamá, encontra-se preservado na coleção do United States National Museum (Holthuis, 1950a). O holótipo de *M. digueti* é originário do México (Bouvier, 1895) e encontra-se no museum d'Histoire Naturelle de Paris, enquanto que sintipo está no United States National Museum (número de catálogo 79940) (Holthuis, 1952). O material-tipo de *M. faustinum* é originário do Haiti (de Saussure, 1857) e encontra-se preservado seco no Musée d'Histoire Naturelle de Genebra, Suíça (Holthuis, 1952), porém em

contato com curadores desse museu foi possível descobrir a existência de sintipos preservados secos e dois exemplares identificados como sintipos, os quais são originários de Cuba e foram determinados por Holthuis em julho de 1971.

O material-tipo de *M. hancocki* é originário da Costa Rica, encontra-se preservado na coleção do United States National Museum (Holthuis, 1950a), no Netherlands Centre for Biodiversity Naturalis, Leiden, Holanda está depositado três exemplares identificados como parátipo, porém são originários do Panamá (RMNH 8810). O holótipo de *M. offersii* é originário da costa brasileira (Wiegmann, 1836) e encontra-se preservado no Zoological Museum de Berlim (número de catálogo MFN 1916).

Exemplares de diferentes populações de *M. offersii* foram obtidos em diversas regiões da área de ocorrência da costa brasileira (Rio Grande do Norte, Bahia, Alagoas, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina), sendo obtidos exemplares da localidade-tipo (costa brasileira) e em outros países das Américas (México, Costa Rica, Panamá, e Venezuela).

Os dados morfológicos foram obtidos a partir do estudo da morfologia externa dos indivíduos adultos de espécimes coletados e depositados nas coleções carcinológicas. Exemplares juvenis também foram analisados para verificar a variabilidade dos caracteres ao longo da ontogenia. Os caracteres selecionados foram os de maior variabilidade no complexo *M. offersii*, como o rosto e os pereópodos, para a análise comparativa das espécies e orientação da revisão

taxonômica. Além destes, foram pesquisados novos parâmetros com o intuito de ampliar a base de dados morfológicos para as espécies do grupo, seguindo os propostos por Short (2004).

As análises morfológicas foram, na sua maioria, realizadas no Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos da FFCLRP/USP sob estereomicroscópio acoplado com câmara clara ZEISS® (Stemi SV 6) e/ou Leica (DM 1000). Os animais foram desenhados e posteriormente as figuras corrigidas no programa computacional Adobe Photoshop 7®, ou através do software Adobe Illustrator 10®. Em cada exemplar foram tomadas as seguintes medidas: comprimento da carapaça – CC (da margem posterior da órbita à extremidade posterior da carapaça); comprimento total – CT (da extremidade anterior do rostro até a porção posterior do telso); comprimento do rostro – CR (da extremidade anterior ao último dente), comprimento e largura do escafoцерito, comprimento e largura da pleura do segundo segmento abdominal; comprimento e largura dos artículos (dátilo, própodo, carpo, mero e ísquio) de todos os pereópodos; comprimento do 5º e 6º segmento abdominal; comprimento do telso e largura das margens distal e proximal. Para a obtenção das medidas utilizou-se paquímetro digital.

Considerando-se a ampla distribuição bem como a grande variabilidade morfológica descrita para *M. offersii*, realizou-se também um estudo morfométrico abrangendo distintas populações distribuídas ao longo da costa brasileira, a fim de averiguar a relação da variabilidade morfológica populacional com a variação da

latitude. Foram analisados 150 indivíduos coletados em diferentes períodos nos estados do Rio Grande do Norte (n=7), Bahia (n=14), Espírito Santo (n=9), Rio de Janeiro (n=40), São Paulo (n=55), Paraná (n=6) e Santa Catarina (n=19). Para essa análise utilizou-se as medidas: comprimento da carapaça - CC, largura da pleura - LP, comprimento do quelípodo maior - CQ, e do própodo quelar - CP (Figura 2). A média destas medidas de cada latitude foi comparada entre exemplares do mesmo sexo ao longo do gradiente latitudinal.

Figura 2: Esquema das estruturas mensuradas para análise da variabilidade morfológica latitudinal de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) CT: comprimento total; CC: comprimento da carapaça; CQ: comprimento do quelípodo; CP: comprimento própodo quelar; LP: largura da pleura. Modificado de Williams (1984).

3.3 Obtenção e análise dos dados moleculares

A partir dos exemplares obtidos ou coletados, o espécime selecionado de cada lote para a obtenção do DNA genômico foi, preferencialmente, o de maior tamanho, macho e adulto, cujas características morfológicas não levantaram dúvidas quanto à identificação. Para a análise da estruturação genética utilizou-se, em geral, três indivíduos ou mais de cada lote. Os procedimentos para extração do DNA e amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction; Saiki *et al.*, 1998) seguiram os protocolos de Mantelatto *et al.* (2007; 2009a, b) com modificações em Pileggi & Mantelatto (2010). O DNA genômico total foi obtido a partir dos tecidos musculares abdominais ou dos quelípodos. O tecido foi incubado por 24h em 600µl de tampão de lise e adicionado proteinase K a 55 °C; as proteínas foram separadas pela adição de 200 µl de acetato de amônio 7,5M anteriormente à centrifugação. O DNA foi precipitado pela adição de 600 µl de isopropanol resfriado e subsequentemente por centrifugação; o pellet resultante foi lavado com etanol 70%, secado e ressuspendido em 20µl de tampão TE.

Espécimes que apresentaram a possibilidade do processo de fixação ter sido em formaldeído passaram por uma lavagem com tampão GTE por 72h antes de iniciar o procedimento de extração de DNA (Pileggi, 2009). A concentração do DNA extraído foi avaliada por observação em eletroforese com gel de agarose 1% e

fotografada com câmera digital C-7070 da Olympus® em um transiluminador UV Transilluminator M20 da UVP®.

Quatro genes foram sequenciados, sendo dois mitocondriais (Citocromo Oxidase I - COI mtDNA e 16S rDNA) e dois nucleares (Histona - H3 nDNA e 18S nDNA). A amplificação realizada utilizou primers específicos previamente testados (Porter *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2008). Os seguintes conjuntos de primers foram usados: H2 (AGA TAG AAA CCA ACC TGG) e L2 (TGC CTG TTT ATC AAA AAC AT) (Crandall & Fitzpatrick Jr., 1996) para o gene 16S rDNA; COIa (AGT ATA AGC GTC TGG GTA GTC) e COIf (CCT GCA GGA GGA GGA GAC CC) para o gene COI mtDNA (Palumbi *et al.*, 1991); 18Sai (CCT GAG AAA CGG CTA CCA CAT C) e 18Sb3.0 (GAC GGT CCA ACA ATT TCA CC) (Whiting *et al.*, 1997; Whiting, 2002) para o gene 18S nDNA; e H3ar (ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC) e H3af (ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC) (Colgar *et al.*, 1998) para o gene H3 nDNA.

Os produtos do PCR foram obtidos em uma reação de volume total de 25µl contendo 6,5µl de H₂O destilada, 3µl de 10X PCR buffer, 3µl de MgCl₂ 25mM, 5µl de betaína (5M), 4µl de DNTPs 10mM, 1µl de cada primer 1M, 0,5µl de *Thermus aquaticus* polimerase (5 U/µl) e 1µl do DNA previamente extraído. A amplificação do DNA pela técnica de PCR foi realizada no PxE 0.2 Thermal Cycler da Thermo® com os seguintes ciclos termais: desnaturação inicial por 5 min. (98°C); anelamento por 40 ciclos (45" a 98°C, 45" a 45 – 52°C e 1' a 72°C); extensão final por 5 min. a 72°C.

Os resultados dos PCRs também foram observados em eletroforese com gel de agarose 1%.

Nos casos de amplificação negativa, os PCRs foram refeitos com uma mudança na temperatura de anelamento. Para o gene 16S utilizou-se temperatura 46°C, para o COI 52°C, para o H3 49°C e para 18S 52 – 54°C. Alguns exemplares tiveram sua fixação em formaldeído e outros permaneceram conservados por longo período no fixador, fatores que provavelmente impediram a amplificação do DNA das amostras destes animais, uma vez que, nessas condições o DNA pode ser degradado. Embora, tenha sido realizado um procedimento de retirada do fixador com o tampão GTE a obtenção de uma amostra de DNA íntegra não foi possível.

Os produtos do PCR amplificados com sucesso foram purificados com a utilização do kit de purificação Sureclean®. Utilizou-se, para a reação de sequenciamento, um volume total de 20 µl contendo H₂O destilada e deionizada, Big Dye® Terminator Sequencing Buffer (2,5x), Big Dye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), primer (10 µM) e 2 µl do produto do PCR previamente purificado. O PCR de sequenciamento foi realizado no PxE 0.2 Thermal Cycler da Thermo® com o seguinte ciclo termal: desnaturação inicial por 2 min a 96°C; anelamento por 35 ciclos (45s a 96°C; 30s a 50°C e 4 min a 60°C).

O produto das reações de PCR de sequenciamento foi precipitado pela adição de 80 µl de isopropanol 75%, seguido de leve agitação no vórtex e incubação por 15 min a temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi

descartado e, em seguida, o precipitado secou a temperatura ambiente. O precipitado foi lavado com 200 µl de etanol 70% e a seguir, centrifugado novamente.

O sequenciamento das amostras foi realizado em um sequenciador automatizado ABI Prism 3100 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems automated sequencer) no Departamento de Biologia da FFCLRP/USP e no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV) – UNESP, por meio do kit de reação ABI Big Dye® Terminator Mix (PE Biosystems). As sequências obtidas foram reconciliadas e confirmadas pelo sequenciamento de ambas as fitas (senso e anti-senso) utilizando-se do software BIOEDIT versão 7.0.9 (Hall, 1999).

Os testemunhos genéticos (vouchers), dos quais foram obtidas as amostras de tecido para as análises, foram depositados na CCDB/FFCLRP/USP ou devolvidos com uma sinalização para as devidas coleções (Tabela 1). Foi incluído nesse estudo como grupo externo um exemplar da espécie *Macrobrachium americanum* Bate, 1868. Este exemplar seguiu os mesmos procedimentos para obtenção e análise dos dados moleculares que as espécies do complexo *M. olfersii*. Sequências de *Macrobrachium lar* (Fabricius, 1798) e *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) foram obtidas do GenBank e adicionadas às análises filogenéticas, assim como uma sequência parcial de 16S de *Macrobrachium zariquelyi* Holthuis, 1949 (Tabela 1).

Tabela 1. Continua. Espécies do complexo *Macrobrachium olfersii*: *M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*, e outras espécies que foram utilizadas nas análises moleculares: *M. americanum*, *M. lar*, *M. zariqueyi* e *C. caementarius*. Estas se encontram descritas com suas respectivas localidades e abreviações (Abrev.), voucher (coleções pertencentes e números de catálogo), identificação da(s) sequência(s) obtida(s) da extração de DNA e o código de acesso do GenBank. As sequências retiradas do GenBank, encontram-se sinalizadas (*).

Espécies	Localidade	Abrev.	Voucher	Sequências/ Acesso GenBank			
				16S	COI	H3	18S
<i>Macrobrachium acanthochirus</i>	México (Atlântico)	MX-AT	-	(*)AY377837			
<i>Macrobrachium acanthochirus</i>	México (Pacífico)	MX-PA	UNAM 24835	JQ805798	JQ805897	JQ805860	JQ805842
<i>Macrobrachium acanthochirus</i>	México (Pacífico)	MX-PA	UNAM s / nº	JQ805799	JQ805898		JQ805848
<i>Macrobrachium americanum</i>	Costa Rica (Pacífico)	CR-PA	CCDB 2883	JQ805797	JQ805899	JQ805861	JQ805843
<i>Macrobrachium crenulatum</i>	Costa Rica (Atlântico)	CR-AT	CCDB 2873	JQ805802 JQ805804	JQ805900 JQ805901	JQ805864 JQ805866	JQ805846
<i>Macrobrachium crenulatum</i>	Costa Rica (Atlântico)	CR-AT	CCDB 3174		JQ805902	JQ805867	
<i>Macrobrachium crenulatum</i>	Ausente	-	MNHN				(*)GU205006
<i>Macrobrachium crenulatum</i>	Ausente	-	MNHN				(*)GU205007
<i>Macrobrachium crenulatum</i>	Venezuela (Isla Margarita)	VZ-IM	CCDB 2877	JQ805800		JQ805862	JQ805844
<i>Macrobrachium crenulatum</i>	Venezuela (Norte)	VZ-NT	IVIC 123	JQ805801		JQ805863	JQ805845
<i>Macrobrachium crenulatum</i>	Venezuela (Isla Margarita)	VZ-IM	CCDB 2124	JQ805803		JQ805865	
<i>Macrobrachium crenulatum</i>	Jamaica (Noroeste)	JM-NO	RMNHD 8819	JQ805805			
<i>Macrobrachium digueti</i>	México (Pacífico)	MX-PA	UNAM 24811	JQ805808	JQ805905 JQ805906	JQ805870	JQ805849
<i>Macrobrachium digueti</i>	Costa Rica (Pacífico)	CR-PA	CCDB 2882	JQ805806	JQ805903	JQ805868	JQ805847
<i>Macrobrachium digueti</i>	Costa Rica (Pacífico)	CR-PA	CCDB 3091	JQ805807	JQ805904	JQ805869	
<i>Macrobrachium faustinum</i>	Jamaica (Nordeste)	JM-NE	RMNHD 17613	JQ805809 JQ805810 JQ805811	JQ805907 JQ805908 JQ805909	JQ805871	JQ805850
<i>Macrobrachium faustinum</i>	Jamaica (Norte)	JM-NT	ARCMD 1248	JQ805812			
<i>Macrobrachium faustinum</i>	Ausente	-	MNHN				(*)GU205010
<i>Macrobrachium faustinum</i>	Ausente	-	MNHN				(*)GU205011
<i>Macrobrachium hancocki</i>	Costa Rica (Pacífico)	CR-PA	CCDB 2885	JQ805823	JQ805910	JQ805872	
<i>Macrobrachium hancocki</i>	Costa Rica (Pacífico)	CR-PA	CCDB 3090	JQ805813	JQ805911	JQ805873	
<i>Macrobrachium hancocki</i>	Costa Rica (Pacífico)	CR-PA	CCDB 3092	JQ805814	JQ805912	JQ805874	JQ805851
<i>Macrobrachium hancocki</i>	Costa Rica (Pacífico)	CR-PA	CCDB 3756	JQ805822	JQ805919		

<i>Macrobrachium hancocki</i>	Costa Rica (Pacífico)	CR-PA	CCDB 3757	JQ805821	JQ805920		
				JQ805815	JQ805913		
<i>Macrobrachium hancocki</i>	Panamá (Pacífico)	PN-PA	RMNHD 8810	JQ805816	JQ805914	JQ805875	JQ805852
				JQ805817	JQ805915	JQ805876	
<i>Macrobrachium hancocki</i>	Panamá (Pacífico)	PN-PA	RMNHD 8811	JQ805818	JQ805916		
				JQ805819	JQ805917		
				JQ805820	JQ805918	JQ805877	
<i>Macrobrachium lar</i>	China (Taiwan)	CH-TW	MAS000 02	(*)EU493136			
<i>Macrobrachium lar</i>	Ausente	-	GUMB 992	(*)EF588316		(*)EU249462	
<i>Macrobrachium lar</i>	Australia (Indo-Pacífico)	AU-IP	-				(*)AY374168
<i>Macrobrachium lar</i>	Ausente	-	-		(*)GU205064		
<i>Macrobrachium lar</i>	Ausente	-	-		(*)GU205066		
<i>Macrobrachium lar</i>	Ausente	-	-		(*)GU205067		
<i>Macrobrachium lar</i>	Ausente	-	-		(*)GU205068		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Costa Rica (Atlântico)	CR-AT	CCDB 2876	JQ805835	JQ805933	JQ805887	JQ805858
					JQ805935		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Costa Rica (Atlântico)	CR-AT	CCDB 2874	JQ805838	JQ805957	JQ805889	
					JQ805958		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Costa Rica (Atlântico)	CR-AT	CCDB 2880	JQ805839	JQ805936	JQ805890	JQ805859
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Costa Rica (Atlântico)	CR-AT	CCDB 3754		JQ805938		
					JQ805937		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Panamá (Atlântico)	PN-AT	CCDB 2884	JQ805840	JQ805959	JQ805891	
					JQ805960		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Venezuela (Noroeste)	VZ-NW	IVIC 1083	JQ805837	JQ805934	JQ805888	
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Venezuela (Isla Margarita)	VZ-IM	CCDB 2446	JQ805836	JQ805932	JQ805886	JQ805857
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Bahia)	BR-BA	CCDB 2720	JQ805833	JQ805930		JQ805856
					JQ805956		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Bahia)	BR-BA	CCDB 2439	JQ805827	JQ805924	JQ805881	JQ805853
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Bahia)	BR-BA	CCDB 3089	JQ805841		JQ805892	
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Espírito Santo)	BR-ES	CCDB 3084	JQ805826	JQ805923	JQ805880	
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Espírito Santo)	BR-ES	CCDB 3082	JQ805832	JQ805929	JQ805885	
					JQ805955		
					JQ805926		
					JQ805952		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Rio de Janeiro)	BR-RJ	CCDB 2213	JQ805829	JQ805953	JQ805882	JQ805854
					JQ805954		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Norte de São Paulo)	BR-SPn	CCDB 1851	JQ805834			
					JQ805925		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Norte de São Paulo)	BR-SPn	CCDB 2423	JQ805828	JQ805949		
					JQ805950		
					JQ805951		
					JQ805931		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Sul de São Paulo)	BR-SPs	CCDB 2503		JQ805946		
					JQ805947		
					JQ805948		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Paraná)	BR-PR	CCDB 2445	JQ805830	JQ805927	JQ805883	
					JQ805921		
					JQ805943		
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Paraná)	BR-PR	CCDB 2279	JQ805824	JQ805944	JQ805878	
					JQ805945		

<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Santa Catarina)	BR-SC	CCDB 1929	JQ805831	JQ805928 JQ805922 JQ805939 JQ805940 JQ805941 JQ805942	JQ805884	JQ805855
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Brasil (Santa Catarina)	BR-SC	CCDB 1924	JQ805825	JQ805942	JQ805879	
<i>Macrobrachium zariqueyi</i>	Guiné Equatorial (Annobon)	GE-AN	-	(*)AY377847			
<i>Cryphiops caementarius</i>	Ausente	-	JC 1219	(*)DQ079711		(*)DQ079672	(*)DQ079747
<i>Cryphiops caementarius</i>	Chile (Coquimbo)	CL-CO	CCDB 1870	(*)HM352453	(*)H352495		

As sequências nucleotídicas foram editadas no BIOEDIT e alinhadas no programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994, implementado no BIOEDIT). As análises de distância genética e filogenética foram realizadas a partir das sequências parciais obtidas dos quatro marcadores (16S rDNA, COI mtDNA, 18S nDNA e H3 nDNA). As distâncias genéticas foram calculadas no PAUP 4.0 beta 10 (Swofford, 2003), usando distância p não corrigida. Os modelos de substituições de nucleotídeos empregados nas análises filogenéticas foram selecionados segundo o critério de informação Akaike (Akaike Information Criterion - AIC) (Posada & Buckley, 2004) pelo programa jModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008).

