



GISELE OLIVEIRA DE SOUZA

**Uso de marcadores moleculares em camarões palaemonídeos: aplicações em
Palaemon argentinus e *Macrobrachium potiuna* (Crustacea, Decapoda, Caridea)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Animal.

Área de Concentração: Genética, biologia molecular e evolução.

Orientador: Prof. Dr. Thales R. O. Freitas

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE
2016

Uso de marcadores moleculares em camarões palaemonídeos: aplicações em
Palaemon argentinus e Macrobrachium potiuna

GISELE OLIVEIRA DE SOUZA

Aprovada em ____ de _____ de ____.

Dra. Paula Beatriz Araújo.

Dra. Paula Angélica Roratto

Dr. Luiz Felipe Cestari Dumont

“Tudo bem, até pode ser
que os dragões sejam moinhos de vento
Tudo bem, seja o que for...
Seja por amor às causas perdidas.”

(Dom Quixote – Engenheiros do Hawaii)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo financiamento e à UFRGS pela oportunidade e suporte.

Gostaria muito de agradecer ao meu orientador Dr. Thales Freitas por ter me recebido em seu laboratório e ter aceitado o meu projeto com camarões em um laboratório de vertebrados. Muito obrigada por cada ensinamento profissional e pessoal, por cada palavra de incentivo e apoio, pelos momentos agradáveis de café e de conversa.

Agradeço ainda à Dr^a Gislene Gonçalves que, mesmo não sendo oficialmente minha co-orientadora, agiu como se fosse, sempre me auxiliando com as análises e textos e ainda me acalmando nos momentos de desespero.

Aos professores Dr. Felipe Dumont e Dr^a Paula Roratto, que já me auxiliaram em momentos de dúvidas e que ajudaram bastante com suas importantes críticas e sugestões.

À querida professora Dr^a Paula Araújo, que por muitas vezes me ouviu, aconselhou e batalhou comigo por uma(s) alternativa(s). A sua ajuda carcinológica foi de extrema importância. Aprendi muito contigo, profissional e pessoalmente!

À professora Dr^a Georgina Bond-Buckup, que muito me ajudou com os *Macrobrachium* e possibilitou o desenvolvimento de um capítulo não previsto no projeto.

Agradeço também à professora Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos, que gentilmente me cedeu espaço em seu laboratório para desenvolver a biblioteca genômica. E à Dr^a Romina Ituarte, que me cedeu amostras de *Palaemon argentinus*.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética e Evolução de Vertebrados, obrigada por tudo! À Lucinha por sempre ajudar com as burocracias. Ao Lulis não só pelo cuidado com a parte laboratorial, mas também por todas as caronas, brincadeiras, cruzadinhas e risadas. A todos os colegas de laboratório, obrigada pela companhia, bom convívio e por todos os ótimos momentos de risadas. Aos amigos Fernando Quintela e Lívia Muller, um agradecimento enorme por terem me acompanhado na coleta no Uruguai, tornando a viagem memorável! Um agradecimento especial para aquelas que ultrapassaram os limites laboratoriais e se tornaram amigas fora da UFRGS também: Ana, Bruna, Carol, Dalila, Darli, Lívia, May, Pati, Samara, Sandra e Tatinsk.

Ao pessoal do Laboratório de Carcinologia da UFRGS, por me acolherem tão bem e sempre serem solícitos em ajudar. Em especial, ao Felipe Ribeiro por tentar me ensinar um pouco sobre taxonomia, à Kelly Martinez pelos inúmeros mapas e à Tainã Loreiro por me ouvir e dar ideias ótimas para contornar os problemas do doutorado.

Aos queridos amigos do laboratório de Crustáceos Decapodes da FURG, por estarem sempre dispostos a me auxiliar e por acompanharem de longe o desenvolvimento desse projeto, sempre torcendo pelo meu sucesso.

À minha família que me incentivou a batalhar pelos meus objetivos e sempre acreditaram no meu potencial. À minha família porto-alegrense, por todo cuidado a mim dedicado. À minha mãe por ser meu exemplo de dedicação e sabedoria, que mesmo não mais presente fisicamente, me fortalece todos os dias.

À Sandra Bülau por ser minha grande pequena amiga, sempre me animando, mimando, corrigindo, acompanhando, divertindo... Por estar e ser presente nos piores e nos melhores momentos desse doutorado, muito obrigada!