As hipóteses filogenéticas geradas foram baseadas nos dados moleculares e estimadas usando Máxima Verossimilhança (Maximum likelihood - ML) (Felsenstein, 1981) e Inferência Bayesiana (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). As análises de Máxima Verossimilhança foram realizadas no programa PAUP. Foram realizadas buscas heurísticas, com a adição aleatória de sequências, com duas réplicas. Os níveis de suporte de ramos foram obtidos pelo método de

reamostragem por “bootstrap” (Felsenstein, 1985) com 100 pseudoréplicas, para avaliar a confiabilidade das topologias obtidas.

A inferência Bayesiana (Bayesian Inference - BI) foi realizada através do programa MrBayes v. 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). As análises bayesianas foram configuradas para utilizar os seguintes parâmetros: frequência de amostragem igual a 500, quatro cadeias de aquecimento (três aquecidas e uma fria), valor da parada de aquecimento das cadeias menor que 0,01 depois de no mínimo 1.000.000 de gerações, estas configurações tem o objetivo de estabilizar a entrada de dados. Posteriormente, os dados obtidos foram coletados da fase estacionária da cadeia e os estados iniciais descartados (burnin=10%). Para a análise dos resultados, utilizou-se o consenso da maioria das árvores geradas. O consenso da maioria é uma forma de sumarizar em uma só árvore o resultado de todas as árvores geradas na análise bayesiana. Os níveis de suporte de ramos foram obtidos pelo método de probabilidade posterior. As árvores geradas de ambas as análises foram salvas e editadas pelo programa FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2009).

Independentemente, analisou-se a estrutura genética populacional de *M. offersii* por meio das sequências parciais do gene mitocondrial COI obtidas de três ou mais indivíduos provenientes da mesma localidade ao longo da distribuição geográfica, condição esta já testada para outros Decapoda (Vergamini *et al.*, 2011). O número de haplótipos foi calculado no programa DnaSP versão 4.10.9 (Rozas & Rozas, 1999). A diversidade de nucleotídeos e de haplótipos foi estimada para cada

população usando o programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Redes de haplótipo foram construídas pelo método estatístico de parcimônia no TCS versão 1.21 (Clement *et al.*, 2000) e pelo método Median-Joining no Network (Bandelt *et al.*, 1999) com os dados previamente preparados no DnaSP.

Séries de análise de variação molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foram computadas no Arlequin para examinar a distribuição da variação genética. Essas foram processadas baseadas na frequência de haplótipos com e sem estrutura hierárquica, subdivisão entre populações específicas e todas num único grupo, respectivamente. Foi testada a significância dos resultados pelo procedimento de permutação não paramétrico (Excoffier *et al.*, 1992), incorporando 10.000 permutações.

Resultados & Discussão

4 – RESULTADOS & DISCUSSÃO

4.1 *Análise morfológica*

Buscou-se examinar o maior número possível de caracteres mensuráveis e merísticos da morfologia externa destas espécies, porém durante a análise constatou-se que algumas medidas específicas não foram informativas, por exemplo, o comprimento e largura dos artículos do 1º, 3º, 4º e 5º pereópodos, pois não revelaram um padrão entre eles. Também foi observado que os caracteres diagnósticos de cada espécie são, na maioria das vezes, variáveis e apresentam diferenças sutis, gerando dúvidas na identificação.

Outras partes do plano corporal das espécies foram analisadas, como a forma da margem pós-orbital, a forma do processo mediano do quarto esternito torácico (T4) e a forma e posição das carenas do epístoma. Estes caracteres já haviam sido considerados como variáveis dentro do gênero (Short, 2004). Apesar de haver diferenças foram encontradas variações intraespecíficas no formato da margem pós-orbital, o qual varia desde reto a distintamente convexo, pouco ou muito pronunciado; o processo mediano varia de arredondado a agudo, pronunciado ou não; as carenas do epístoma variam a posição entre elas de um ângulo agudo a obtuso (Figura 3: A – C, respectivamente). Portanto, é difícil realizar uma identificação concreta baseada apenas nestes caracteres.

Figura 3: Representação das estruturas de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836). Caracteres com variação intraespecíficas: A) Vista lateral do rostro com destaque nas variações da margem pós-orbital; B) Quarto esternito torácico T4, com destaque nas variações do processo mediano; C) Epístoma, com destaque na posição das carenas. Escala = 1 cm.

Outro caráter de interesse que variou entre os exemplares foi o formato da carena pré-anal, incluindo variações intraespecíficas (Figura 4).

Figura 4: Representação do leque caudal e do sexto segmento abdominal de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836), em vista ventral, com destaque nas variações da carena pré-anal. Escala = 1 cm.

Desta forma, os dados foram revisados com rigor, particularmente: formato do rostro; comprimento do rostro em relação ao escafocerito; quantidade de dentes e sua distribuição na borda superior e inferior do rostro; quantidade de dentes e sua distribuição na borda superior pós-orbital do rostro; formato e disposição das carenas do epístoma; forma do processo mediano do quarto esternito torácico; formato da margem subocular; presença de cerdas/pelos/dentes e espinhos na carapaça; superfície do abdome; ornamentação do segundo par de pereópodos, formato e proporção dos artículos destes; proporção da altura e largura da pleura do segundo somito abdominal; formato do quinto e sexto somito abdominal e proporção quanto ao comprimento do telso; formato da extremidade do telso; formato da carena pré-anal; presença e posicionamento de espinhos na superfície dorsal e na margem distal do telso e presença de espinhos na margem externa dos urópodos.

O quelípodo (segundo pereópodo) maior revelou ser um caráter determinante na identificação destas espécies, pois foi o que apresentou maior variabilidade entre os integrantes do complexo (Figura 5). Estas variações estão descritas abaixo na revisão taxonômica de cada espécie.

Figura 5: Representação do quelípodo (segundo pereópodo) maior de espécies do gênero *Macrobrachium*, revelando as principais estruturas de identificação das espécies pertencentes ao complexo *M. olfersii*, como artículos e ornamentações da quela (própodo e dátilo). Modificado de Hernández *et al.* (2007).

4.2.1 Revisão taxonômica

***Macrobrachium acanthochirus* Villalobos, 1967 (Figura 6)**

Macrobrachium acanthochirus Villalobos, 1967: 168; Plates 1-2. 1969: 1062.

Material-tipo: 1 macho UNAM-CNCR 331 (52461), espécime danificado, México, Colima, Pochutla, rio Valdeflores, 01.v.1961, coletor: Villalobos, A.

Outros exemplares examinados: 1 Macho (CC 27,24 mm), RMNHD 35656, México, Sinaloa, rio Baluarte, 01.ix.1982, coletor(es): não identificado; 1 Macho (CC 29,29 mm), CNCR-UNAM 10114, México, La Venta, rio Papagayo,

24.06.1988, coletor: Marquez, L.; 1 Macho (CC 25,00 mm), CNCR-UNAM 24835, México, Oaxaca, Santa María Huatulco, data de coleta e coletor(es): ausentes; 1 Macho (CC 18,29 mm), CNCR-UNAM sem número, México, data de coleta e coletor(es): ausentes.

Redescrição: Rostro reto, levemente inclinado para baixo, alcançando ou quase alcançando a extremidade distal do pedúnculo antenular e não alcançando a extremidade distal do escafoerito. Margem superior com 15 dentes de base larga, dispostos regularmente na borda superior, os dois proximais encontram-se um pouco mais distante dos outros. Três a cinco dentes atrás da órbita. Margem inferior do rostro com três ou quatro dentes. Comprimento do rostro $\frac{3}{5}$ a $\frac{2}{3}$ da carapaça e $\frac{2}{9}$ a $\frac{1}{4}$ do comprimento total.

Contorno da margem pós-orbital geralmente reto e pouco pronunciado. Flagelo antenular superior birreme e inferior simples, com tufo de cerdas finas na base antenular. Antena com base e ísquio fundidos, endopodido bem definido e escafoerito (exopodito) bem desenvolvido. Largura do escafoerito menor que $\frac{1}{3}$ do comprimento. Epístoma completamente dividido em dois lobos com carenas arredondadas e pronunciadas, em posição oblíqua, com um ângulo agudo entre elas.

Carapaça lisa com um espinho hepático menor que o antenal em posição oblíqua atrás deste, em cada lado da carapaça. Quarto esternito torácico (T4) com

processo mediano agudo e pronunciado. Exopoditos dos maxílpedes dos machos maiores do lado do quelípodo maior.

Primeiro par de pereópodos alcançando o escafoerito com a região distal ou proximal do carpo. Artículos com cerdas nas faces internas e externas. Segundo par de pereópodos muito desiguais. Quelípodo maior alcançando com $\frac{1}{2}$ a $\frac{2}{3}$ do carpo além do escafoerito. Quelípodo menor com dedos longos, maiores que o própodo, e curvados. Hiato entre os dedos repleto de cerdas longas. Comprimento do própodo do quelípodo menor praticamente a metade do própodo maior.

Quelípodo maior com o datílo igual ou maior que o própodo. Largura do dedo móvel $\frac{1}{5}$ do comprimento, dedo fixo com região proximal (base) larga e uma aparência triangular. Dedo móvel curvado, formando um grande hiato entre eles. Margens internas dos dedos com três ou mais dentes na parte proximal e outros menores formando uma fila. Margens internas com uma fileira de dentes e algumas cerdas longas e rígidas dirigidas para o interior. Largura do própodo aproximadamente a metade do comprimento. Margem superior e inferior pouco convexas ou retas. Fileiras longitudinais de espínulos nos dedos, regulares no dedo móvel e irregulares no dedo fixo. Dedos com fortes espinhos na região proximal. Próximo com região superior com pequena pubescência, sem espinhos e espínulos. Região central da superfície externa do própodo com grandes espinhos. Margem superior (dorsal) da quela com uma fila de espinhos bem pronunciados. Margem inferior com uma fila regular de pequenos. Superfície interna com pubescência sem

espinhos e fileiras de espínulos. Carpo menor ou igual ao própodo e menor que o mero. Carpo e mero robustos, com espínulos em todas as superfícies e alguns espinhos na região distal dos artículos. Ísquio aproximadamente a metade do comprimento do mero.

Terceiro par de pereópodos alcançando quase alcançando a extremidade distal do escafoцерito. Quarto e quinto não alcançando o fim do escafoцерito. Três últimos pares de pereópodos com espinhos no própodo e dátilo e espínulos ao longo da margem ventral do carpo, mero e ísquio.

Abdome liso. Altura da pleura do segundo somito $\frac{7}{8}$ a $\frac{8}{9}$ da largura. Pleura do quinto somito retangular. Margem inferior do quinto somito abdominal com a região próxima ao sexto arredondada ou triangular. Segundo par de pleópodos com apêndice interno mais longo que o apêndice masculino. Quinto somito abdominal $\frac{3}{5}$ a $\frac{3}{4}$ do comprimento do sexto e $\frac{2}{5}$ a metade do telso. Sexto somito aproximadamente $\frac{2}{3}$ do telso. Carena pré-anal no esclerito pré-uropodial muito pronunciada e triangular com cerdas no ápice.

Telso $\frac{1}{8}$ a $\frac{1}{7}$ do comprimento total. Margem distal do telso metade da largura da margem proximal. Face dorsal do telso com dois pares de espínulos e dois pares de espinhos na margem distal. Espinhos internos ultrapassando a margem posterior do telso com muitas cerdas entre eles. Exopoditos dos urópodos com uma cerda espiniforme mais longa que a projeção espiniforme da margem externa.

Tamanho: o comprimento total varia entre os machos 58 a 85 mm.

Localidade-tipo: rio Valdeflores, Valdeflores de Tonameca, Poxutla, Oaxaca, México (Villalobos, 1967).

Distribuição: endêmico do México (Villalobos, 1967, 1969).

Observações: essa espécie é comumente confundida com *M. digueti* (Bouvier, 1895). Porém os machos adultos podem ser distinguidos por apresentarem a largura proximal do dedo fixo ampla, superfície externa do própodo com uma região nua de espinhos e presença de pubescência na região proximal submarginal superior e o comprimento do capo menor que o mero do quelípodo maior.

Figura 6: *Macrobrachium acanthochirus* Villalobos, 1967, macho, vista lateral, CNCR-UNAM 10114. Escala = 0,8 cm.

***Macrobrachium crenulatum* Holthuis, 1950 (Figura 7)**

Macrobrachium crenulatum Holthuis, 1950a: 95; 1952: 107 Valencia & Campos, 2007: 16.

Material examinado: 2 machos (CC 14,75 e 28,37 mm), CCDB 2873, Costa Rica, Límon, rio Suarez, 23.v.2010, coletores: Mantelatto, F.L.; 2 machos (CC 20,96 e 26,37 mm), CCDB 2124, Venezuela, Ilha Margarita, Cerro Lopez, 30.viii.2006, coletores: Mantelatto, F.L. & Pileggi, L.G.; 2 machos (CC 23,77 e 27,70 mm), CCDB 2877, Venezuela, Ilha Margarita, Setor La Taqua, rio Matasiete, 16.v.2006, coletores: Mantelatto, F.L. & Pileggi, L.G.; 2 machos (CC 21,00 e 28,20 mm), IVIC 123, Venezuela, Estado Vargas, rio Las Caracas, 25.v.2006, coletor(es): não identificado; 1 macho (CC 17,34 mm) e 1 ovígera (CC 23,00 mm), RMNHD 8818, Venezuela, Macuto, 01.viii.1900, coletor(es): não identificado; 1 macho (CC 25,68 mm), RMNHD 8819, Jamaica, Baía Montenegro, 05.vii.1910, coletor(es): não identificado; 1 macho (CC 20,80 mm), UCR 303, Nicarágua, Chontales, Villa Somoza, rio Muhan, 21.iv.1968, coletor(es): não identificado; 2 machos (CC 20,54 e 23,3 mm) CCDB 3537 - ULLZ 13470, Panamá, Bocas del Toro, La Gruta, 09.viii.2011, coletores: Rossi, N.; Magalhães, T.; Negri, M. & Mantelatto, F.L.; 1 ovígera (CC 16,70 mm), CCDB 3174, Costa Rica, Cahuita, rio Suarez, 22.v.2011, coletores: Terossi, M. & Mantelatto, F.L.

Redescrição: Rostro reto, levemente inclinado para baixo, alcançando ou quase alcançando a extremidade distal do pedúnculo antenular e não alcançando a extremidade distal do escafoцерito. Margem superior do rostro com 11 a 14 dentes,

frequentemente 12 dentes, proximal um pouco mais afastado dos outros. Quatro a cinco dentes atrás da órbita. Margem inferior com quatro dentes. Comprimento do rostro $\frac{2}{3}$ a $\frac{4}{7}$ da carapaça e $\frac{1}{5}$ a $\frac{1}{4}$ do comprimento total.

Contorno da margem pós-orbital geralmente pouco pronunciado, Margem pós orbital reta a convexa. Flagelo antenular superior birreme e inferior simples, com tufos de cerdas finas na base antenular. Antena com base e ísquio fundidos, endopodido bem definido e escafoцерito (exopodito) bem desenvolvido. Largura do escafoцерito entre $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{3}$ do comprimento. Epístoma completamente dividido em dois lobos com carenas pouco ou muito pronunciadas, em posição oblíqua, com um ângulo agudo entre elas.

Carapaça lisa com espinho hepático menor que o antenal em posição oblíqua atrás deste, em cada lado da carapaça. Quarto esternito torácico (T4) com processo mediano agudo e pronunciado. Exopodito dos maxílipedes dos machos iguais ou pouco maiores do lado do quelípodo maior.

Primeiro par de pereópodos alcança o escafoцерito com metade ou a região distal do carpo. Artículos com cerdas nas faces internas e externas. Segundo par de pereópodos muito desiguais, maior alcançando com parte distal do mero além do escafoцерito e menor alcançando o escafoцерito com parte distal do carpo. Quela menor com dedos longos, maiores que o própodo. Dedos curvados com um hiato preenchido com cerdas longas.

Quelípodo maior com comprimento do datílo menor ou igual ao própodo. Largura do dedo móvel entre $\frac{1}{7}$ a $\frac{1}{3}$ do comprimento, dedo fixo com região proximal (base) larga. Dedos curvados com amplo hiato entre eles. Região proximal das margens internas dos dedos com três ou mais dentes. Margens internas com cerdas longas, rígidas, dirigidas para o interior. Largura do própodo igual ou metade do comprimento. Margens superior e inferior retas. Dedos com fileiras longitudinais de espínulos nos dedos, maiores na região proximal. Própedo com grandes espinhos na superfície externa do própodo, exceto na região central. Região central da superfície externa do própodo sem espinhos e espínulos e com pequena região aveludada. Margem superior (dorsal) do própodo com fila de espinhos bem pronunciados. Dedo fixo com fila de espinhos pequenos. Região e margem inferior de ambas as superfícies com filas de pequenos espinhos. Superfície interna com região superior a mediana aveludada. Carpo menor que o própodo e o mero. Carpo e mero robustos, artículos com espinhos em todas as superfícies, maiores na margem superior interna. Ísquio aproximadamente a metade do comprimento do mero.

Terceiro par de pereópodos alcançando ou quase alcançando a extremidade distal do escafoerito. Quarto e quinto não alcançando o fim do escafoerito. Três últimos pares de pereópodos lisos com exceção de espinhos no própodo e datílo. Espínulos ao longo da margem ventral do carpo, mero e ísquio.

Abdome liso. Altura da pleura do segundo somito aproximadamente igual à largura. Pleura do quinto somito retangular com região próxima ao sexto somito na margem inferior arredondada ou triangular. Segundo par de pleópodos com apêndice interno mais longo que apêndice masculino. Comprimento do quinto somito abdominal metade ou igual ao do sexto e $\frac{2}{7}$ a $\frac{2}{3}$ do telso. Sexto somito $\frac{5}{9}$ a $\frac{7}{9}$ do telso. Esclerito pré-uropodial com carena pré-anal muito pronunciada, sem um formato definido com cerdas no ápice.

Comprimento do telso $\frac{1}{8}$ a $\frac{1}{7}$ do total. Margem distal do telso metade da largura da margem proximal. Face dorsal do telso com dois pares de espínulos e dois pares de espinhos na margem distal. Espinhos internos ultrapassando a margem posterior do telso com muitas cerdas entre eles. Exopoditos dos urópodos com cerda espiniforme mais longa que a projeção espiniforme da margem externa.

Dimorfismo: nas fêmeas a heteroquelia existe, porém a diferença entre os quelípodos é mais discreta, o quelípodo maior é mais delgado que nos machos. A ornamentação e a região aveludada são pouco pronunciadas, mas similares ao do macho. A largura da pleura (segundo somito abdominal) é maior que nos machos.

Tamanho: o comprimento total varia entre os machos 50 a 90 mm e entre as fêmeas ovígeras 59 a 70 mm.