E meu agradecimento especial ao meu marido Leonardo, por toda dedicação, paciência, incentivo, companheirismo, amizade e amor. Por entender muitas ausências, minhas impaciências, meu desespero, e incondicionalmente permanecer ao meu lado ao longo desse período.

A todos que não foram citados, e que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.... Obrigada!

Sumário

| | |
|--|------|
| RESUMO | viii |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| <i>Palaemon argentinus</i> (Nobili, 1901) | 4 |
| <i>Macrobrachium potiuna</i> (Müller, 1880) | 8 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 3. CAPÍTULO I | 14 |
| Desenvolvimento de marcadores microsatélites para <i>Palaemon argentinus</i> (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) | 14 |
| 3.1. Resumo | 15 |
| 3.2. Introdução | 15 |
| 3.3. Metodologia | 18 |
| 3.3.1. Desenvolvimento da biblioteca genômica | 18 |
| 3.3.2. Identificação das regiões de microsatélites e construção de primers | 20 |
| 3.3.3. Amplificação dos Microsatélites | 20 |
| 3.4. Resultados | 22 |
| 3.5. Considerações | 26 |
| 3.6. Referências Bibliográficas | 27 |
| 4. CAPÍTULO II | 29 |
| A influência das mudanças climáticas do Quaternário na filogeografia do camarão de água doce <i>Palaemon argentinus</i> (Crustacea: Decapoda) | 29 |
| 4.1. Resumo | 30 |
| 4.2. Introdução | 31 |
| 4.3. Material e métodos | 34 |
| 4.3.1. Obtenção de amostras | 34 |
| 4.3.2. Extração de DNA, amplificação por reação de polimerase em cadeia, e sequenciamento | 35 |
| 4.3.3. Variação das sequências, estrutura genética populacional, análises filogenética e demográfica | 36 |
| 4.4. Resultados | 37 |
| 4.4.1. Dados das sequências e diversidade genética | 37 |
| 4.4.2. Filogeografia e estruturação populacional | 39 |
| 4.4.3. Relações filogenéticas e mudança demográfica histórica | 43 |
| 4.5. Discussão | 44 |
| 4.6. Referências Bibliográficas | 50 |
| 4.7. Material Suplementar | 55 |
| 5. CAPÍTULO III | 56 |
| Cryptic species or intraspecific variability? High genetic variation in the freshwater prawn <i>Macrobrachium potiuna</i> (Decapoda, Palaemonidae) based on 16S rRNA sequences | 56 |

| | | |
|------|---|----|
| 5.1. | Abstract | 57 |
| 5.2. | Introduction | 58 |
| 5.3. | Material and Methods..... | 60 |
| | 5.3.1.Taxa sampling and 16S rRNA sequence acquisition | 60 |
| | 5.3.2.Molecular phylogeny and genetic diversity analysis..... | 63 |
| | 5.3.3.Intra- and interspecific genetic distance | 64 |
| 5.4. | Results | 65 |
| 5.5. | Discussion | 69 |
| | 5.5.1.Intraspecific Variability..... | 69 |
| | 5.5.2.Genetic divergence in Macrobrachium | 71 |
| | 5.5.3.Taxonomic considerations..... | 71 |
| 5.6. | Acknowledgments | 74 |
| 5.7. | References | 75 |
| 5.8. | Material Suplementar | 84 |
| 6. | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 87 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 88 |
| 8. | ANEXOS | 92 |
| | 8.1.Instructions to Authors - NAUPLIUS | 92 |
| | 8.2.Instructions to Authors – Genetic and Molecular Biology | 99 |

RESUMO

A subfamília Palaemoninae é um táxon bastante diverso, com alta variabilidade nas formas e estruturas de seus representantes. A grande diversidade de habitats e diferentes estratégias reprodutivas e comportamentais que esses crustáceos apresentam se reflete na sua elevada diversidade morfológica. O uso de ferramentas moleculares pode auxiliar em questões sobre a taxonomia, descendência e relações de parentesco para algumas espécies desse gênero, contribuindo pra a melhor compreensão de suas histórias evolutivas. Para a espécie *Palaemon argentinus* o uso de marcadores mitocondriais possibilitou a análise da homogeneidade genética da espécie, condizente com a hipótese de ocupação recente em ambientes dulcícolas. Complementarmente, foi demonstrada uma forte correspondência entre a estrutura populacional de *P. argentinus* e os eventos glaciais que moldaram a região de abrangência da espécie. Além disso, foram desenhados “primers” específicos para regiões microssatélites de *P. argentinus* que poderão ser utilizados em estudos futuros a respeito dos eventos que moldaram a história evolutiva recente desses camarões. A aplicação de ferramentas moleculares também resulta em importantes contribuições para o conhecimento sobre a evolução de *Macrobrachium potiuna*, para a qual foi verificado que a variação genética intraespecífica pode ser resultante de estruturação geográfica devido ao isolamento pela distância e às especializações de habitat, corroborando para a existência de espécies crípticas dentro de um grande “pool” de variação genética nesse grupo com taxonomia confusa.