Coloração: o corpo é marrom e os pereópodos são mais escuros com manchas amareladas nas articulações dos artículos e as fêmeas são marrom-amarelado.

Biologia: são exclusivamente de águas costeiras, uma vez que, necessitam de água salobra para desenvolvimento das larvas, sendo, portanto, anfídromos. Os ovos são pequenos e numerosos: 0,5 a 0,63 mm (Holthuis, 1952).

Localidade-tipo: rio Pejebobo no Panamá (Holthuis, 1950a).

Distribuição: ocorrem em águas continentais da costa Atlântica da Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Venezuela Jamaica, Ilhas Virgens e Trinidad e Tobago (Holthuis, 1952; Villalobos, 1969).

Observações: essa espécie é mais parecida a *M. hancocki* Holthuis, 1950. Essa espécie pode ser diferenciada pela presença de uma região retangular nua de espinhos e com escassa pubescência na região central da superfície externa do própodo do quelípodo maior e há uma fila de espinhos na margem superior e as vezes uma fila irregular abaixo (submarginal) na superfície externa do própodo em machos adultos.

Figura 7: *Macrobrachium crenulatum* Holthuis, 1950, macho, vista lateral, UCR 303. Escala = 0,7 cm.

***Macrobrachium digueti* (Bouvier, 1895) (Figura 8)**

Palaemon Digueti Bouvier, 1895: 159; Fig. 2;

Macrobrachium digueti Holthuis, 1950b: 13; 1952:103; Villalobos, 1969: 1060;

Valencia & Campos, 2007: 18.

Material examinado: 2 machos (CC 10,16 e 9,23 mm), CNCR-UNAM 24811, México, Oaxaca, San Miguel del Puerto, rio Zimatán, 13.iv.2007, coletor: Villalobos, J.L.; 2 machos (CC 18,04 e 24,7 mm), CCDB 2882, Costa Rica, Quebrada Esquadra, 22.xi.2006, coletores: Werthmann, I. & Hernández, L.R.L.; 1 Macho (CC 22,56 mm) e 2 ovígeras (CC 11,46 e 12,66 mm), RMNHD 16697, Equador, Chula, 01.ix.1956, coletor(es): não identificado; 1 juvenil (CC 6,78 mm), CCDB 3091, 10.ii.2009, Costa Rica, Paquera, rio Santa Cecília, coletores: Werthmann, I. & Hernández, L.R.L.; 2 machos (CC 10,11 e 11,35 mm), CNCR-UNAM 24811, México, Oaxaca, San Miguel Del Puerto, rio Zimatan, 13.iv.2007, coletor: Villalobos, J. L.

Redescrição: Rostro reto, levemente inclinado para baixo, alcançando ou quase alcançando a extremidade distal do pedúnculo antenular e não alcançando a extremidade distal do escafoцерito. 13 a 15 dentes, frequentemente 14 dentes, dispostos regularmente na margem superior, maiores na região mediana e o proximal mais distante dos outros. Três a seis dentes atrás da órbita, mais comum cinco. Três a cinco dentes na borda inferior, frequentemente três. Comprimento do rostro entre $\frac{4}{7}$ a igual o comprimento da carapaça. $\frac{1}{5}$ a $\frac{1}{4}$ do comprimento total.

Contorno da margem pós-orbital geralmente pouco pronunciado e praticamente reto. Flagelo antenular superior birreme e inferior simples, com tufo de cerdas finas na base antenular. Antena com base e ísquio fundidos, endopodido bem definido e escafoцерito (exopodito) bem desenvolvido. Largura do escafoцерito entre $\frac{1}{3}$ a $\frac{2}{7}$ do comprimento. Epístoma dividido em dois lobos com carenas pouco pronunciadas, carenas em posição oblíqua, com um ângulo obtuso entre elas.

Carapaça lisa com espinho hepático menos desenvolvido ou igual ao antenal e colocado em posição oblíqua atrás deste, em cada lado da carapaça. Quarto esternito torácico (T4) com o processo mediano arredondado. Exopodido dos maxílipedes dos machos maiores do lado do quelípodo maior.

Primeiro par de pereópodos alcançando o escafoцерito com metade ou a região distal do carpo. Artículos com cerdas nas faces internas e externas. Segundo par de pereópodos muito desiguais, maior alcançando com parte distal do mero além do escafoцерito, menor alcança o escafoцерito com metade do carpo. Quelípodo menor com dedos mais longos que o própodo, curvados formando um hiato entre eles. Hiato entre os dedos com cerdas longas.

Quelípodo maior com datílo menor ou igual ao própodo. Largura dos dedos entre $\frac{1}{8}$ a $\frac{1}{3}$ do comprimento, dedos curvados, formando um hiato entre eles. Margens internas dos dedos com um dente na parte proximal e outros menores em fila. Margens internas com cerdas longas e rígidas preenchendo o hiato. Largura do própodo $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ do comprimento. Própedo comprimido e levemente inflado. Margens

superior e inferior convexas. Quela com fileiras longitudinais de espínulos menores e mais unidos na parte superior e inferior, maiores e mais espaçados na região mediana do própodo. Próximo com grande região aveludada em cada superfície lateral (interna e externa). Margem superior (dorsal) da quela com fila de espinhos bem pronunciados, maiores e fortes na região do própodo e menores no dedo fixo. Carpo menor que o própodo e aproximadamente igual ao mero. Carpo e mero robustos com uma fileira longitudinal de espínulos, menores e mais densos dorsalmente, maiores e mais separados ventralmente. Ísquio $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ do comprimento do mero. Terceiro par de pereópodos alcançando ou quase alcançando a extremidade distal do escafoerito. Quarto e quinto não alcançando o fim do escafoerito.

Abdome liso. Altura da pleura do segundo somito $\frac{5}{7}$ ou igual à largura. Pleura do quinto somito retangular e na margem inferior a região próxima ao sexto somito ligeiramente aguda. Segundo par de pleópodo com apêndice interno ligeiramente mais longo que o apêndice masculino. Quinto somito abdominal $\frac{4}{7}$ a $\frac{4}{5}$ do comprimento do sexto $\frac{1}{5}$ a $\frac{1}{2}$ do telso. Comprimento do sexto somito entre metade a $\frac{5}{7}$ do telso. Carena pré-anal no esclerito pré-uropodial triangular, bem pronunciada, com cerdas no ápice.

Telso $\frac{1}{8}$ a $\frac{1}{6}$ do comprimento total. Margem distal do telso de $\frac{1}{3}$ a $\frac{2}{3}$ da largura da margem proximal. Face dorsal do telso com dois pares de espínulos e dois pares de espinhos na margem distal. Espinhos internos margem distal

ultrapassando a margem posterior do telso com muitas cerdas entre eles. Exopoditos dos urópodos com um cerda espiniforme mais longa que a projeção espiniforme da margem externa.

Dimorfismo: nas fêmeas a heteroquelia existe, porém a diferença é mais discreta, assim o quelípodo maior não é tão desenvolvido e o própodo é mais delgado que nos machos. A ornamentação e a região aveludada são pouco pronunciadas, mas similares ao do macho. A largura da pleura (segundo somito abdominal) é maior que a dos machos.

Tamanho: comprimento total varia entre os machos 34 a 73 mm e entre as fêmeas ovígeras 35 a 58 mm. O corpo é marrom-escuro e os pereópodos são mais claros e nas fêmeas são amareladas (Holthuis, 1952).

Biologia: são exclusivamente de águas costeiras, uma vez que, necessitam de água salobra para desenvolvimento das larvas, sendo, portanto, anfídromos. Os ovos são pequenos e numerosos: 0,4 a 0,6 mm (Holthuis, 1952).

Localidade-tipo: rio Mulege na Baixa Califórnia, México (Bouvier, 1895).

Distribuição: ocorrem em águas continentais da costa Pacífica do México, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia e Equador (Holthuis, 1952).

Observações: essa espécie é similar a *M. offersii*, apresentando diferenças sutis (pubescência, dentes e espinhos) que podem ser interpretadas como variações intraespecíficas e possíveis plasticidades fenotípicas. É possível distingui-las pela análise genética e pela localidade encontrada (costa Pacífica ou Atlântica). Dois

machos de *M. olfersii* (CNCR-UNAM 2811) de Oaxaca, México é *M. digueti*. Essa espécie também é comumente confundida com *M. acanthochirus*, Villalobos, 1967. Porém se diferencia principalmente quanto as proporções entre carpo e mero, ornamentações do própodo e formato do dedo fixo do quelípodo maior dos machos adultos. *Macrobrachium digueti* apresenta o comprimento do carpo aproximadamente igual ao do carpo, a superfície externa do própodo apresenta uma região central com espínulos e pubescência, com fortes espinhos na margem superior e nas regiões distal e proximal do própodo, e a largura poximal do dedo fixo é estreita.

Figura 8: *Macrobrachium digueti* (Bouvier, 1895), macho, vista lateral, CNCR-UNAM 24811. Escala = 0,7 cm.

***Macrobrachium faustinum* (de Saussure, 1857) (Figura 9)**

Palæmon Faustinus de Saussure, 1857: 505.

Palaemon cubanus Sharp, 1893: 123.

P.[alemon] spinimanus H. Milne Edwards, 1837 II : 399.

Macrobrachium faustinum Chace & Holthuis, 1948: 23; Holthuis, 1950b: 14; 1952: 88; Chace & Hobbs, 1969: 102; Villalobos, 1969: 1060; Holthuis & Provenzano, 1970: 211; Bowles *et al.*, 2000: 161; Valencia & Campos, 2007: 19.

Material-tipo: 1 machos (CC 14,47 e 25,23 mm), MNH [holótipo], Cuba, 01.vii.1971, coletor: de Saussure, H. 1 macho (CC 14,47 mm), MNH [parátipo], Cuba, 01.vii.1971, coletor: de Saussure, H.

Outros exemplares examinados: 1 macho (CC 16,56 mm), ULLZ 1248, Jamaica, data de coleta e coletor(es): não identificados; 1 macho (CC 29,33 mm), IVIC 1083, Venezuela, Estado Lara, Curarigua, rio Curarigua 31.viii.2000, coletor(es): não identificado; 3 machos (CC 11,68 – 20,45 mm), RMNHD 17613, Jamaica, rio Grande, 05.vii.1962, coletor(es): não identificado; 2 machos (CC 18,2 e 14,04 mm), ULLZ 6323, Jamaica, Saint James Parish, 20.v.1976, coletor: Buden, D.W.; 1 fêmea (CC 10,28 mm), ULLZ 1247, Jamaica, 17.v.1976, coletor(es): não identificado.

Redescrição: Rostro reto e levemente inclinado para baixo, alcançando a extremidade distal do pedúnculo antenular, não alcançando a extremidade distal do escafoцерito. Margem superior com 11 a 15 dentes, maiores na região mediana. Dente proximal um pouco mais distante dos outros. Quatro ou cinco dentes atrás da órbita. Margem inferior com três dentes. Comprimento do rostro entre $\frac{2}{3}$ a $\frac{8}{9}$ do comprimento da carapaça e $\frac{1}{5}$ a $\frac{1}{4}$ do comprimento total.

Contorno da margem pós-orbital geralmente bem pronunciado e distintamente convexo. Flagelo antenular superior birreme e inferior simples, com

tufos de cerdas finas na base antenular. Antena com base e ísquio fundidos, endopodido bem definido e escafoцерito (exopodito) bem desenvolvido. Largura do escafoцерito entre $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{4}$ do comprimento. Epístoma dividido em dois lobos com carenas arredondadas e discretas, as quais estão afastadas e se encontram em posição oblíqua, em um ângulo agudo entre elas.

Carapaça lisa, com espinho hepático aproximadamente igual ao antenal e colocado em posição oblíqua atrás deste, em cada lado da carapaça. Quarto esternito torácico (T4) com processo mediano arredondado ou pontiagudo e discreto. Exopodido dos maxílipedes dos machos levemente mais longos do lado do quelípodo maior.

Primeiro par de pereópodos alcançando o escafoцерito com a região proximal ou distal do carpo. Artículos com cerdas nas faces internas e externas. Segundo par de pereópodos muito desiguais, maior alcançando com $\frac{1}{2}$ do carpo ou com parte distal do mero além do escafoцерito menor alcançando o escafoцерito com metade do carpo. No menor os dedos são longos, maiores que o própodo. Dedos curvados com um hiato repleto de cerdas longas.

Quelípodo maior do segundo pereópodo com dedos maiores ou iguais ao própodo. Dedos curvados com um hiato preenchido parcialmente com cerdas longas e rígidas. Largura dos dedos entre $\frac{1}{9}$ a $\frac{1}{5}$ do comprimento. Margens internas dos dedos com um ou dois dentes na parte mediana ou proximal. Largura do própodo $\frac{1}{2}$ do comprimento. Margem superior convexa e inferior reta ou levemente côncava.

Quela com fileiras longitudinais de espínulos, menores e mais unidos na parte superior e inferior, maiores e mais espaçados na região distal do própodo. Própedo com pubescência na margem superior até parte mediana ou inferior de cada superfície lateral (interna e externa). Região central de cada superfície sem espinhos e espínulos. Margem superior da quela com uma fila de espinhos bem pronunciados, menores na região mediana do própodo e maiores na região proximal, diminuindo ao longo da margem superior do dedo. Carpo aproximadamente igual ao própodo e mais longo que o mero. Carpo, mero e ísquio com duas fileiras longitudinais de espinhos na região lateral interna. Ísquio $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ do comprimento do mero.

Terceiro par de pereópodos alcançando a extremidade distal do escafoцерito. Quarto par raramente alcançando e quinto par de pereópodos nunca alcança. Espinhos na margem posterior do própodo, espínulos ao longo da margem posterior do mero. Espínulos pequenos e esparsos na superfície externa do mero.

Abdome liso. Altura da pleura do segundo somito $\frac{4}{5}$ ou igual à largura. Pleura do quinto somito é retangular. Margem inferior da região próxima ao sexto somito ligeiramente arredondada. Segundo par de pleópodos com apêndice interno ligeiramente maior que o apêndice masculino. Quinto somito abdominal $\frac{4}{7}$ a $\frac{4}{5}$ do comprimento do sexto e $\frac{1}{3}$ ou igual ao telso. Sexto somito $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$ do telso. Carena pré-anal no esclerito pré-uropodial triangular ou arredondada e geralmente pouco pronunciada, com cerdas no ápice.

Telso variando $\frac{1}{8}$ a $\frac{1}{7}$ do comprimento total. Margem distal do telso $\frac{3}{8}$ a $\frac{2}{3}$ da largura da margem proximal. Face dorsal do telso com dois pares espínulos. Margem distal com dois pares de espinhos. Margem posterior do telso com espinhos internos mais longos e muitas cerdas entre eles. Exopoditos dos urópodos com cerda espiniforme mais longa que a projeção espiniforme da margem externa.

Dimorfismo: machos de comprimento mediano podem apresentar o quelípodo bem desenvolvido. Nas fêmeas a heteroquelia existe, porém a diferença é mais discreta, assim o quelípodo maior não é tão desenvolvido quanto nos machos. A ornamentação e a região aveludada são pouco pronunciadas, mas similares ao do macho. A largura da pleura (segundo somito abdominal) é maior que a dos machos.

Tamanho: o comprimento total varia entre os machos 18 a 78 mm e entre as fêmeas ovígeras 35 a 65 mm (Holthuis, 1952; Bowles *et al.*, 2000).

Coloração: o corpo é pálido com tonalidade amarelada e/ou rosada até avermelhada, produzida pelos cromatóforos laranja-avermelhados, espalhados. No rosto há uma faixa marrom avermelhada na metade da parte inferior até a margem pós-orbital (Chace & Hobbs, 1969) com pontos verdes nos dedos (Holthuis, 1952).

Biologia: são exclusivamente de águas costeiras, uma vez que, necessitam de água salobra para desenvolvimento das larvas, sendo, portanto, anfídromos (Hunte & Mahon, 1983). Os ovos são pequenos e numerosos: 0,4 a 0,6 mm (Holthuis, 1952).

Localidade-tipo: Cuba (de Saussure, 1857).

Distribuição geográfica: ocorrem nas Antilhas, tem registro em: Cuba, Jamaica, Haiti, República Dominicana, Porto Rico, Dominica, Santa Lúcia, Barbados, São Vicente e Granadinas, Granada e Trinidad e Tobago, e na Flórida e ao longo da costa do Golfo nos Estados Unidos (Holthuis, 1952).

Observações: essa espécie é mais similar de *M. olfersii* (Wiegmann, 1836), porém se diferencia principalmente por apresentar uma fila de espinhos na margem superior do própodo do quelípodo maior de machos adultos. Nessa margem pode ser encontrado espinhos menores ou ausência de espinhos na região mediana e mais fortes nas regiões distal e proximal da margem superior do própodo.

Figura 9: *Macrobrachium faustinum* (De Saussure, 1857), macho, vista lateral, ARCMD 1248. Escala = 0,5 cm.

***Macrobrachium hancocki* Holthuis, 1950 (Figura 10)**

Macrobrachium hancocki Holthuis, 1950a: 96; 1952: 111; Valencia & Campos, 2007: 22.

Material-tipo: 3 machos (CC 15,32 – 18,10 mm), RMNHD 8810 [parátipo], Panamá, Arquipélago Las Perlas, Ilha San José, Hog Creek, 05.vi.1944, coletor(es): não identificado.

Outros exemplares analisados: 1 macho (CC 19,19 mm) e 1 ovígera (CC 11,40 mm), CCDB 2885, Costa Rica, Sierpes Violines, 27.x.2008, coletores: Werthmann, I. & Hernández, L.R.L.; 1 ovígera (CC 11,20 mm), CCDB 3090, Costa Rica, Montezuma, rio Ponica, coletores: Mantelatto, F.L.; Terossi, M.; Miranda, I.; Werthman, I. & Hernaéz, P.; 1 juvenil (CC 7,51 mm), CCDB 3092, 11.ii.2009, coletores: Mantelatto, F.L.; Terossi, M.; Miranda, I.; Werthman, I. & Hernaéz, P.; 1 fêmea (CC 14,58 mm), CCDB 2883, Costa Rica, Montezuma, rio Biscoion, 11.ii.2009, coletores: Mantelatto, F.L.; Terossi, M.; Miranda, I.; Werthman, I. & Hernaéz, P.; 3 machos (CC 20,68 e 25,19,00 mm), RMNHD 8811, Panamá, Arquipélago las Perlas, Ilha San José, Hog Creek, 09.ix.1944, coletor(es): não identificado; 1 Macho (CC 23,35 mm), CCDB 3756, Costa Rica, Guanacoste, Aojoncha, rio Oro, 23.iii.2008, coletor: Hernandez, L.R.L.; 1 Fêmea (CC 22,43 mm), CCDB 3757, Costa Rica, rio Ríncon de Osa, 08.x.2005, coletor: Hernandez, L.R.L.; 1 macho (CC 16,26 mm), UCR 1326, Costa Rica, Bahia de Coronado, Ilha Del Caño, 15.xii.1970, coletor(es): não identificado.