LISTA DE TABELAS:

Capítulo 3

- 3-1. Descrição das regiões microssatélites encontradas na biblioteca genômica construída.....23
- 3-2. Características dos nove *loci* microssatélites isolados de *P. argentinus* 25

Capítulo 4

- 4-1. Locais amostrados e seus respectivos números amostrais.....34
- 4-2. Informações sobre a diversidade haplotípica e as referidas populações. Na segunda coluna constam os haplótipos presentes e seus respectivos números de amostras. Na terceira, o grupo da Samova a que cada população foi atribuída..... 40
- 4-3. Coeficientes de diferenciação estimados para os Grupos diagnosticados na Samova..... 42
- S 4-1. Coeficientes de diferenciação entre populações de *P. argentinus*.....55

Capítulo 5

- 5.1. *Macrobrachium* individuals used in the phylogenetic analysis, with sample location, catalogue number in their respective collections, and GenBank access number.....62
- 5.2. Pairwise genetic distance (Kimura-2-parameter) based on 16S rRNA sequences between clades of *Macrobrachium potiuna* (in bold) recovered in the Bayesian analysis, and between closely related species.....67
- S 5.1. Espécimes do gênero *Macrobrachium* utilizados na análise de distância genética, incluindo informações de número de acesso do GenBank das sequências incorporadas e suas referências.....84

LISTA DE FIGURAS:

Capítulo 1

- 1-1. Ilustração de um exemplar de *Palaemon argentinus*, visto lateralmente (Ilustração de Melo, 2003)..... 6
- 1-2. Distribuição geográfica de *Palaemon argentinus*,de acordo com Melo 2003).....7
- 1-3. Padrão de espinhos na carapaça dos diferentes gêneros de Palaemonídeos. Na primeira ilustração, um representante do gênero *Cryphiops*, que possui somente o espinho antenal. No gênero *Palaemon* verifica-se os espinhos antenal e branquioestegal.Já para o gênero *Macrobrachium*, nota-se a presença dos espinhos antenal e hepático, e a ausência do espinho branquiostegal. (Ilustração do site Planeta Invertebrados)8
- 1-4. Ilustração de um exemplar de *Macrobrachium potiuna*, visto lateralmente (Ilustração de Melo 2003).....10
- 1-5. Distribuição geográfica de *Macrobrachium potiuna*,de acordo com Melo 2003).....11

Capítulo 3

- 3.1 – Cromatograma de um fragmento com sequência SSR (TC)₈.....20
- 3.2 – Esquema da amplificação descrita por Schuelke (2000). Os retângulos riscados (A, B) indicam os primers microssatélites específicos e a figura ondulada (C) representa a sequência M13 universal marcada com a fluorescência. No primeiro ciclo de PCR (D) o primer forward com a cauda M13 é incorporada aos produtos de PCR. Nos ciclos seguintes (E) esses produtos são podem ser amplificados com o primar M13 marcado com a fluorescência, o qual é incorporado durante os ciclos subsequentes com uma baixa temperatura de anelamento (53°C). Os produtos finais (F) podem então ser analisados por um sistema de detecção a laser.....21

Capítulo 4

- 4-1.** Mapa dos locais amostrados e as respectivas porcentagens de representatibilidade dos haplótipo para cada população. (1 – Caverá; 2 – Itapeva; 3 – Pinguela; 4 – Armazém; 5 – Fortaleza; 6 – Figueira; 7 – Sumidouro; 8 – Mirim; 9 – Negra; 10 – Castillos; 11 – Rocha; 12 – Garzon; 13 – Del Sauce; 14 – Cisne; 15 – Calcagno; 16 – Santa Lucia; 17 – Chascomús; 18 – Burro; 19 – Vivoratá; 20 – Brava; 21 – Los Padres).....39
- 4-2.** Relações evolutivas entre os haplótipos de *Palaemon argentinus* pela abordagem de Neighbor Joining. As cores identificam os grupos Samova. Os tamanhos dos círculos são proporcionais à frequência de haplótipos e as linhas perpendiculares representam as substituições inferidas nos ramos.....41
- 4-3.** Árvore de máxima verossimilhança estimada para os haplótipos de *P. argentinus*. Somente os valores de bootstrap acima de 50 são apresentados. As cores indicam os grupos estimados pela Samova.....44