Redescrição: Rostro reto, alcançando ou quase alcançando a extremidade distal do pedúnculo antenular e não alcançando a extremidade distal do escafoцерito. Margem superior do rostro com 12 a 15 dentes pequenos, dispostos regularmente, não muito próximos. Três ou quatro dentes atrás da órbita. Margem inferior com dois a quatro dentes, frequentemente três. Comprimento do rostro metade a $\frac{3}{4}$ da carapaça e $\frac{1}{6}$ a $\frac{1}{5}$ do comprimento total.

Contorno da margem pós-orbital geralmente pronunciado aproximadamente reto a convexo. Flagelo antenular superior birreme e inferior simples, com tufo de cerdas finas na base antenular. Antena com base e ísquio fundidos, endopodido bem definido e escafoцерito (exopodito) bem desenvolvido. Largura do escafoцерito entre $\frac{2}{5}$ a $\frac{1}{3}$ do comprimento. Epístoma completamente dividido em dois lobos com carenas pronunciadas, afastadas em posição oblíqua, com um ângulo agudo entre elas.

Carapaça lisa com espinho hepático menor que o antenal, em posição oblíqua atrás deste, em cada lado da carapaça. Quarto esternito torácico (T4) com processo mediano agudo e muito pronunciado. Exopoditos dos maxílpedes dos machos iguais ou pouco maiores do lado do quelípodo maior.

Primeiro par de pereópodos alcançando o escafoцерito com a parte distal do carpo. Artículos com algumas cerdas nas faces internas e externas. Segundo par de pereópodos desiguais. Quelípodo maior alcançando com metade do carpo além do escafoцерito. Quelípodo menor alcançando o escafoцерito com parte distal do carpo.

Comprimento dos dedos igual ao própodo. Margem interna do dedo fixo praticamente reto e margem interna do dedo móvel levemente curvada com um pequeno hiato.

Quelípodo maior com datílo menor ou igual ao própodo. Largura do dedo móvel entre $\frac{1}{6}$ a $\frac{1}{3}$ do comprimento, dedo fixo com região proximal (base) larga e dedo móvel curvado, fechando parcialmente o hiato entre eles. Muitas vezes, dedos se cruzam. Margens internas dos dedos com dentes pequenos dispostos em fila. Largura do própodo $\frac{2}{3}$ a $\frac{2}{5}$ do comprimento. Margens (superior e inferior) retas. Margem superior do própodo com duas fileiras longitudinais de espinhos. Superfície do dedo móvel com alguns espínulos. Região submarginal superior do própodo nua ou com poucos espínulos e uma escassa pubescência até altura da margem cortante do dedo móvel. Região submarginal inferior e toda a superfície interna com espínulos regulares. Dedo móvel com espínulos em fileiras regulares na região inferior e na superfície interna. Região distal do própodo, próximo ao dedo móvel com espinhos. Superfície interna do própodo com filas de espínulos e uma região aveludada. Carpo menor que o própodo e o mero. Carpo e mero robustos com filas discretas de espínulos na superfície lateral interna e outros ao longo de todas as superfícies. Carpo com alguns espinhos na região distal. Ísquio aproximadamente metade do comprimento do mero.

Terceiro par de pereópodos raramente alcançando a extremidade distal do escafoцерito. Quarto e quinto não alcançando o fim do escafoцерito. Três ultimos pares de pereópodos com pequenos espinhos no própodo e dátilo.

Abdome liso. Altura da pleura do segundo somito aproximadamente igual à largura. Pleura do quinto somito retangular. Segundo par de pleópodos com apêndice interno mais longo que o apêndice masculino. Quinto somito abdominal metade ou $\frac{7}{8}$ do comprimento do sexto e $\frac{1}{3}$ a $\frac{5}{8}$ do telso. Sexto somito é metade a $\frac{5}{7}$ do telso. Carena pré-anal no esclerito pré-uropodial muito pronunciada, sem um formato definido com cerdas no ápice.

Telso $\frac{1}{8}$ a $\frac{1}{7}$ do comprimento total. Margem distal do telso metade a $\frac{2}{3}$ da largura da margem proximal. Face dorsal do telso com dois pares espínulos e dois pares de espinhos na margem distal. Espinhos internos ultrapassando a margem posterior do telso com muitas cerdas entre eles. Exopoditos dos urópodos com um cerda espiniforme mais longa que a projeção espiniforme da margem externa.

Dimorfismo: nas fêmeas a heteroquelia existe, porém a diferença é mais discreta, e o quelípodo é muito menor que nos machos. A ornamentação e a região aveludada são pouco pronunciadas, mas similares ao dos machos. A largura da pleura (segundo somito abdominal) é maior que a dos machos.

Tamanho: o comprimento total varia entre os machos 44 a 87 mm e entre as fêmeas ovígeras 39 a 65 mm.

Coloração: o corpo é azul escuro a negro, há algumas manchas amarelas no abdômen, telso e urópodos. Os quelípodos são azuis com articulações laranja e/ou amarelas. As fêmeas apresentam tonalidades mais claras, marrom-amarelado (Hernandez, 2009).

Biologia: exclusivamente de águas costeiras, uma vez que, necessitam de água salobra para desenvolvimento das larvas, sendo, portanto, anfídromos. Os ovos são pequenos e numerosos: 0,45 a 0,60 mm (Holthuis, 1952).

Localidade-tipo: Esparta, rio Barranca, Costa Rica (Holthuis, 1950a).

Distribuição: ocorre na costa Pacífica da Nicarágua, costa Pacífica da Costa Rica, costa Pacífica da Panamá, costa Pacífica da Colômbia, no Equador, na Ilha Cocos e em Galápagos (Holthuis, 1952; Villalobos, 1969).

Observações: essa espécie é mais parecida com *M. crenulatum* Holthuis, 1950, porém é possível diferenciar machos adultos pela presença de duas fileiras de espinhos na margem superior do própodo do quelípodo maior, uma pode ser encontrada na região submarginal. Também apresentam uma região retangular nua de espinhos e com uma densa pubescência no centro da superfície externa do própodo do quelípodo maior.

Figura 10: *Macrobrachium hancocki* Holthuis, 1950, macho, vista lateral, CCDB 3756. Escala = 1 cm.

***Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Figura 11)**

Palaemon Olfersii Wiegmann, 1836: 150.

P.[alemon] spinimanus H. Milne Edwards, 1837 II: 399.

Palæmon consobrinus de Saussure, 1857: 504.

Palaemon Desausuri Heller, 1862: 420; Plate 2, fig. 47.

Palaemon Potiporanga Müller, 1880: 152.

Macrobrachium olfersii–Smith, 1869: 40; Ortmann, 1891: 47; Sawaya, 1946: 404; Hedgpeth, 1949: 35; Holthuis, 1950b: 17; Villalobos, 1969: 1058; Williams, 1984: 70; Abele & Kim, 1989: 10; Bowles *et al.*, 2000: 165; Hernandez *et al.* 2007: 360; Valencia & Campos, 2007: 27.

Macrobrachium olfersi–Holthuis, 1952: 95; Holthuis & Provenzano, 1970: 212; Bond-Buckup & Buckup, 1989: 891; Fig 16-19; Melo, 2003: 366; Pileggi, 2009: 127.

Macrobrachium holthuisi Genofre & Lobão, 1978 273; Fig. 1.

Macrobrachium birai Lobão, Melo & Fernandes, 1986: 50; Melo, *et al.*, 1988.

Material-tipo: 1 Macho (CC 23,9 mm) MFN 1916 [holótipo] e 1 Macho (CC 21,8 mm) [parátipo], Brasil, 00.iii.1836, coletor: Olfers, I.F.

Outros exemplares examinados: 1 juvenil (CC 4,0 mm), RMNHD 23591, México, Cidade del Carmen, 01.iii.1955, coletor: Cárdenas, M.; 2 machos (CC 8,59 e 13,62 mm), CCDB 2874, Costa Rica, rio Suarez, 23.v.2010, coletores: Mantelatto, F.L.; Peiró, D.F. & Terossi, M.; 1 macho (CC 16,59 mm), CCDB 2876, Costa Rica, rio San Carlo, coletor: Hernández, L.R.L.; 1 ovígera (CC 15,12 mm), CCDB 2880, Costa Rica, La Selva, Puerto Viejo, 13.vi.2009, coletores: Werthmann, I. & Hernández, L.R.L.; 1 ovígera (CC 12,12 e 13,27 mm), CCDB 2881, Costa Rica, Estrada para Cahuita, 15.ii.2009, coletores: Mantelatto, F.L.; Peiró, D.F. & Terossi, M.; 1 macho (CC 15,55 mm) e 1 fêmea (CC 11,70 mm), CCDB 3754, Costa Rica, rio San Carlo, 05.x.2005, coletores: Werthmann, I. & Hernández, L.R.L.; 1 fêmea (CC 14,03 mm), CCDB 3755, Costa Rica, rio Suarez, 07.x.2007, coletores: Werthmann, I. & Hernández, L.R.L.; 1 fêmea (CC 11,00 mm), CCDB 2884, Panamá, Bocas del Toro, Bocas Del Drago, 17.ii.2009, coletores: Mantelatto, F.L.; Peiró, D.F. & Terossi, M.; 1 macho (CC 22,03 mm), CCDB 2446, Venezuela, Isla Margarita, rio Matasiete, Sector La Tagua-La Fluente, 30.viii.2006, coletor: Lopez, J.; 1 macho (CC 29,39 mm), IVIC 1083, Venezuela, Estado Lara, rio Curarigua, 31.viii.2000, coletor(es): não informado; 2 machos (CC 14,72 e 18,12 mm), e 1 fêmea (CC 15,80 mm), CCDB

3132, Brasil, Rio Grande do Norte, Umari, rio Ceará Mirim, 24.vii.2001, coletores: Malabarba, L.R.; Geórgia, H.; 3 machos (CC 16,10 – 17,55 mm) e 1 ovígera (CC 11,46 mm) CCDB 3131, Brasil, Rio Grande do Norte, Nísia Floresta, rio Ceceu, 20.vii.2001, coletores: Malabarba, L.R.; Geórgia, H.; 11 machos (CC 8,84 – 16,71 mm) e 2 fêmeas (CC 10,64 e 13,12 mm), CCDB 2439, Brasil, Bahia, Ilhéus, rio Santana, 17.ix.2004, coletor(es): não identificado; 14 machos (CC 9,78 – 16,82 mm), CCDB 2495, Brasil, Bahia, Ilhéus, rio Santana, 20.iv.2004, coletor: Almeida, A.O.; 1 macho (CC 14,96 mm), CCDB 3086, Brasil, Bahia, Ilhéus, Lagoa encantada, rio Apepique, 06.xi.2010, coletores: Mantelatto, F.L.; Carvalho, F.L. & Pileggi, L.G.; 2 machos (CC 7,48 e 12,71 mm) e 2 ovígeras (CC 6,47 e 6,54 mm), CCDB 3083, Brasil, Espírito Santo, Guarapari, rio Perocão, 03.xi.2006 coletores: Mantelatto, F.L.; Mossolin, E.C.; Pileggi, L.G. & Torati, L.C.; 1 macho (CC 1,76 mm) e 1 ovígera (CC 10,09 mm), CCDB 3082, Brasil, Espírito Santo, Guarapari, rio Cachoerinha, 03.xi.2006, coletores: Mantelatto, F.L.; Mossolin, E.C.; Pileggi, L.G. & Torati, L.C.; 2 machos (CC 12,55 – 14,56 mm) e 1 fêmea (CC 7,54 mm), CCDB 3084, Brasil, Espírito Santo, Vila Velha, rio Jacu, 03.xi.2006, coletores: Mantelatto, F.L.; Mossolin, E.C.; Pileggi, L.G. & Torati, L.; 7 machos (CC 8,80 – 26,70 mm) e 1 ovígera (CC 16,44 mm), CCDB 3081, Brasil, Rio de Janeiro, Paraty, rio Muricana, 12.xii.1996, coletor: Castro, R.; 4 machos (CC 7,93 e 16,46 mm), CCDB 2213, Brasil, Rio de Janeiro, Paraty, rio Taquari, 16.viii.2007, coletores: Mantelatto, F.L.; Mossolin, E.C.; Pileggi, L.G.; Torati, L.C.; 14 machos (CC 15,26 – 24,07 mm), 2 fêmeas (CC 13,09 e

14,14 mm), e 1 ovígera (CC 14,72 mm), CCDB 2212, Brasil, Rio de Janeiro, Paraty, rio Perequê-Açu, 15.viii.2007, coletores: Mantelatto, F.L.; Mossolin, E.C.; Pileggi, L.G.; Torati, L.C.; 1 macho (CC 19,58 mm) e 1 fêmea (CC 14,06 mm), CCDB 2208, Brasil, Rio de Janeiro, Paraty, afluentes de Córrego das Micas (Br-101), 17.viii.2007, coletores: Mantelatto, F.L.; Mossolin, E.C.; Pileggi L.G.; Torati, L.C.; 7 machos (CC 12,96 – 19,44 mm), 3 fêmeas ovígeras (CC 12,70 – 15,42 mm), CCDB 2423, Brasil, São Paulo, Ubatuba, rio Indaiá, 11.v.2005, coletores: Pileggi, L.G. *et al.*; 1 macho (CC 12,33 mm), MZUSP 5969, Brasil, São Paulo, Ubatuba, rio Indaiá, 01.xii.1982, coletor(es): não identificado; 1 macho (CC 19,99 mm), CCDB 2480, Brasil, São Paulo, Ubatuba, rio Instituto Oceanográfico USP, 25.iv.2005, coletor(es): Pileggi, L.G. *et al.*; 1 macho (CC 21,72 mm), CCDB 2424, Brasil, São Paulo, Rodovia Oswaldo Cruz, rio Paraibuna, 18.ix.2006, coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 1 macho (CC 15,10 mm), CCDB 2225, Brasil, São Paulo, Bertioga, rio Jacareguava, 08.i.1989, coletor: Mantelatto, F.L.; 2 ovígeras (CC 10,43 e 10,51 mm) e 1 fêmea (CC 11,92 mm), RMNHD 31710, Brasil, São Paulo, São Sebastião, 23.viii.1977, coletor: Sawaya, P.; 3 machos (CC 15,82 – 20,73 mm) e 1 ovígera (CC 16,61 mm), CCDB 2450, Brasil, São Paulo, São Sebastião, rio Guaecá, 01.v.2006, coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 1 macho (CC 15,01 mm), CCDB 1851, Brasil, São Paulo, São Sebastião, rio Guaecá, 01.xi.2004, coletores: Mantelatto, F.L. & Mossolin, E.C.; 1 ovígera (CC 12,47 mm), CCDB 2476, Brasil, São Paulo, São Sebastião, rio Guaecá, 19.xi.2006 coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 1 macho (CC 22,48 mm), CCDB 2435,

Brasil, São Paulo, São Sebastião, rio Guaecá, 11.vii.2006; 2 fêmeas (CC 12,78 e 16,68 mm), CCDB 2448, Brasil, São Paulo, São Sebastião, rio do Sul – Praia Grande, 01.v.2006, coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 1 macho (CC 17,73 mm), CCDB 2449, Brasil, São Paulo, São Sebastião, rio São Pedro, 01.v.2006, coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 1 macho (CC 22,59 mm), CCDB 2447, Brasil, São Paulo, Ilhabela, rio da Toca, 20.vii.2006, coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 9 ovígeras (CC 9,35 – 15,25 mm), CCDB 2437, Brasil, São Paulo, Caraguatatuba, rio Claro, 09.xi.2007, coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 2 machos (CC 12,71 e 16,02 mm) e 2 ovígeras (CC 12,76 e 13,04 mm), CCDB 2440, Brasil, São Paulo, Cananéia, rio Branco, 12.v.2008, coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 1 fêmea (CC 14,48 mm) MZUSP 8033, Brasil, São Paulo, Cananéia, rio Branco, 01.xii.1984, coletor(es): não identificado; 15 machos (CC 11,30 – 16,33 mm), CCDB 2503, São Paulo, Iguape, rio Ribeira, 13.v.2008, coletores: Mantelatto, F.L.; Pileggi, L.G.; Mossolin, E.C. & Torati, L.C.; 1 fêmea (CC 17,34 mm) e 1 ovígera (CC 12,27 mm), CCDB 2445, Brasil, Paraná, Antonina, rio Turvo, 01.iv.2003, coletores: Caleffi, S. *et al.*; 2 machos (CC 14,92 e 18,37 mm) e 2 ovígeras (CC 14,00 e 16,40 mm), CCDB 2279, Brasil, Paraná, Paranaguá, rio da Floresta (Br-277/ Km 17), 20.ii.2008, coletores: Mantelatto, F.L. & Mossolin, E.C.; 2 machos (CC 10,72 e 12,38 mm) e 2 ovígeras (CC 10,03 e 13,74 mm), CCDB 2219, Brasil, Santa Catarina, Florianópolis, rio da Praia do Sambaqui, 16.iv.2007, coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 1 macho (CC 17,31 mm) e 2 ovígeras (CC 11,46 e 12,16 mm), CCDB 1929 Brasil, Santa Catarina,

Caieira do Norte, rio Cachoeira, 18.iv.2007, coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 4 machos (CC 8,07 – 24,48 mm), 4 ovíferas (CC 9,82 – 12,93 mm) e 1 fêmea (CC 11,20 mm), CCDB 1924, Brasil, Santa Catarina, Florianópolis, região sul, 17.iv.2007, coletores: Mantelatto, F.L. *et al.*; 3 fêmeas (CC 10,27 – 18,09 mm), CCDB 1856, Brasil, Santa Catarina, Florianópolis, Parque Municipal da Lagoa do Peri, 31.x.2006, coletor: Ammar, D.

Redescrição: Rostro reto, levemente inclinado para baixo ultrapassando quase alcançando a extremidade distal do pedúnculo antenular, não alcançando a extremidade distal do escafoцерito. 12 a 16 dentes, frequentemente 14 dentes, dispostos regularmente na margem superior, o proximal um pouco mais distante dos outros. Três a seis dentes atrás da órbita, mais comumente quatro. Na margem inferior com dois a quatro dentes. Comprimento do rostro entre $\frac{5}{9}$ a $\frac{7}{8}$ do comprimento da carapaça e $\frac{1}{6}$ a $\frac{1}{4}$ do comprimento total.

Contorno da margem pós-orbital geralmente pronunciado e distintamente convexo. Flagelo antenular superior birreme e inferior simples, com tufo de cerdas finas na base antenular. Antena com base e ísquio fundidos, endopodido bem definido e escafoцерito (exopodito) bem desenvolvido. Largura do escafoцерito aproximadamente $\frac{1}{3}$ do comprimento. Epístoma dividido em dois lobos com carenas arredondadas e pronunciadas, as quais se encontram em posição oblíqua, apresentando variação no ângulo entre eles.

Carapaça lisa, com um espinho hepático, menor ou igual ao antenal e colocado em posição oblíqua atrás deste, em cada lado da carapaça. Quarto esternito torácico (T4) com o processo mediano arredondado e discreto em juvenis e fêmeas, pronunciado em machos maduros. Exopodido dos maxílpedes dos machos mais longos do lado do quelípodo maior.