Capítulo 5

- 5-1.** Geographical distribution of *Macrobrachium potiuna* along the Brazilian coast. The symbols indicate the main clades recovered in the Bayesian analysis (CA, CSS-II and I, CSM). The stars indicate the populations from the southernmost range of distribution which formed the new clade CSM.....61
- 5-2.** Evolutionary relationships in *Macrobrachium potiuna* based on 16S sequences. A, Bayesian consensus tree; clades are indicated by colors (CSS-I, CSS-II, CSM, and CA). Numbers above branches refer to posterior probabilities; values < 0.95 are not shown. B, *Median-joining* network representing the relationships between haplotypes identified in the main clades from the Bayesian analysis. Cross bars indicate mutational steps. Circle size is proportional to the haplotype frequency. The small black circles indicate median vectors (i.e. lost or non-sampled haplotypes).66
- 5-3.** Intraspecific pairwise genetic distances (Kimura 2-parameter) in *Macrobrachium potiuna*, based on sequences of 16S. Clades CSM and CSS refers to groups recovered in the Bayesian analysis.....68
- 5-4.** Relation between geographic and genetic distance (Kimura 2-parameter) in the major clade CSS of *Macrobrachium potiuna*. (Correlation analysis: $r = 0.82$; Mantel-test: $P < 0.05$)..... 69
- 5-5.** Intra and interspecific genetic distances (Kimura 2-parameter) in *Macrobrachium*, calculated based on 208 sequences of 16S from 48 species. Grey bars indicate the range where there was overlap of intra and interspecific distances.....72

1. INTRODUÇÃO GERAL

A sistemática clássica, baseada fundamentalmente em caracteres morfológico-anatômicos é de grande importância, mas às vezes não é suficiente para resolver alguns táxons. Essa abordagem com base em observações morfológicas faz com que a compreensão da classificação, a descendência e as relações de parentesco de alguns grupos ainda hoje não sejam bem definidas. Após a revolução molecular foram estabelecidos métodos mais sofisticados de estudo de dados genéticos. Essa ferramenta possibilitou o estudo de caracteres antes não utilizados, tornando a sistemática mais confiável (Nei e Kumar, 2000).

A filogenia molecular ganhou impulso com o advento das técnicas baseadas em DNA, nos anos 1980. Com o aprimorar da tecnologia as ferramentas moleculares se tornaram mais exequíveis e financeiramente acessíveis, o que tem resultado em maior quantidade de sequências de nucleotídeos disponíveis. Conseqüentemente, estudos de sistemática filogenética têm resultado em revisões taxonômicas e alterações na classificação de vários grupos, incluindo, a sub-família Palaemoninae, (Rafinesque, 1815; Page *et al.*, 2008; Pileggi e Mantelatto, 2010; Kou *et al.*, 2013) .

Palaemoninae é uma subfamília de crustáceos decápodes carídeos, da família Palaemonidae. Inclui camarões ocupantes de todos os tipos de ambientes aquáticos, desde o ambiente marinho até o ambiente estritamente dulcícola (Ferreira *et al.*, 2010). Essa diversidade de ambientes ocupados se repercute na sua ampla distribuição geográfica, o que faz deste grupo um táxon muito representativo e importante não só ecologicamente, mas também economicamente (Melo, 2003).

A grande diversidade morfológica desse grupo é reflexo da diversidade de habitats e das diferentes estratégias reprodutivas e comportamentais que os

Introdução

Palaemoninae possuem. Muitas dessas características são utilizadas como caracteres diagnósticos dos gêneros e espécies do táxon, sem considerar a possibilidade de plasticidade fenotípica desses camarões e também sem atentar ao fato de que as similaridades observadas podem ser resultantes de evolução convergente, como resposta às pressões seletivas similares (Carvalho, 2014).