Primeiro par de pereópodos alcançando o escafoцерito com a região distal do carpo. Artículos lisos, algumas cerdas presentes nas faces internas e externas. Segundo par de pereópodos muito desiguais, maior alcançando com parte distal do mero além do escafoцерito, menor alcançando o escafoцерito com metade do carpo. Quelípodo menor com dedos longos, maiores que o própodo. Dedos curvados com um hiato repleto de cerdas longas.

Quelípodo maior do segundo pereópodo com dedos variando desde metade do própodo até um pouco maior. Dedos curvados, hiato entre os dedos com cerdas longas e rígidas. Largura dos dedos variando entre $\frac{1}{7}$ a $\frac{2}{7}$ do comprimento. Margens internas dos dedos com um dente na parte proximal e outros menores formando uma fila. Largura do própodo variando de $\frac{1}{5}$ a $\frac{2}{3}$ do comprimento. Própodo comprimido e levemente inflado, margens superior e inferior convexas. Fileiras longitudinais de espínulos e espinhos, sendo menores e mais unidos na parte superior e inferior, maiores e mais espaçados na região mediana do própodo. Superfície lateral interna e externa do própodo com região aveludada, cerdas longas e rígidas. Margem superior (dorsal) da quela com uma fila de espinhos bem

pronunciados, maiores e fortes na região do própodo e menores no dedo fixo. Carpo igual ou levemente mais curto que o mero. Carpo e mero robustos, com uma fileira longitudinal de espínulos, menores e mais densos dorsalmente, maiores e mais separados ventralmente. Ísquio $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ do comprimento do mero.

Terceiro par de pereópodos alcançando a extremidade distal do escafocerito. Quarto e quinto pares raramente alcançando o fim do escafocerito. Pereópodos 3-5 com espinhos na margem posterior do própodo, espínulos ao longo da margem posterior do mero e de alguns pequenos espínulos esparsos na superfície externa do mero.

Abdome liso. Altura da pleura do segundo somito igual ou metade da largura. Pleura do quinto somito retangular; margem inferior à região próxima ao sexto somito aguda. Apêndice interno do segundo par de pleópodos mais longo que apêndice masculino. Quinto somito abdominal igual ou metade do comprimento do sexto e igual ou $\frac{2}{7}$ do telso. Sexto somito $\frac{2}{5}$ a $\frac{4}{5}$ do telso. Carena pré-anal no esclerito pré-uropodial geralmente pequena e arredondada ou pontiaguda, com ou sem cerdas no ápice.

Comprimento do telso $\frac{1}{9}$ a $\frac{1}{5}$ do comprimento total. Margem distal do telso de $\frac{1}{2}$ a $\frac{2}{3}$ da largura da margem proximal. Dois pares de espínulos na face dorsal do telso e dois pares de espinhos na margem distal. Espinhos internos ultrapassando a margem posterior do telso, com muitas cerdas entre eles. Exopodito do urópodo com uma cerda espiniforme mais longa que a projeção espiniforme da margem externa.

Dimorfismo: nas fêmeas a heteroquelia existe, porém a diferença é mais discreta, assim o quelípodo maior não é tão desenvolvido quanto nos machos. A ornamentação e a região aveludada são pouco pronunciadas, mas similares ao do macho. A largura da pleura (segundo somito abdominal) é maior que a dos machos.

Tamanho: o comprimento total varia entre os machos 16 a 90 mm e entre as fêmeas ovígeras 26 a 65 mm (Holthuis, 1952; Bowles *et al.*, 2000).

Coloração: o corpo é marrom-escuro ou verde-oliva, pode apresentar manchas amarelas e nos machos os pereópodos são negros e nas fêmeas são marrom-pálido.

Biologia: são exclusivamente de águas costeiras, uma vez que, necessitam de água salobra para desenvolvimento das larvas, sendo, portanto, anfídromos (Gamba & Rodriguez, 1987). Os ovos são pequenos e numerosos: 0,48 a 0,63 mm. Tempo de incubação é curto e possuem até oito fases larvais (Dugger & Dobkin, 1975).

Localidade-tipo: a localidade tipo é prolongada, descrita como costa brasileira (Wiegmann, 1836).

Distribuição: ocorrem em águas continentais costeiras do sul dos Estados Unidos, México, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e toda costa Atlântica do Brasil (Ortmann, 1897; Holthuis, 1952; Holthuis & Provenzano, 1970; Anderson & Filingame, 1980; Williams, 1984; Barros, 1995; Melo, 2003). Nos Estados Unidos, acredita-se que os animais foram introduzidos na

Flórida (Hedgpeth, 1949; Holthuis, 1952; Villalobos, 1969; Holthuis & Provenzano, 1970).

Nomenclatura: esta espécie foi nomeada originalmente como *Palaemon olfersii* (Wiegmann, 1836), sendo que o nome específico foi atribuído para homenagear o Sr. Olfers. Ignaz Franz Werner Maria von Olfers (August 30, 1793 – April 23, 1871) , um naturalista, historiador e diplomata alemão(Burwick, 1994), que viajou para o Brasil como diplomata. Ele enviou um exemplar de um camarão de água doce da costa brasileira para Arend Friedrich August Wiegmann (June 2, 1802 – January 15, 1841). Com o exemplar em mãos o Sr. Wiegmann, um importante zoólogo alemão, descreveu uma nova espécie.

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 1999), nomes patronímios, aqueles usados para homenagear pessoas, devem ser latinizados de acordo com o gênero, deste modo nomes masculinos devem terminar em "i" e nomes femininos em "ae". Embora, o nome do homenageado não termine com "i" e foi especificamente a uma pessoa, a espécie foi nomeada com dois "i" e continua sendo muito usado essa nomenclatura. Portanto, considerando o princípio de prioridade do artigo 23 do Código (ICZN, 1999) e o número de publicações dessa maneira, nós propomos manter a grafia original "olfersii" como nome válido do taxon, a fim de evitar futuras confusões nomenclaturais.

Observações: essa espécie tem ampla distribuição geográfica e apresenta grande variação morfológica. É frequentemente confundido com as outras espécies

pertencentes ao complexo *M. olfersii*. Sendo mais similar a *M. digueti* (Bouvier, 1895), que ocorre na costa pacífica do México ao Equador. Essas duas espécies são consideradas gêmeas, apresentam diferenças sutis, que muitas vezes podem ser interpretadas como variações intraespecíficas. É possível diferenciar essas espécies pela localidade e análise da divergência genética. Também é comumente confundido com *M. faustinum* (Saussure, 1857). Esta última espécie se diferencia de *M. olfersii* principalmente quanto a margem superior do própodo do quelípodo maior de machos adultos. *M. olfersii* tem uma fila de fortes espinhos em toda a margem superior, sendo iguais ou maiores na região mediana da margem superior. Um macho de *M. faustinum* (IVIC 1083) do Estado Lara, Venezuela é *M. olfersii*.

Figura 11: *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836), macho, vista lateral CCDB 3754. Escala = 0,6 cm.

4.2.2 Chave pictórica para as machos adultos das espécies do complexo *M. olfersii*

Essa chave tem como objetivo identificar indivíduos adultos das espécies do complexo *M. olfersii*. Todos os indivíduos apresentam o segundo par de pereópodos (quelípodos) muito desiguais em forma e tamanho, o maior é muito robusto. O rostro é reto, levemente inclinado para baixo, não alcança o fim do escafocerito e tem 11 a 16 dentes na margem superior, 3 a 6 deste estão na margem pós-orbital e 2 a 5 na inferior. Todos os passos da chave abaixo são baseados nos caracteres mais acentuados de machos desenvolvidos, portanto são referentes ao quelípodo maior.

1. Margem superior levemente convexa; dedo fixo do quelípodo maior com a região proximal (base) estreita; o comprimento do carpo varia de $\frac{4}{5}$ até maior que o mero (Figura 12).....2

Figura 12: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium digueti* (Bouvier, 1895). Seta indica a região proximal (base) do dedo fixo estreito.

- 1'. Margem superior praticamente reta; dedo fixo do quelípodo maior com a região proximal (base) larga, formato triangular; o comprimento do carpo é menor que o mero, seu comprimento varia desde a metade até $\frac{3}{4}$ do mero (Figura 13).....4

Figura 13: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium crenulatum* Holthuis, 1950. Seta indica a região proximal (base) do dedo fixo larga.

2. Margem superior da quela maior com espinhos menores ou sem espinhos na região mediana do própodo e maiores na base do dedo fixo e na região proximal do própodo; carpo levemente maior que mero (Figura 14).....*M. faustinum*

Figura 14: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium faustinum* (De Saussure, 1857).

- 2'. Margem superior da quela maior com espinhos menores ou iguais na base do dedo fixo e na região proximal do própodo.....3
3. própodo do quelípodo maior com uma densa região aveludada (pubescência) nas superfícies laterais (costa oriental das Américas) (Figura 15).....*M. olfersii*

Figura 15: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836).

- Própodo do quelípodo maior com uma região aveludada (pubescência) nas superfícies laterais (costa ocidental das Américas) (Figura 16).....*M. digueti*

Figura 16: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium digueti* (Bouvier, 1895).

4. Fortes espinhos na superfície externa do própodo do quelípodo maior, exceto na região submarginal superior, na qual há uma região proximal nua coberta com uma escassa pubescência (Figura 17).....*M. acanthochirus*

Figura 17: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium acanthochirus* Villalobos, 1967.

- 4'. Fortes espinhos na superfície externa do própodo do quelípodo maior, exceto na região central, na qual há uma região nua ou com poucos espinhos.....5
5. Uma fila de espinhos bem pronunciados na margem superior do própodo do quelípodo maior, que seguem por todo o dedo fixo, porém os espinhos são menores, margem externa com pouca pubescência (Figura 18).....*M. crenulatum*

Figura 18: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium crenulatum* Holthuis, 1950. Modificado de Valencia & Campos (2007).

- 5'. Duas filas de espinhos bem pronunciados na região superior do própodo do quelípodo maior, uma marginal e outra submarginal; margem externa com densa pubescência (Figura 19).....*M. hancocki*

Figura 19: Vista lateral do quelípodo maior de *Macrobrachium hancocki* Holthuis, 1950. Modificado de Valencia & Campos (2007).

4.2.3 Análise da variabilidade morfométrica em espécimes de *M. olfersii*

Registros biométricos de populações de *M. olfersii* disponíveis na literatura (Müller & Prazeres, 1992; Barros, 1995; Mossolin & Bueno, 2003), referem-se a estudos realizados em zonas geográficas restritas, sem uma abordagem comparativa ao longo de um gradiente latitudinal. As análises morfométricas (comprimento da carapaça CC, largura da pleura LP, comprimento do quelípodo maior CQ e do própodo quelar CP) (Figura 2) evidenciaram que o tamanho de machos e fêmeas é diferentes nas localidades amostradas, sendo machos, em média, maiores que as fêmeas em relação ao comprimento total e à maioria das estruturas observadas.

O perfil morfométrico (Figura 20) das diferentes populações analisadas não mostrou uma variação diretamente vinculada à latitude. Estes resultados podem estar relacionados com o número amostral, uma vez que, não foi possível examinar a mesma quantidade de espécimes de cada localidade (Tabela 2). Os métodos de

captura distintos e as configurações ambientais dos pontos de coleta também podem ter influenciado (Elmor *et al.*, 1981; Mossolin & Bueno, 2003), pois os machos possuem um comportamento territorialista e encontram-se no fundo sob rochas, sendo coletado mais facilmente com o uso de armadilhas, sendo que as fêmeas e juvenis preferem a região marginal, entre a vegetação, sendo assim capturados preferencialmente com o uso de peneiras. O período do ano em que foram capturados também pode ter interferido (Müller & Prazeres, 1992).

Tabela 2. Média dos valores mensurados e desvio padrão para comprimento da carapaça CC, largura da pleura LP, comprimento do quelípodo maior CQ e do própodo quelar CP de acordo com o gênero (s) machos (♂) e fêmeas (♀). Quantidade de indivíduos (n) de diferentes populações (Local.) de *Macrobrachium olfersii* de cada latitude geográfica (Lat.) analisada.

Local.	Lat	n	S	CC (mm)	LP (mm)	CQ (mm)	CP (mm)
Rio Grande do Norte	05°	7	♂	16,77±1,36	6,00±0,46	41,33±10,24	20,44±7,51
			♀	13,63±3,07	6,30±0,45	21,46±2,55	6,74±2,93
Bahia	14°	14	♂	13,77±2,45	5,01±0,61	38,47±12,70	16,93±7,11
			♀	11,88±1,75	4,79±0,08	24,13±3,09	9,10±2,04
Espírito Santo	20°	9	♂	11,15±3,05	4,73±1,12	29,72±13,25	13,18±8,01
			♀	7,66±1,69	3,98±0,99	17,89±4,61	6,59±1,97
Rio de Janeiro	23°	40	♂	17,23±4,70	6,32±1,45	41,63±15,74	18,65±8,31
			♀	14,94±2,74	7,60±1,21	32,14±6,44	13,22±4,02
São Paulo	23°/24°	55	♂	15,77±3,12	5,60±1,17	47,13±13,68	21,09±7,41
			♀	13,19±1,91	7,07±0,94	29,83± 4,04	12,06±2,22
Paraná	25°	6	♂	16,65±2,44	6,13±1,20	33,30±3,18	13,15±1,42
			♀	14,98±2,01	7,53±1,60	37,6± 13,37	15,89±8,10
Santa Catarina	27°	19	♂	13,86±5,46	5,93±1,60	37,40±21,01	16,57±11,65
			♀	12,18±2,71	6,61±1,30	24,58±10,76	9,31±5,57

Figura 20: Perfil morfométrico de populações de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) relacionado com a latitude. 1: Comprimento da carapaça de ♂s e ♀s em função da latitude; 2: Comprimento do quelípodo de ♂s e ♀s em função da latitude; 3: Largura da pleura de ♂s e ♀s em função da latitude; 4: Comprimento do própodo quelar de ♂s e ♀s em função da latitude.

As médias e o desvio padrão obtidos de espécimes do mesmo sexo e da mesma localidade foram analisados, evidenciando que o comprimento dos quelípodos e do própodo quelar dos machos são muito mais díspares (Figura 20: 2 e 4 e Tabela 2). Do mesmo modo, durante a revisão taxonômica observou-se grande variação entre os quelípodos de machos com comprimento total equivalente (Figura 21). Acredita-se que essa variação morfométrica pode estar relacionada com um sistema de hierarquia. A exemplo do que ocorre com *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) e *M. amazonicum* (Heller, 1862), constata-se a existência de níveis hierárquicos, com a presença de morfótipos nas populações naturais, os quais são muitas vezes erroneamente caracterizados como espécies distintas (Kuris *et al.*, 1987; Moraes-Riodades & Valenti, 2004). Os pequenos machos se transformam em grandes na ausência de um dominante (Barki *et al.*, 1991).

A variação entre os quelípodos também pode estar relacionada com a habilidade regenerativa dos crustáceos. A perda do quelípodo maior deve incitar uma mudança no menor, este adquire as características e proporções do quelípodo perdido durante a regeneração, como reportado para *Uca lactea* (De Haan, 1835) e *Alpheus heterochaelis* Say, 1818 (Yamaguchi, 1977; Young *et al.*, 1994, respectivamente). Desse modo, machos que apresentaram a heteroquelia menos evidente, podem encontrar-se no início desse processo regenerativo. Como observado em *M. olfersii* (Mossolin & Bueno, 2003), as outras espécies do complexo também são ambidestras, ou seja, não demonstraram preferência por um lado do

quelípodo maior. Esses fatos sugerem que essa característica não seja condicionada geneticamente e, possivelmente, seja devido a fatores ecológicos/sociais (Mariappan *et al.*, 2000; Silva & Paula, 2008). Para corroborar essas hipóteses há a necessidade de acompanhar todo o desenvolvimento da espécie em estudos laboratoriais, testando a influência da presença de outros machos, assim como realizado para *M. rosenbergii* e *M. amazonicum* (Kuris *et al.*, 1987; Moraes-Riodades & Valenti, 2004).

Figura 21: Representação das variações do segundo pereópodo de *Macrobrachium olfersii*, (Wiegmann, 1836). Vista lateral A: macho com 53,4 mm de comprimento total (CT); B: macho com CT=41,39 mm; C: macho com CT=52,22 m. Barra corresponde a 1cm.

4.3 Análise dos dados moleculares

4.3.1 Extração, Amplificação e Sequenciamento

A partir da extração do DNA das espécies *M. olfersii*, *M. faustinum*, *M. digueti*, *M. crenulatum*, *M. hancocki*, *M. acanthochirus* e *M. americanum* (Tabela 1) parte do gene 16S foi amplificado com sucesso em 22 espécimes de *M. olfersii*, 10 de *M. hancocki*, 8 de *M. crenulatum*, 4 de *M. faustinum*, 4 de *M. digueti* e 1 de *M.*

acanthochirus e 1 de *M. americanum*. Parte do gene COI foi amplificado com sucesso em 51 espécimes de *M. olfersii*, 10 de *M. hancocki*, 5 de *M. crenulatum*, 3 de *M. faustinum*, 4 de *M. digueti*, 1 de *M. acanthochirus* e 1 de *M. americanum*. Parte do gene H3 foi amplificado com sucesso em 18 espécimes de *M. olfersii*, 5 de *M. hancocki*, 6 de *M. crenulatum*, 1 de *M. faustinum*, 4 de *M. digueti*, 1 de *M. acanthochirus* e 1 de *M. americanum*. Parte do gene 18S foi amplificado com sucesso em 9 espécimes de *M. olfersii*, 1 de *M. hancocki*, 2 de *M. crenulatum*, 1 de *M. faustinum*, 3 de *M. digueti*, 1 de *M. acanthochirus* e 1 de *M. americanum*. Esses resultados foram confirmados com eletroforese em géis de agarose 1% (Figura 22).

Figura 22: Foto de uma eletroforese em gel de agarose 1% mostrando fragmentos amplificados de 16S rDNA mais de 500 pares de bases (pb) de acordo com o marcador de peso molecular de 1Kb de espécies pertencentes ao complexo *M. olfersii*.

Na Figura 22 visualiza-se a amplificação de aproximadamente 550 pares de bases (pb) do gene 16S rDNA de *M. olfersii* nas raia 1 a 3, de *M. faustinum* na raia 4, *M. crenulatum* na raia 5, *M. digueti* na raia 6, *M. hancocki* na raia 7 e 8 e *M. americanum* na raia 9. Observa-se na raia 10 o marcador de peso molecular “1Kb

DNA Ladder” e na raia 11 há uma reação sem DNA (branco), comprovando a ausência de contaminação.

Em alguns casos, mesmo com a realização da amplificação de determinado gene, o sequenciamento não foi satisfatório e a sequência descartada. Tal condição é observada no cromatograma da sequência (Figura 23), diferente da fita sequenciada adequadamente (Figura 24). Isto pode ter ocorrido por diferentes fatores, entre eles, falha do sequenciador – o capilar não ter sido direcionado corretamente ao poço com a solução, pela perda de DNA durante a purificação, excesso de sais e reagentes na preparação da reação de PCR ou nas manipulações subsequentes (Anderson & Gibbs, 1994).

Figura 23: Cromatograma do sequenciamento insatisfatório da fita COIf do gene COI mtDNA de *Macrobrachium olfersii*.

Figura 24: Cromatograma do sequenciamento bem sucedido da fita L2 do gene 16S rDNA de *Macrobrachium hancocki*.

Todas as sequências obtidas foram reconciliadas e confirmadas utilizando-se do software BioEdit. Estas foram comparadas, por meio de análises computacionais, com outras sequências depositadas em banco de dados genéticos utilizando-se o programa de pesquisa BLASTn, a fim de verificar a similaridade das sequências obtidas com as mesmas espécies ou espécies próximas. Todas as sequências obtidas foram corroboradas, pois apresentaram similaridade variando de 94 a 99% com as espécies pertencentes ao complexo que estavam disponíveis no banco de dados. Após a obtenção de todos os consensos de ambas as fitas das sequências, realizou-se o alinhamento no Clustal W com interface no BioEdit (Figura 25), utilizando os parâmetros Pairwise & Multiple alignment por “gap opening” 10 e “gap extending” 0.2 (Thompson *et al.*, 1994). Adicionou ao alinhamento sequências obtidas do GenBank, como sequência parcial do 16S de *Macrobrachium zariqueyi*, sequências parciais dos quatro genes de *Macrobrachium lar* e *Cryphiops*

caementarius. Um total de 476pb do gene 16S foram alinhados; 556pb do gene 18S; 328pb do gene H3 e 600pb do gene COI, sem gaps.

Figura 25: Visualização parcial do alinhamento das sequências do gene 16S das espécies *Macrobrachium olfersii*, *M. crenulatum*, *M. digueti* e *M. faustinum* no programa computacional BioEdit.

4.3.2 Distância genética e análise filogenética

Os valores das distâncias genéticas foram convertidos em porcentagens, comparados e compilados nas tabelas 3, 4, 5 e 6. Estes revelaram que os genes escolhidos são bons marcadores, uma vez que, foi possível separar as espécies (tabelas 3 e 4), comparar com as espécies externas adicionadas a análise (*M. americanum*, *M. lar*, *M. zaiqueyi* e *C. caementarius*) e visualizar a proximidade

genética entre *M. digueti*, *M. faustinum* e *M. olfersii* e entre *M. acanthochirus*, *M. crenulatum* e *M. hancocki* (tabelas 5 e 6), corroborando os dados obtidos pela morfologia.

Em todos os genes analisados, exceto H3 nDNA (Tabela 6), *M. acanthochirus* apresentou divergência genética menor para *M. hancocki* do que *M. digueti*. Este fato que contradiz a semelhança morfológica entre *M. acanthochirus* e *M. digueti*, os quais foram muitas vezes identificados incorretamente e sugeriu-se que o primeiro fosse sinônimo junior do segundo (Hernández *et al.*, 2007), contudo a análise de distância genética obtida, sustentou a identidade taxonômica de ambas as espécies.

A análise da distância entre as sequências de COI mtDNA (Tabela 3) proporcionou resultados confiáveis, pois mostraram que a divergência genética interespecífica é maior que a intra-específica, evidenciando satisfatoriamente as diferenças genéticas entre as espécies do grupo. Isto revela que esse gene foi um bom marcador para separar espécies crípticas e corrobora a importância deste para aplicações do DNA barcode (Silva *et al.*, 2011).

Também foram comparados esses valores com as distâncias das espécies externas. Entre *Cryphiops caementarius* e as espécies pertencentes ao grupo: variou entre 17,28–19,56%. Valores superiores aos encontrados entre as espécies do complexo (Tabela 3) e entre *M. americanum* e as espécies do grupo (variou entre

15,50–17,67%). E foi aproximadamente igual aos valores encontrados entre *M. lar* e as espécies do complexo (variou entre 16,65–20,20%).

Tabela 3: Divergência genética intra (negrito) e interespecífica encontrada para o gene COI mtDNA nos exemplares do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*), calculado pelo Paup, como distância p não corrigida.

	<i>M. acanthochirus</i>	<i>M. crenulatum</i>	<i>M. digueti</i>	<i>M. faustinum</i>	<i>M. hancocki</i>	<i>M. olfersii</i>
<i>M. acanthochirus</i>	0,00–0,67					
<i>M. crenulatum</i>	8,00–9,67	0,00–2,67				
<i>M. digueti</i>	14,83–16,00	14,33–6,00	0,83–4,17			
<i>M. faustinum</i>	13,00–13,17	11,67–13,04	14,50–16,17	0,00–0,17		
<i>M. hancocki</i>	5,35–6,33	6,52–8,20	13,67–15,07	12,31–13,00	0,00–0,67	
<i>M. olfersii</i>	13,17–14,17	12,50–14,54	9,33–11,17	11,67–12,33	13,80–14,83	0,00–1,67

Além da análise comparativa da divergência genética entre as espécies do complexo, também foram comparados os valores obtidos das sequências do gene 16S rDNA das espécies do complexo (Tabela 4) com as espécies externas. Entre *Cryphiops caementarius* e as espécies pertencentes ao grupo: *M. acanthochirus* variou entre 8,63–8,89%; *M. crenulatum* variou entre 8,42–8,80%; *M. digueti* variou entre 7,58–7,89%; *M. faustinum* variou entre 8,63–9,03%; *M. hancocki* variou entre 8,63–9,72%; *M. olfersii* variou entre 7,79–8,09%. Valores superiores aos

encontrados entre as espécies do complexo e, algumas vezes, inferiores ao encontrados para espécies do mesmo gênero, entre *M. lar* e as espécies do complexo variou entre 8,19–11,35%. Entre *M. americanum* e as espécies do grupo variou entre 7,77–9,66%.

A divergência genética encontrada entre as sequências do gene 16S rDNA das espécies do complexo *M. olfersii* com *M. zariqueyi* (sequência retirada do GenBank- AY37784) variou 1,80–1,83% para *M. acanthochirus*; 0,22–0,67% para *M. crenulatum*; 5,85–6,07% para *M. digueti*; 6,08–6,31% para *M. faustinum*; 1,58–2,04% para *M. hancocki* e 5,40–5,62% para *M. olfersii*, confirmando seu forte relacionamento com o grupo (Murphy & Austin, 2005), principalmente com *M. crenulatum*, que revela valores de divergência genética intraespecífica dentro desse intervalo de variação. Desse modo, é questionável a validade taxonômica de *M. zariqueyi*, porém ainda há a necessidade de analisar morfologicamente esse representante e confirmar sua identificação. Além disso, Holthuis (1949), durante a descrição dessa espécie, ressaltou a semelhança morfológica com *M. olfersii*, principalmente quanto ao segundo par de pereópodos. Verificou-se que os caracteres descritos para *M. zariqueyi* revelam a proximidade com *M. crenulatum*, como por exemplo, o mero do quelípodo maior é mais longo que o carpo, o própodo é comprimido, 1,5 vezes mais longo que largo, há uma fila de fortes espinhos na margem superior que seguem pelo dedo fixo (Holthuis, 1949: Fig 2b, p. 179). Por conseguinte, é fundamental revisar outros indivíduos dessa espécie e obter novas

sequências, principalmente para genes mais variáveis, e.g., COI mtDNA. Confirmada a identidade desta espécie é possível que ela seja outro integrante do complexo *M. olfersii*.

Tabela 4. Continua: Divergência genética intra (negrito) e interespecífica encontrada para o gene 16S rDNA nos exemplares do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*), calculado pelo Paup, como distância p não corrigida.

	<i>M. acanthochirus</i>	<i>M. crenulatum</i>	<i>M. digueti</i>	<i>M. faustinum</i>	<i>M. hancocki</i>	<i>M. olfersii</i>
<i>M. acanthochirus</i>	0,00–0,00					
<i>M. crenulatum</i>	1,89–2,49	0,00–0,63				
<i>M. digueti</i>	5,67–6,14	5,25–6,09	0,00–0,21			
<i>M. faustinum</i>	5,67–6,38	5,88–6,30	4,83–5,25	0,00–0,21		
<i>M. hancocki</i>	0,42–0,92	1,68–2,15	5,25–6,14	5,67–6,62	0,00–0,65	
<i>M. olfersii</i>	4,83–5,23	5,25–5,88	1,47–1,89	4,20–4,62	4,41–5,20	0,00–0,21

Os genes nucleares demonstraram ser completamente conservados ao nível intraespecífico, na maioria das espécies do grupo, exceto em *M. olfersii* e *M. crenulatum* (Tabelas 5 e 6). Embora não tenha sido utilizada a mesma quantidade de sequências para cada espécie, a suposição mais oportuna para esse resultado seria que *M. olfersii* e *M. crenulatum* possuem alta variabilidade genética para os

genes nucleares. Nos outros genes (COI mtDNA e 16S rDNA), *M. olfersii* revelou ser mais conservada que outras espécies e *M. crenulatum* manteve valores elevados.

Tabela 5: Divergência genética intra (negrito) e interespecífica encontrada para o gene 18S nDNA nos exemplares do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*), calculado pelo Paup, como distância p não corrigida.

	<i>M. acanthochirus</i>	<i>M. crenulatum</i>	<i>M. digueti</i>	<i>M. faustinum</i>	<i>M. hancocki</i>	<i>M. olfersii</i>
<i>M. acanthochirus</i>	0,00					
<i>M. crenulatum</i>	1,08–1,59	0,00–0,19				
<i>M. digueti</i>	1,44–1,74	1,80–2,34	0,00			
<i>M. faustinum</i>	1,62	1,98–2,31	0,43–0,54	0,00		
<i>M. hancocki</i>	0,90–1,14	0,54–0,79	1,62–2,04	1,80–2,03	0,00	
<i>M. olfersii</i>	1,44–1,62	1,80–2,36	0,00–0,18	0,54–0,72	1,62–2,17	0,00–0,20

Também foram comparados os valores da divergência genética do gene 18S nDNA das espécies do grupo com as espécies externas. Entre *C. caementarius* e as espécies pertencentes ao grupo variou entre 0,54–1,84%. Esses valores são inferiores aos encontrados entre algumas espécies do complexo *M. olfersii* (Tabela 5). Também são inferiores aos encontrados entre as espécies do complexo e entre outros *Macrobrachium*: *M. americanum* variou entre 7,54–8,79% e *M. lar* variou entre 3,09–4,84%.

Tabela 6: Divergência genética intra (negrito) e interespecífica encontrada para o gene H3 nDNA nos exemplares do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*), calculado pelo Paup, como distância p não corrigida.

	<i>M. acanthochirus</i>	<i>M. crenulatum</i>	<i>M. digueti</i>	<i>M. faustinum</i>	<i>M. hancocki</i>	<i>M. olfersii</i>
<i>M. acanthochirus</i>	0,00					
<i>M. crenulatum</i>	0,92–1,22	0,00–0,31				
<i>M. digueti</i>	2,44	2,74–3,05	0,00			
<i>M. faustinum</i>	1,83	2,13–2,44	0,61	0,00		
<i>M. hancocki</i>	0,31	0,61–0,92	2,74	2,13	0,00	
<i>M. olfersii</i>	2,44–3,05	2,44–3,05	0,00–0,61	0,61–1,22	2,44–2,74	0,00–0,61

Os valores da divergência genética do gene H3 nDNA das espécies do complexo *M. olfersii* com as espécies externas foram: entre *C. caementarius* e as espécies pertencentes ao grupo 2,13–3,66%; entre as espécies do complexo e *M. americanum* 3,96–5,79% e *M. lar* e as espécies do complexo 3,05–4,57%. Embora *M. americanum* seja encontrado em simpatria com *M. acanthochirus*, *M. digueti* e *M. hancocki* e confundido com estas quando em fase juvenil, apresentou maior divergência genética que *M. lar*.

Para todos os conjuntos de sequências dos genes analisados (16S, COI, H3 e 18S) o modelo de substituição selecionado no Modeltest pelo critério de informação Akaike (AIC) foi o “Transitional model” (TIM) variando a taxa de

heterogeneidade de distribuição gamma, a proporção de sítios invariáveis e a frequência de bases. Para as sequências do gene 16S rDNA assumiu-se os seguintes parâmetros: $A = 0,366$, $\text{freqC} = 0,241$, $\text{freqG} = 0,108$, $\text{freqT} = 0,283$; sítios variáveis seguiram uma distribuição gamma = 0,385 e proporção de sítios invariáveis $I = 0,573$.

Para as sequências do gene COI mtDNA assumiu-se os seguintes parâmetros: frequência de bases iguais, $A = 0,250$; $\text{freqC} = 0,250$; $\text{freqG} = 0,250$; $\text{freqT} = 0,250$; sítios variáveis seguiram uma distribuição gamma = 3,602 e a proporção de sítios invariáveis $I = 0,625$. Para as sequências do gene H3 nDNA os parâmetros assumidos foram: frequência de bases $A = 0,210$; $\text{freqC} = 0,320$; $\text{freqG} = 0,280$; $\text{freqT} = 0,188$; sítios variáveis seguiram uma distribuição gamma = 0,102. Para as sequências do gene 18S nDNA os seguintes parâmetros foram assumidos: frequência de bases iguais, sítios variáveis seguiram uma distribuição gamma = 3,120 e a proporção de sítios invariáveis $I = 0,314$.

As hipóteses filogenéticas geradas utilizaram o modelo selecionado para cada conjunto de dados moleculares para as estimativas em Máxima Verossimilhança e inferência Bayesiana (Posada & Buckley, 2004). As árvores geradas obtiveram as mesmas topologias nas duas estimativas e os ramos foram fortemente suportados com altos valores de bootstrap e probabilidades posteriores. Portanto foi apresentado apenas os Dendrogramas obtidos da inferência bayesiana, porém manteve-se junto com as probabilidades posteriores os valores de bootstrap

nos ramos suportados com mais de 50% das árvores filogenéticas (Figuras 26, 27, 28 e 29). Todas as árvores foram melhor enraizadas com *M. americanum*, como previsto pelo resultado da análise de distância genética, que mostrou maior divergência entre as espécies externas ao grupo e já revelado em outras análises filogenéticas prévias (Pileggi & Mantelatto, 2010).

Todas as filogenias propostas revelaram uma separação entre as espécies do complexo em dois clados: 1) *M. olfersii*, *M. digueti* e *faustinum*, e 2) *M. hancocki*, *M. crenulatum* e *M. acanthochirus*, fato suportado pela proximidade morfológica entre eles. Apenas na filogenia baseada no gene COI mtDNA o agrupamento foi diferente, no qual *M. faustinum* apareceu no segundo grupo (Figura 27). Embora ocorra uma alta proximidade entre as espécies, a divergência genética encontrada no nível interespecífico foi superior à divergência ao nível intraespecífico para todas as espécies do complexo *M. olfersii*, constatando assim a validade destas.

Figura 26: Dendrograma das espécies do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*) baseado em Inferência Bayesiana obtido pela análise de sequências parciais do gene 16S nDNA. Abreviações: veja Tabela 1. Números: probabilidades posteriores. Números com asterisco: valores de bootstrap baseado em Maximum Likelihood.

Os resultados obtidos pelas análises moleculares confirmaram o status taxonômico de *M. olfersii* como uma espécie válida ao longo de sua área de distribuição e sua íntima relação filogenética com as espécies do complexo. Esta é a abordagem mais profunda sobre a filogenia molecular para esta espécie. Análises dos genes mitocondriais mostraram que a variação da distância genética intraespecífica de *M. olfersii* é menor do que a interespecífica (Pileggi & Mantelatto, 2010). Este resultado não foi visualizado nos genes nucleares, no entanto, os

valores da distância genética e as filogenias propostas a partir dos genes 16S rDNA e COI mtDNA mostraram claramente a diferença entre as espécies mais próximas.

Figura 27: Dendrograma das espécies do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*) baseado em Inferência Bayesiana obtido pela análise de sequências parciais do gene COI mtDNA. Abreviações: veja Tabela 1. Números: probabilidades posteriores. Números com asterisco: valores de bootstrap baseado em Maximum Likelihood.

No clado de *M. olfersii* ilustrado em todas as análises filogenéticas não existe uma estruturação genética, *i.e.*, nenhum haplótipo é fixo em uma única população. Assim, a variabilidade morfológica deve ser resultado da plasticidade fenotípica. A partir das análises de 16S rDNA e COI mtDNA, observou-se que *M. olfersii* permanece em um clado único. No entanto, um cenário interessante foi

retratado pelos dados obtidos da análise dos genes nucleares com a espécie gêmea da costa do Pacífico *M. digueti* apareceu dentro do grupo *M. olfersii*.

Esta relação íntima estaria relacionada com a condição dessas espécies (*M. olfersii* e *M. digueti*) serem gêmeas e crípticas (Holthuis, 1952). É possível que eles tenham irradiado recentemente, após o fechamento do istmo do Panamá, da mesma forma que outros decapodas, como os camarões do gênero *Alpheus* e *Synalpheus* (Mathews, 2006). Ao contrário, há estudos que mostram uma separação mais antiga (pré-Ístmicos) por diferenças ambientais (Knowlton et al, 1993; Knowlton e Weigt, 1998), assim como Harrison *et al* (2004) mostrou que pinoterídeos do gênero *Austinixa* Heard & Manning, 1997, foram separados antes do fechamento do Istmo, pela antiga desembocadura do rio Amazonas, que provocava uma barreira ecológica devido a diferença de salinidade na mesma direção do Panamá. Conseqüentemente, alta proximidade entre espécies crípticas não pode ser revelada usando apenas genes conservados. Genes nucleares não foram variáveis suficientemente para mostrar diferenças entre essas espécies tão próximas (Figura 28 e 29).

Figura 28: Dendrograma das espécies do complexo *M. olfersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. olfersii*) baseado em Inferência Bayesiana obtido pela análise de sequências parciais do gene 18S nDNA. Abreviações: veja Tabela 1. Números: probabilidades posteriores. Números com asterisco: valores de bootstrap baseado em Maximum Likelihood.

Outro forte relacionamento retratado foi o clado que inclui *M. crenulatum* e *M. hancocki* como grupo irmão no dendrograma baseado nas sequências parciais de 18S nDNA (Figura 28). Estas espécies também foram descritas como gêmeas

(Holthuis, 1952), análises morfológicas comprovaram a alta similaridade morfológica. Porém nos outros dendrogramas obtidos, nota-se que *M. acanthochirus* revelou estar evolutivamente mais próximo de *M. hancocki*, do mesmo modo que os resultados provenientes da análise de distância genética, contradizendo a semelhança morfológica com *M. digueti*. No dendrograma baseado em sequências parciais de 16S rDNA (Figura 26), no qual foi adicionado representante de *M. zariqueyi*, este ficou mais próximo de *M. crenulatum* permitindo questionar a validade taxonômica de *M. zariqueyi*, como discutido anteriormente.