Sendo assim, a aplicação de ferramentas moleculares possibilita o maior entendimento a respeito da evolução de padrões e processos acerca da grande variabilidade encontrada em camarões palaeomoníneos. Estudos com genes mitocondrial e nuclear possibilitaram, por exemplo, o conhecimento de que camarões paleomoníneos de água doce estão mais relacionados a outras espécies marinhas geograficamente próximas do que a outras espécies dulcícolas, sugerindo então, que a evolução do ambiente marinho para águas interiores não seja decorrente de uma única colonização, mas sim de várias invasões (Ashelby *et al.*, 2012).

Com a popularização de métodos em biologia molecular, a sistemática dos camarões palaeomoníneos tem recebido importantes contribuições para o entendimento da sua história evolutiva, com novas informações sobre revalidação da sistemática (De Grave e Ashelby, 2013), identificação e sinonimização de espécies (Rossi e Mantelatto, 2013; Álvarez *et al.*, 2014), reconhecimento de espécies crípticas (Carvalho *et al.*, 2013) e distinção entre linhagens dentro de uma espécie (Rossi e Mantelatto, 2013). A aplicação de ferramentas moleculares, conciliada com o conhecimento adquirido pelos estudos baseados em dados morfológicos, possibilita uma interpretação mais realista da história evolutiva. Essa abordagem possibilita o reconhecimento de grupos monofiléticos em um contexto espaço-temporal, o que auxilia para um entendimento mais objetivo da relação histórica entre diferentes áreas (Hillis *et al.*, 1996).

Introdução

Em organismos aquáticos o contexto espaço-temporal é de grande relevância, uma vez que o conhecimento dos processos naturais relacionados à estruturação dos corpos d'água auxilia no entendimento da história evolutiva das espécies (Sivasundar *et al.*, 2001). Para compreensão da diversificação e evolução desses organismos é pertinente a abordagem multidisciplinar da filogeografia, que integra a genética molecular, genética de populações, etologia, demografia, filogenia, paleontologia e geologia (Avise, 2000).

Estudos filogeográficos permitem, através da análise da informação contida nas moléculas de DNA, distinguir entre eventos biológicos (como a dispersão) e ocorrências geológicas (por exemplo, eventos vicariantes), que podem influenciar nos padrões de variação genética de uma espécie (de Bruyn *et al.*, 2004a). Essa ciência ainda oferece métodos de examinar a história da troca de material genético entre populações, podendo distinguir padrões biogeográficos de variação genética provocada por fluxo gênico daquela variação causada por ancestralidade comum (Schaal *et al.*, 1998).

A interpretação de como os processos evolutivos históricos demográficos poderiam deixar marcas na distribuição geográfica atual, tem contribuído muito para o crescente conhecimento dos padrões de variação da ordem Decapoda. Avaliações da estrutura genética de populações e sua possível estruturação geográfica (Reuschel *et al.*, 2010; Daniels, 2011), a detecção de barreiras ao fluxo gênico (de Bruyn *et al.*, 2004a; García-Merchán *et al.*, 2012), a verificação do papel histórico de barreiras geográficas na diversificação de espécies (Pedraza-Lara *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2013) e a inferência de possíveis rotas de colonização (Luttikhuizen *et al.*, 2008; Ashelby *et al.*, 2012) têm fornecido suporte para maior compreensão da história evolutiva dos decápodos.

Introdução

No presente estudo será abordada a utilização de ferramentas moleculares em duas espécies de camarões palemoníneos, *Palaemon argentinus* e *Macrobrachium potiuna*, para análises de suas diversidades intraespecíficas sob um contexto filogeográfico e filogenético, respectivamente. Esse trabalho ainda tem a finalidade de fornecer mais subsídios para elucidar a evolução das espécies estudadas e, conseqüentemente, da subfamília Palaemoninae.

***Palaemon argentinus* (Nobili, 1901)**

Até 2013, a espécie pertencia ao gênero *Palaemonetes*. Os gêneros *Palaemon* e *Palaemonetes* divergiam-se somente pela ausência de palpo mandibular (Holthuis, 1950), embora vários estudos comprovam que a presença/ausência do palpo não é um caracter estável. Uma revisão da subfamília Palaemoninae, baseada tanto em evidências morfológicas quanto moleculares, estabeleceu-se que *Palaemonetes*, juntamente com os gêneros *Exopalaemon* e *Coutierella*, são sinônimos júnior de *Palaemon* (De Grave e Ashelby, 2013).