Considerando *M. zariqueyi* uma espécie válida, é possível inferir que ela teve uma recente separação de *M. crenulatum*, hipótese que poderia ser corroborada pela existência de estágios larvais planctônicos com tolerância à salinidade em espécies desse gênero (Choudhury, 1970; Gamba e Rodríguez, 1987) que poderiam ter dispersados a longas distâncias por correntes marítimas como já estudado para outros *Macrobrachium* (Jalihal *et al.*, 1993; de Bruyn *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007) e mantido o fluxo gênico. Possivelmente *M. crenulatum* e *M. hancocki* se separaram anteriormente ao fechamento do Istmo, porém há a necessidade de uma análise que inclua mais exemplares e utilizem outros grupos de espécies gêmeas para comparação (Mantelatto *et al.*, em preparação).

Outro resultado que chama a atenção foi a permanência de *M. olfersii* e *M. faustinum* em ramos diferentes, apesar dos fortes indícios de sinonímia, apresentados em estudos prévios (Rathbun, 1900; Sawaya, 1946; Holthuis, 1952;

Holthuis & Provenzano, 1970). Uma análise molecular anterior ilustrou topologia similar em filogenia baseada na otimização direta de dados de 16S mtDNA, onde essas espécies se encontram agrupadas (Pileggi & Mantelatto, 2010). Assim, os dados indicam a validade taxonômica de ambas as espécies.

Isto revela que a seqüência de *M. faustinum* (IVIC 183) obtida do GenBank, constitui-se de um erro de identificação, sendo esta de *M. olfersii*. O presente resultado é suportado pela distribuição geográfica destas espécies. *M. faustinum* ocorre somente nas Antilhas e na Flórida (Holthuis, 1952; Chace & Hobbs, 1969; Dugger & Dobkin, 1975), no entanto, o espécime já referido era de Curarigua, Venezuela. Por sua vez, *M. olfersii* não ocorre nas Antilhas, e uma explicação para essa não ocorrência, é a possibilidade dele não vencer a competição com uma espécie estreitamente relacionada como *M. faustinum*, a qual é abundante nesses locais (Dugger & Dobkin, 1975). Desse modo, não é possível ocorrer fluxo gênico entre elas.

Figura 29: Dendrograma das espécies do complexo *M. offersii* (*M. acanthochirus*, *M. crenulatum*, *M. digueti*, *M. faustinum*, *M. hancocki* e *M. offersii*) baseado em Inferência Bayesiana obtido pela análise de sequências parciais do gene H3 nDNA. Abreviações: veja Tabela 1. Números: probabilidades posteriores. Números com asterisco: valores de bootstrap baseado em Maximum Likelihood.

A baixa resolução de alguns nós nos dendrogramas, reflete a impossibilidade de acessar as distâncias entre alguns espécimes, e.g., *M. offersii* (BR-BA) com *M. offersii* (CR-AT), devido à alta similaridade genética, o que permite inferir a existência de um fluxo genético contínuo para as populações de *M. offersii* ao longo de sua distribuição geográfica. Outro fator que influenciou na resolução entre algumas espécies, possivelmente foi a ausência de alguns exemplares de diferentes localidades e de outros táxons, e. g., *Cryphiops caementarius* com *M. acanthochirus* (Figura 28). *Cryphiops caementarius* manteve-se mais interno que *M.*

americanum, confirmando a alta afinidade com essas espécies devido seu desenvolvimento larval ser estendido, similar ao grupo estudado, corroborando o fato de *Macrobrachium* ser um grupo parafilético (Murphy & Austin, 2003; 2004; Pileggi & Mantelatto, 2010).

Em todos dendrogramas os resultados obtidos foram, relativamente, similares, apesar destes genes terem diferentes taxas de evolução, sendo os nucleares mais conservado e os outros mais variáveis (Crandall *et al.*, 2000; Whiting, 2001). Assim, os marcadores proporcionaram uma boa resolução tanto entre espécies como entre táxons superiores (Murphy & Austin, 2004; Pileggi & Mantelatto, 2010; Ashelby *et al.*, 2012). Embora os genes nucleares sejam indicados para análises em táxons mais abrangentes (Crandall *et al.*, 2000; Ashelby *et al.*, 2012), foram informativos à nível específico também.

4.3.3 Estrutura genética da população de *Macrobrachium olfersii*

Baseado nos fragmentos do gene COI de 40 sequências obtidas de espécimes de *M. olfersii* de 10 localidades diferentes, reconheceu-se 28 haplótipos e uma diversidade haplotípica de 0,94. Entre esses haplótipos, 25 (89,28%) representaram um único indivíduo cada e 3 (10,72%) foram polimórficos. A frequência de haplótipos em diferentes localidades foi heterogênea (Tabela 7). Os haplótipos compartilhados foram o primeiro (H1), o terceiro (H3) e o quarto (H4). O primeiro haplótipo (H1) é compartilhado entre regiões brasileiras e caribenhas,

sendo: três indivíduos do Paraná (BR-PR), dois do litoral norte de São Paulo (BR-SPn), um do Espírito Santo (BR-ES), um de Santa Catarina (BR-SC), um da Costa Rica (CR-AT) e um do Panamá (PN-AT). O H3 é compartilhado entre um indivíduo de BR-SPn e um da Costa Rica (CR-AT). O H4 é compartilhado entre um indivíduo de BR-SC, um do litoral sul de São Paulo (BR-SPs), um da Bahia (BR-BA) e outro do Rio de Janeiro (BR-RJ).

Redes de haplótipos foram construídas baseadas no método estatístico de parcimônia (dado não apresentado) e no método Median-Joining (Figura 30). Os dois métodos exibiram redes com a distribuição dos haplótipos semelhante. Análise da variação molecular (AMOVA) indicou que dentro das populações de *M. offersii* há uma alta porcentagem de variação (98,25% sem estrutura hierárquica e 98,18% com estrutura hierárquica), enquanto a variação entre cada população foi baixa (1,75% e 1,69% sem e com estrutura hierárquica, respectivamente). Quando a população foi estruturada entre dois grupos Brasil e Caribe a variação entre os grupos foi muito baixa (0,13%). Entretanto os valores obtidos na AMOVA baseadas na frequência de haplótipos com e sem estrutura hierárquica não revelaram significativos ($p > 0,05$) para os resultados pelo procedimento de permutação não paramétrico (Tabela 8). Esse resultado era esperado, uma vez que nos Dendrogramas não houve uma separação entre os espécimes de cada grupo e de diferentes localidades.

Tabela 7. Distribuição dos haplótipos encontrados em *Macrobrachium offersii* de diferentes localidades (as abreviações estão descritas na tabela 1). N: Número de

indivíduos analisados em cada população. DH: Diversidade haplotípica. DS: Desvio padrão.

Localidade	Haplótipos	DH ± DS
CR-AT	H1,H4, H11, H12, H13, H14	1.00 ± 0.09
PN-AT	H1, H15, H25	1.00 ± 0.27
VZ-NT	H10, H28	1.00 ± 0.50
BR-BA	H3, H8, H24	1.00 ± 0.27
BR-ES	H1, H7, H23	1.00 ± 0.27
BR-RJ	H3, H5, H22	1.00 ± 0.27
BR-SPn	H1, H4, H21, H26, H27	0.93 ± 0.12
BR-SPs	H3, H9, H19, H20	1.00 ± 0.17
BR-PR	H1, H18	0.50 ± 0.26
BR-SC	H1, H2, H3, H6, H16, H17	1.00 ± 0.09

Tabela 8. Resultados das análises de variância molecular (AMOVA) realizadas com espécimes de *Macrobrachium olfersii* provenientes de diversas populações.

Estruturação	Fonte de variação	%	Índices de fixação	p
Ausente	Entre populações	1,75	FST: 0,017	0,235
	Dentro das populações	98,25		
Caribe (Costa Rica, Panamá e Venezuela) Vs. Brasil (Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina)	Entre grupos	0,13	FCT: 0,001	0,356
	Entre populações	1,69	FSC:0,016	0,235
	Dentro das populações	98,18	FST: 0,018	0,256

Figura 30: Rede de Haplótipos baseada em análises de Median-Joining, com a indicação da distribuição de cada de cada haplótipo encontrado (H) em *Macrobrachium olfersii* de diferentes populações. A identificação de cada haplótipo está abaixo de cada círculo. Cada pequeno traço representa um passo mutacional. As linhas entre os círculos indicam uma substituição simples entre diferentes haplótipos (o pequeno símbolo representa a perda de um haplótipo, inferidos por duas sequências que diferem em duas substituições), e não são proporcionais a distância genética entre haplótipos. O padrão das tramas revela a origem e a frequência de haplótipos compartilhados, indicado na legenda a direita. As abreviações estão descritas na tabela 1.

Os resultados obtidos pelas redes de haplótipo mostram que a condição de *M. olfersii* ser uma única espécie e não apresentar um clado estruturado é apoiado

pelo compartilhamento de haplótipos (polimórficos). Isto revela a existência um fluxo gênico contínuo entre populações brasileiras e caribenhas. A variabilidade molecular não foi significativa entre os grupos e entre as populações confirmando novamente a ocorrência de fluxo gênico. Consequentemente, a possibilidade de ocorrer diferenciação em nível genético é reduzida (Slatkin, 1987). Fluxo gênico é plausível, uma vez que as larvas de *M. olfersii* poderiam ser transportadas dentro de plantas aquáticas ou associadas a aquicultura de outras espécies, de modo similar tinha sido postulado sobre a introdução de *M. olfersii* na Flórida, Estados Unidos (Anderson & Filingame, 1980).

Outra explicação seria que as espécies teriam usado correntes favoráveis para atingir Flórida. Este argumento é sugerido pelo fato de que exemplares de *M. olfersii* foram encontrados ao longo da costa e na maioria dos rios do leste da Flórida (Dugger & Dobkin, 1975). Seguindo esta idéia, há alta dispersão larval em espécies de *Macrobrachium* (Holthuis & Provenzano, 1970; Anderson & Filingame, 1980; Gamba, 1982). Correntes marítimas poderiam levar as larvas de *M. olfersii* para longas distâncias, do sul do Brasil ao Caribe ou sentido contrário, permitindo um fluxo gênico contínuo. Larvas de *Macrobrachium* podem suportar altas concentrações (acima de 30 unidades de salinidade) de água salgada (Choudhury, 1970; Gamba e Rodríguez, 1987). Ressalta-se que exemplares de *Macrobrachium olfersii* já haviam sido encontrados no habitat estuarino natural em valores de salinidade até 36% (Gamba, 1982). Esta informação indica que a espécie tem uma

tolerância a salinidade maior do que foi sugerido por estudos anteriores realizados com *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) em laboratório (Choudhury, 1970) e pode sobreviver em água do mar por grandes períodos (Dugger & Dobkin, 1975). Assim, o processo de invasão da água doce parece estar ainda ocorrendo em algumas espécies do gênero *Macrobrachium* (Jalilhall *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2007; Ashelby *et al.*, 2012). Paralelamente em *M. olfersii*, existem estudos sobre funcionamento da Na^+/K^+ -ATPase que demonstraram que a funcionalidade desta enzima é reduzida em camarões de água doce, porém respondem à presença de Na^+ em ambientes salinos (McNamara & Torre, 1999).

Conclusão

5. CONCLUSÃO

As diferenças morfológicas encontradas entre as espécies do complexo *M. offersii* não são suficientes para inferir o relacionamento evolutivo entre elas, devido a presença de caracteres plásticos e variáveis intraespecificamente e outros conservados interespecificamente. Porém, todas as identidades foram suportadas com a análise molecular baseada em sequências parciais do gene COI mtDNA. As filogenias baseadas nos genes 16S, 18S e H3 revelaram uma separação entre as espécies do complexo em dois clados: 1) *M. offersii*, *M. digueti* e *faustinum*, e 2) *M. hancocki*, *M. crenulatum* e *M. acanthochirus*, fato suportado pela proximidade morfológica entre eles.

As análises molecular complementar baseada nos quatro marcadores (COI, 16S, 18S e H3) permitiram inferir a respeito da separação de alguns integrantes do grupo. Os genes COI e 16S mtDNA apresentaram um amplo sinal filogenético permitindo uma boa resolução dos dendrogramas e, os genes H3 e 18S nDNA mostraram a recente divergência entre algumas espécies. Foi demonstrado através da análise baseada no gene 16S rDNA que estas espécies são evolutivamente relacionadas com *M. zariqueyi*, a qual compartilha características morfológicas com o grupo. Acredita-se que ela deve pertencer ao complexo *M. offersii*, porém há a necessidade de revisar a taxonomia e investigar outras sequências desta espécie.

Apesar da alta variabilidade morfológica e ampla distribuição geográfica, *Macrobrachium offersii* apresentou divergência genética intraespecífica menor do

que interespecífica. A análise filogenética baseada nas sequências de COI mtDNA e 16S rDNA revelou que o *M. offersii* permanece em um único clado, o qual não é estruturado. Este resultado confirma a existência de um fluxo genético contínuo entre populações de *M. offersii*, evidenciado pela rede de haplótipos e suporta o status desta como uma única espécie.

Além disso, a análise de sequências dos genes 18S e H3 nDNA evidenciaram que *M. offersii* apresenta uma divergência relativamente recente com *M. digueti*, que ocorre na vertente do Pacífico das Américas e apresenta enorme semelhança morfológica. Os marcadores mitocondriais confirmaram que estas espécies são válidas, consideradas gêmeas e crípticas.

Macrobrachium faustinum permaneceu em clado separado de *M. offersii*, fato corroborado pela variação morfológica, principalmente com relação aos dedos, os quais são bem longos e curvados, o própodo é inflado, os espinhos na margem superior do própodo são maiores na região distal e proximal e menores ou ausentes na região mediana da margem e há uma pubescência ampla em *M. faustinum*. Outro fato que corroborou a separação das espécies é a distribuição alopátrica destas espécies.

Finalmente, as análises complementares entre os genes mitocondriais e nucleares permitiram inferir parte da história evolutiva deste complexo, mostrando a existência de uma verdadeira e recente divergência genética entre elas, evidenciado com as análises morfológicas, que demonstram que há variações interespecíficas

sutis que impedem de serem distinguidas facilmente. Assim, com todos os resultados obtidos é possível concluir a forte proximidade filogenética entre as espécies do complexo *M. olfersii* e confirmar as identidades taxonômicas de cada uma delas, descartando a existência de sinonímias.

Referências

6 – REFERÊNCIAS

- Abele, L.G.; W. Kim (1989) The decapod crustaceans of the Panama Canal. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 482: 1-50.
- Ammar, D.; Müller, Y.M.R.; E.M. Nazari (2001) Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) coletados na ilha de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, 18(2): 529-537.
- Anderson, G.; J.A. Filingame (1980) The occurrence of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) and *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) in Southern Mississippi, U.S.A. (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 39(1): 90-94.
- Anger, K.; L. Hayd (2009) From lecithotrophy to planktotrophy: ontogeny of larval feeding in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquatic Biology*, 7:19-30.
- Ashelby, C.W.; Page, T.J.; De Grave, S.; Hughes, J.M.; M.L. Johnson (2012) Regional scale speciation reveals multiple invasions of freshwater in Palaemoninae (decapod). *Zoological Scripta*, 41(3): 293-306.
- Baker, N.; Bruyn, M.; B. Mather (2008) Patterns of molecular diversity in wild stocks of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) from northern Australia and Papua New Guinea: impacts of Plio-Pleistocene landscape evolution. *Freshwater Biology*, 53(8): 1592-1605.
- Bandelt, H.J.; Foster, P.; A. Rohl (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Barki, A. Harpaz, S.; I. Karplus (1997) Contradictory asymmetries in body and weapon size, and assessment in fighting male prawns *Macrobrachium rosenbergii*. *Aggressive Behavior*, 23: 81-91.
- Barki, A.; Karplus, I.; M. Goren (1991) The agonistic behavior of the three male morphotypes of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Palaemonidae). *Behavior*, 116(3-4): 252-277.
- Barki, A.; Karplus, I.; M. Goren (1992) Effects of size and morphotype on dominance hierarchies and resource competition in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Animal Behavior*, 44: 547-555.
- Barros, M.P. (1995). Dados biológicos sobre *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda: Palaemonidae) da Praia da Vigia, Garopava, S.C., Brasil. *Biociências*, 3(2): 239-252.

- Bauer, R.T.; J. Delahoussaye (2008) Life history migrations of the amphidromous river shrimp *Macrobrachium ohione* from a continental large river system. *Journal of Crustacean Biology*, 28(4): 622-632.
- BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.shtml>).
- Bond-Buckup, G.; L. Buckup (1989) Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia* 49(4): 883-896.
- Bouvier, E.L. (1895) Sur les Palemons recueillis dans les eaux douces de la Basse-Californie par M. Digue. *Bulletin du Museum d'Histoire Naturelle (Paris)*, 1:159-162, 2 figures.
- Bowles, D.E.; Aziz, K.; C.L. Knight (2000) *Macrobrachium* (Decapoda: Caridae: Palaemonidae) in the contiguous United States: A review of the species and assessment of threats to their survival. *Journal of Crustacean Biology*, 20(1): 158-171.
- Bracken, H.D.; De Grave, S.; D.L. Felder (2009a) Chapter 14. Phylogeny of the Infraorder Caridea based on mitochondrial and nuclear genes (Crustacea: Decapoda). In: Martin, J.W., Crandall, K.A. & Felder, D.L. (Eds), *Crustacean Issues: Decapod Crustacean Phylogenetics*. Boca Raton, Flórida: Taylor & Francis/ CRC Press pp. 281-305.
- Bracken, H.D.; Toon, A.; Felder, D.L.; Martin, J.W.; Finley, M.; Rasmussen, J.; Palero, F.; K.A. Crandall (2009b) The decapod tree of life: compiling the data and moving toward a consensus of decapods evolution. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 67(1): 99-116.
- Bracken, H.D.; De Grave, S.; Toon, A.; Felder, D.L.; K.A. Crandall (2010) Phylogenetic position, systematic status, and divergence time of the Procarididea (Crustacea: Decapoda) *Zoologica Scripta*, 39: 198–212.
- Bruyn, M. de; Wilson, J.A.; B. Mather (2004) Huxley's line demarcates extensive genetic divergence between eastern and western forms of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(1): 251-257.
- Burwick, R. (1994) From aesthetic teas to the world of noble reformers: the Berlin salonière (1780 to 1848). *Pacific Coast Philology*, 29(2): 129-142.
- Cai, Y.; Naiyanetr, P.; P.K.L. Ng (2004) The freshwater palaemonid prawns (Crustacea: Decapoda: Caridea) of Myanmar. *Hydrobiologia*, 487: 59-83.

- Camacho, M.E.; Alvarez, F.; J.L. Villalobos (1997) Palaemonidae (camarones de río, langostinos) *In*: E.G. Soriano; R. Dirzo & R.C. Vogt (Eds). Historia Natural de los Tuxtlas. México, UNAM, Conabio 647 pp.
- Chace, F.A.; H.H.Jr. Hobbs (1969) The freshwater and terrestrial decapod crustaceans of West Indies with special reference to Dominica. Bulletin of the United State National Museum, 292: 1-258.
- Chen, R.T.; Tsai, C.F.; W.N. Tzeng (2009) Freshwater prawns (*Macrobrachium* Bate, 1868) of Taiwan with special references to their biogeographical origins and dispersion routes. Journal of Crustacean Biology, 29(2): 232-244.
- Choudhury, P.C. (1970) Complete larval development of the Palaemonidae shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) reared in the laboratory. Crustaceana, 18(2): 113- 132.
- Clement, M.; Posada, D.; K.A. Crandall (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology, 9(10): 1657-1660.
- Colgar, D.J.; McLauchlan, A.; Wilson, G.D.F.; Livingston, S.P.; Edgecombe, G.D.; Macaranas, J.; Cassis G.; M.R. Gray (1998) Histone H3 and U2 nRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. Australian Journal of Zoology, 46: 419-437.
- Crandall, K.A.; J.E. Buhay (2008) Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae – Decapoda) in freshwater. Hydrobiologia, 595(1): 295-301.
- Crandall, K.A.; J.F. Fitzpatrick Jr. (1996) Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. Systematic Biology, 45: 1-26.
- Crandall, K.A.; Fetzner, J.W.Jr.; Jara, C.G.; L. Buckup (2000) On the phylogenetic positioning of the south American freshwater crayfish genera (Decapoda: Parastacidae). Journal of Crustacean Biology, 20(3): 530-540.
- De Grave, S.; C.H.J.M. Fransen (2011) Carideorum catalogus: the recent species of dendrobrachiate, stenopodidean, procaridean and caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). Zoologische Mededlingen, 85(9): 195-589.
- Dugger, D.M.; S. Dobkin (1975) A contribution to knowledge of the larval development of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda: Palaemonidae). Crustaceana, 29(1): 1-30.
- Elmor, M.R.D.; Lobão, V.L. & W.C. Valenti (1981) Consumo de oxigênio por *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) como subsídio ao seu transporte e cultivo. Boletim do Instituto de Pesca, 8: 65-78.

- Excoffier, L.; Laval, G.; S. Scheneider (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; J.M. Quattro (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 12: 435-456.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783-791.
- Gamba, A.L. (1982) *Macrobrachium*: its presence in estuaries of the northern Venezuelan coast (Decapoda, Palaemonidae). *Caribbean Journal of Science*, 18: 1-4.
- Gamba, A.L.; G. Rodríguez (1987) Migratory behavior of post larval white, *Penaeus schmitti*, and river shrimps, *Macrobrachium olfersi* and *Macrobrachium acanthurus*, in the zone of overlap in a tropical lagoon. *Bulletin of Marine Science*, 40(3): 454-463.
- García-Dávila, C.R.; Magalhães, C.; J.C.H. Guerrero (2005) Morphometric variability in populations of *Palaemonetes* spp. (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) from the Peruvian and Brazilian Amazon Basin. *Iheringia, Série Zoologia*, 95(3): 327-334.
- Genofre, G.C.; V.L. Lobão (1978) *Macrobrachium holthuisi* sp. n., a new species of shrimp (Decapoda, Macrura). *Crustaceana*, 35: 273-276.
- Gomes Corrêa, M.M. (1997) *Palaemonideos do Brasil* (Crustacea, Decapoda, Natantia). Universidade Federal do Rio de Janeiro (Dissertação de Mestrado), 135pp.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Harrison, J.S. (2004) Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16s and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinia* (Decapoda: Pinnotheridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 743-754.
- Hedgpeth, J.W. (1949) The north American species of *Macrobrachium* (river shrimp). *Journal Science*, 1(3): 28-38.

- Heller, C. (1862) Beiträge zur näheren Kenntnis der Macrouren. Sitzungsberichte der mathematisch-naturwissenschaftlichen Classe der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien, 389-426.
- Hernandez, L.; Murugan, G.; Campos, G.R.; A.M.M. Martinez (2007) Freshwater shrimp of the genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae) from the baja California península, Mexico. Journal of Crustacean Biology, 27(2): 351-369.
- Hernandez, L.R.L. (2009) Camarones dulceacuícolas (Decapoda: Palaemonidae) de la cuenca del río Grande de Térraba, Costa Rica. Proyecto Hidroeléctrico El Diquís, ICE Unidad de Gestión Ambiental - Area Biótica, pp.39.
- Holthuis, L.B. (1949) On some species of *Macrobrachium* (Crustacea Decapoda) from West Africa. Revista Española de Entomología, 25(3-4): 175-185.
- Holthuis, L.B. (1950a) Preliminary Descriptions of Twelve New Species of Palaemonid Prawns from American Waters (Crustacea: Decapoda). Proceedings of the Koninklijk Nederlandse Akademie van Wetenschappen, series C, 53:93-99.
- Holthuis, L.B. (1950b) Subfamily Palaemoninae. In The Palaemonidae Collected by the Siboga and Snellius Expeditions, with Remarks on Other Species, Part 1. In The Decapoda of the Siboga Expedition, Part X. Siboga-Expeditie, 39^a 9: 268 pages, 52 figures.
- Holthuis, L.B. (1952) A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas II. The subfamilies Palaemonidae. Occasional Paper, Allan Hancock Foundation Publications, 12: 1-396.
- Holthuis, L.B.; A.J. Provenzano (1970) New distribution records for species of *Macrobrachium* with notes on the distribution of the genus in Florida (Decapoda, Palaemonidae). Crustaceana, 19(2): 211-213.
- Huelsensbeck, J.P.; F. Ronquist (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics, 17: 754-755.
- Jalihal, D.R.; Sankolli, K.N.; S. Shenoy (1993) Evolution of larval development and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (decapoda, Palaemonidae). Crustaceana, 19: 211-213.
- Knowlton, N.; L.A. Weigt (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences, 265: 2257-2263.

- Knowlton, N.; Weigt, L.A.; Solórzano, L.A.; Mills, D.K.; E. Bermingham (1993) Divergence in Proteins, Mitochondrial DNA, and Reproductive Compatibility Across the Isthmus of Panama. *Science*, 260: 1629-1632.
- Kuris, A.M.; Ra'Anan, Z.; Sagi, A.; D. Cohen (1987) Morphotypic differentiation of male Malaysian giant prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Crustacean Biology*, 7(2): 219-237.
- Lima, A.G.; McNamara, J.C.; W.R. Terra (1997) Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na⁺/K⁺ -ATPase activities during acclimation to saline media in freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 215(1): 81-91.
- Liu, M.; Cai, Y.; C. Tzeng (2007) Molecular Systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences with emphasis on east Asian species. *Zoological Studies*, 46(3): 272-289.
- Lobão, V.L., Melo, G.A.S.; W. Fernandes (1986) Descrição de uma nova espécie do gênero *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) da região sul de São Paulo. *Congresso Brasileiro de Zoologia*, 13, Cuiabá. Resumos 50.
- Mantelatto, F.L.; Robles, R.; D.L. Felder (2007) Molecular phylogeny of the western Atlântico species of the genus *Portunus* (Crustacea: Brachyura, Portunidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 150(1): 211-220.
- Mantelatto, F.L.; Pardo, L.M.; Pileggi, L.G.; D.L. Felder (2009a) Taxonomic re-examination of the hermit crab species *Pagurus forceps* and *Pagurus comptus* (Decapoda, Paguridae) by molecular analysis. *Zootaxa*, 2133: 20-32.
- Mantelatto, F.L.; Robles, R.; Biagi, R.; D.L. Felder (2006) Taxonomic and distributional status based on molecular data for hermit crab genera *Loxopagurus* Forest, 1964, and *Isocheles* Stimpson, 1858 (Decapoda, Anomura, Diogenidae). *Zoosystema*, 28(2): 495-506.
- Mantelatto, F.L.; Robles, R.; Schubart, C.D.; D.L. Felder (2009b) Chapter 29. Molecular phylogeny of the genus *Cronius* Stimpson 1860, with reassignment of *C. tumidulus* and several American species of *Portunus* to the genus *Achelous* de Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae). In: Martin, J.W., Crandall, K.A. & Felder, D.L. (Eds), *Crustacean Issues: Decapod Crustacean Phylogenetics*. Boca Raton, Flórida: Taylor & Francis/ CRC Press pp. 567-579.
- Mariappan, P.; Balasundaram, C.; B.Schmitz (2000) Decapod crustacean chelipeds: an over review. *Journal of Biosciences*, 25(3): 301-313.

- Mathews, L.M. (2006) Cryptic biodiversity and phylogeographical patterns in a snapping shrimp species complex. *Molecular Ecology*, 15: 4049-4063.
- Melo, G.A.S.; Lobão, V.L.; W.M. Fernandes (1988) Redescritção de *Macrobrachium birai* Lobão, Melo & Fernandes e *Macrobrachium petronoi* Melo, Lobão & Fernandes (Crustacea, Decapoda), Palaemonídeos da região Sul de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 15 (1): 89-97.
- McNamara, J.C.; Moreira, G.S.; P. Moreira (1985) Thermal effects on metabolism in selected shrimps *Macrobrachium olfersii* and *Macrobrachium heterochirus* (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 80A (2): 187-190.
- McNamara, J.C.; A.H. Torres (1999) Ultracytochemical location of Na^+/K^+ - ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Zoology*, 284: 617-628.
- McNamara, J.C.; Salomão, L.C.; E.A. Ribeiro (1990) The effect of eyestalk ablation on hemolymph osmotic and ionic concentrations during acute salinity exposure in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). *Hydrobiology*, 199(3): 193-199.
- Melo, G.A.S. (2003) Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. In: Melo, G.A.S. *Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil*. Editora Loyola, p. 289-415.
- Milne Edwards, H. (1837) Histoire naturelle des crustacés, comprenant l'anatomie, la physiologie et la classification de ces animaux. Librairie encyclopédique de Roret, 2:1-532.
- Moraes-Riodes, M.C.; W.C. Valenti (2004) Morphotypes in male Amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture*, 236(1-4): 297-307.
- Morrison, C.L.; Ríos, R.; J.E. Duffy (2004) Phylogenetic evidence for an ancient rapid radiation of Caribbean sponge-dwelling snapping shrimps (*Synalpheus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 563-581.
- Mossolin, E.M.; S.L.S. Bueno (2002) Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. *Journal of Crustacean Biology*, 22(2): 367-376.
- Mossolin, E.M.; S.L.S. Bueno (2003) Relative growth of the second pereopod in *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 76(3): 363-376.

- Müller, F. (1880) *Palaemon potiuna*. Ein Beispiel abgekürzter Verwandlung. Zoologischer Anzeiger, 3: 152-157.
- Müller, Y.M.R.; A.C. Prazeres (1992) Influência da salinidade e temperatura da água sobre a captura de *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) coletados no canal da lagoa do Peri, Florianópolis-SC. Acta Limnologica Brasiliense, 4(1): 175-183.
- Müller, Y.M.R.; Nazari, E.M.; Ammar, D.; Ferreira, E.C.; Beltrame, I.T.; C. Pacheco (1999) Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da Bacia Hidrográfica de Ratoles, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, 16(3): 629-636.
- Müller, Y.M.R.; Nazari, E.M.; Simões-Costa, M.S. (2003) Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). Journal of Crustacean Biology, 23(4): 869-875.
- Muñoz, J.E.G.; Rodriguez, A.; Raso, J.E.G.; J.A. Cuesta (2009) Genetic evidence for cryptic speciation in the freshwater shrimp genus *Atyaephyra* de Brito Capello (Crustacea: Decapoda: Atyidae). Zootaxa, 2025: 32-42.
- Murphy, N.P.; C.M. Austin (2002) A preliminary study of 16S rRNA sequence variation in Australian *Macrobrachium* shrimps (Palaemonidae: Decapoda) reveals inconsistencies in their current classification. Invertebrates Systematics, 16(5): 697- 701.
- Murphy, N.P.; C.M. Austin (2004) Multiple origins of the endemic Australian *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) based on 16S rRNA mitochondrial sequences. Australian Journal of Zoology, 52(5): 549-559.
- Murphy, N.P.; Short, J.W.; C.M. Austin (2004) Re-examination of the *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) species-complex: molecular evidence for a single species. Invertebrate Systematics, 18: 227-232.
- Murphy, N.P.; C.M. Austin (2005) Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. Zoologica Scripta, 34(2): 184-197.
- Ortmann, A. (1891) Die Decapoden-Krebse des Strassburger Museums, mit besonderer Berücksichtigung der von Herrn Dr. Döderlein bei Japan und bei den Liu-Kiu-Inseln gesammelten und z. Z. im Strassburger Museum aufbewahrten Formen. II. Theil. Versuch einer Revision der Gattungen Palaemon sens. strict. und Bithynis. Zoologische Jahrbücher. Abtheilung für Systematik, Geographie und Biologie der Thiere 5: 693-750.

- Ortmann, A.E. (1897) Os camarões de água doce da América do Sul. *Revista do Museu Paulista*, 2: 173-216.
- Page, T.J.; Cook, B.D.; Rintelen, T.; Rintelen, K.; J.M. Hughes (2008) Evolutionary relationships of atyid shrimps imply both ancient Caribbean radiations and common marine dispersals. *Journal of the North American Benthological Society*, 27(1): 68-83.
- Palumbi, S.R.; J. Benzie (1991) Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1(1): 27-34.
- Pantaleão, J.A.F.; Gregati, R.A.; Taddei, F.G.; R.C. Costa (2011) Morphology of the first larval stage of *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1868) (Caridea: Palaemonidae). *Nauplius*, 19(1): 79-85.
- Pereira, G. (1997) A cladistic analysis of the freshwater shrimps of the family Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Caridea). *Acta Biologica Venezuelica*, 17(1): 1-69.
- Pereira, G.; J.V. Garcia (2002) The first two larval stages of two freshwater shrimps genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae) reared in the laboratory, with a discussion on the significance of abbreviated development for the radiation of the genus. *In*: Escobar-Briones, E.; F. Alvarez (Eds). *Modern Approaches to the Study of Crustacea*. New York: Kluwer Academics/Plenum Publishers p. 323-328.
- Pereira, G.; Stefano, H.; Staton, J.; B. Farrell (2002) Phylogenetic relationships in some species of the genus *Macrobrachium* based on nucleotide sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I. *In*: Escobar-Briones, E.; F. Alvarez (Eds). *Modern Approaches to the Study of Crustacea*. New York: Kluwer Academics/Plenum Publishers, p. 319-322.
- Pileggi, L.A.G. (2009) Sistemática filogenética dos camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 do Brasil: análises morfológicas e moleculares. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 236pp. Tese (Doutorado).
- Pileggi, L.G.; F.L. Mantelatto (2010) Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebrate Systematics*, 24(1): 194–208.
- Posada, D. (2008) jModelTest: Phylogenetic Model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1253-1256.

- Posada, D. & T. Buckley (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Aikake information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematics Biology*, 53: 793-808
- Porter, M.L.; Pérez-Losada, M.; K.A. Crandall (2005) Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(2): 355-369.
- Porto, L.A.C. (2004) Estudo morfológico em populações do complexo *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) em diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. USP, São Paulo, SP. 151pp.
- Ranbaut, A. (2007) FigTree. Disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rathbun, M.J. (1900) The decapod and stomatopod Crustacea, Part 1. *In*: Results of the Branner-Agassiz Expedition to Brasil. Proceedings of the Washington Academy Sciences, Part 1, 2: 133-156.
- Rintelen, K.V.; Page, T.J.; Cai, Y.; Roe, K.; Stelbrink, B.; Kuhajda, B.R.; Ilife, T.M.; Hughes, J. T.V. Rintelen (2012) Drawn to the dark side: A molecular phylogeny of freshwater shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea: Atyidae) reveals frequent cave invasions and challenges current taxonomic hypotheses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63: 82-96.
- Rozas, J.; R. Rozas (1999) DnaSP version 3.0: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15: 174-175.
- Saki, R.; Gelfand, D.H.; Stofell, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; H.A. Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Saussure, H. de (1857) Diagnoses de quelques crustacés nouveaux de l'Amérique tropicale. *Revue et Magasin de Zoologie Pure et Appliquée* 2(9): 501-505.
- Sawaya, M.P. (1946) Sobre alguns camarões d'água doce do Brasil. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Zoologia*, 11: 393-407.
- Slatkin, M. (1987) Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science*, 236: 787-792.
- Short, J.W. (2004) A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Hydrobiologia*, 525(1-3): 1-100.

- Silva, I.C.; J. Paula (2008) Is there a better chela to use for geometric morphometric differentiation in brachyuran crabs? A case study using *Pachygrapsus marmoratus* and *Carcinus maenas*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 88(5): 941-953.
- Silva, J.M.; Creer, S.; Santos, A.; Costa, A.C.; Cunha, M.R.; Costa, F.O.; G.R. Carvalho (2011) Systematic and Evolutionary Insights Derived from mtDNA COI Barcode Diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). PlosOne, 6(5): 1-15.
- Smith, S.I. (1869) Notice of the crustacea collected by Prof. C.F. Hartt on the coast of Brazil in 1867. Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences 2: 1-41.
- Swofford, D.L. (2003) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0b.10. Sunderland: Sinauer Associates.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; T.J. Gibson (1994) Clustal W, improving the position the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific, gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acid Research, 22(22): 4673-4680.
- Valencia, D.; M.R. Campos (2007) Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of Colombia. Zootaxa, 1456: 1-44.
- Valenti, W.C.; J.H. Tidwell (2006) Economics and management of freshwater prawn culture in western hemisphere. pp. 263-278. In: Leung, S.; C. Engle (Eds.) Shrimp Culture: Economics, Market and Trade. Oxford: Blackwell Science.
- Vergamini, F.G., Pileggi, L.G., F.L. Mantelatto (2011) Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). Contributions to Zoology, 80(1): 67-83.
- Villalobos, F.A. (1966) Estudio de los Palaemonidae de México. I. *Macrobrachium acanthochirus* n. sp., del suroeste de México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional de México, 37:167-173.
- Villalobos, F.A. (1969) Problemas de especiación en América de un grupo de Palaemonidae del genero *Macrobrachium*. Proceedings of the World Scientific Conference on the Biology and Culture of Shrimps and Prawns. FAO Fisheries Reports, 57(3): 1055-1066.
- Whiting, M.F. (2002) Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Sinaphonaptera. Zoologica Scripta, 31: 93-104.

- Whiting, M.F., Carpenter, J.C.; Wheeler, Q.D.; W.C. Wheeler (1997) The strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology Systems. Biology 46(1): 1-68.
- Wiegmann, A.F. (1836) Beschreibung einiger neuen Crustaceen des Berliner Museums aus Mexico und Brasilien. Archiv für Naturgeschichte, 2: 145-151.
- Williams, A.B. (1984) Shrimps, lobsters and crabs of the Atlântico coast of the eastern United States Maine to Flórida 550pp.
- Wowor, D.; Muthu, V.; Meier, R.; Balke, M.; Cai, Y.; K.L. Ng (2009) Evolution of life history traits in Asian freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) based on multilocus molecular phylogenetic analysis. Molecular Phylogenetics and Evolution, 52(1): 340–350.
- Yamaguchi, T. (1977) Studies on the handedness of the fiddler crab *Uca lacteal*. Biological Bulletin, 152: 424-436.
- Young, R.E.; Pearce, J.; C.K. Govind (1994) Establishment and maintenance of claw bilateral asymmetry in snapping shrimps. Journal of Experimental Zoology, 269(4): 319-326.