O gênero *Palaemon* compreende 86 espécies marinhas, estuarinas e dulcícolas, incluindo as anfídromas. Possui ampla distribuição geográfica, possuindo representantes em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo. Apesar das várias revisões filogenéticas recentes, esse táxon ainda não se caracteriza como um grupo monofilético (Carvalho, 2014).

Há um consenso geral sobre a hipótese de que os camarões palaemonídeos teriam origem a partir de ancestral marinho, que conquistou ambientes salobre e posteriormente os ambientes de água doce (Freire *et al.*, 2003; Wowor *et al.*, 2009; Ashelby *et al.*, 2012). Características relacionadas à capacidade osmorregulatória e ao

Introdução

padrão de desenvolvimento larval são variáveis entre os camarões do gênero *Palaemon* e as diferenças dessas características entre as espécies podem representar adaptações recentes às condições ambientais diferenciadas (Anger *et al.*, 2007). Há espécies que, apesar de tipicamente dulcícolas, podem apresentar tolerância à alta salinidade, dependência da água salgada para completar o seu desenvolvimento larval, migrações reprodutivas para o mar e/ou desenvolvimento larval do tipo estendido. Essas características podem indicar suas recentes histórias evolutivas (Ituarte *et al.*, 2010).

Palaemon argentinus (figura 1.1) exibe características biológicas que sugerem que essa espécie ainda esteja em um processo ativo de colonização aos ambientes de água doce. Esses pequenos camarões habitam águas interiores como lagos e arroios, mas também podem ocorrer em lagunas, o que demonstra uma grande elasticidade fisiológica desta espécie, permitindo-lhe tolerar uma vasta amplitude de salinidades (Ituarte *et al.*, 2007). Estudos mostram que em condições laboratoriais esta espécie pode sobreviver e completar seus eventos reprodutivos em salinidade 25 (Ituarte *et al.*, 2010). Essa alta capacidade osmorregulatória é indício de que esse camarão esteja em um estágio inicial de invasão evolutiva de habitats de água doce.

Outra característica diferenciada de *P. argentinus* é seu padrão de desenvolvimento larval, que compreende nove estágios. Esse tipo de desenvolvimento larval estendido é típico de palaemonídeos habitantes de ambientes marinhos (Menú-Marque, 1973). Palaemonídeos restritos à água doce apresentam abreviação dos estágios larvais e incremento do tamanho dos ovos, o que teria permitido maior taxa de sobrevivência da prole em ambientes dulcícolas que tem menor produção de plâncton (Lee e Bell, 1999).

Introdução

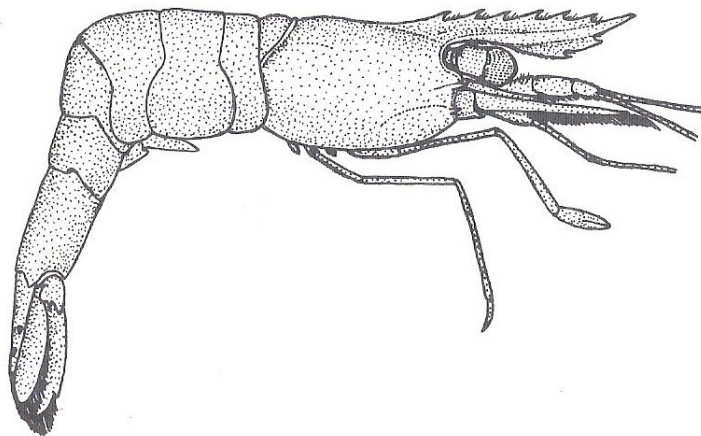


Figura 1.1 – Ilustração de um exemplar de *Palaemon argentinus*, visto lateralmente (Ilustração de (Melo, 2003).

A espécie *P. argentinus* compreende organismos pequenos (de 1 a 6 cm aproximadamente) e bastante abundantes, podendo ter um papel fundamental na cadeia trófica do sistema estuarino e lagunar (Capítulo e Freyre, 1995). Sua distribuição se dá nas bacias costeiras do sul da costa Leste da América do Sul (Holthuis, 1952) abrangendo desde o Estado de Santa Catarina no Brasil até a província de Santa Fé, na Argentina (Bond-Buckup e Buckup, 1989) (figura 1.2). A distribuição geográfica dessa espécie coincide com áreas que foram modificadas nos eventos de transgressões e regressões marinhas ocorridas no Pleistoceno e no Holoceno. No Brasil, *P. argentinus* se distribui ao longo de toda a Planície Costeira do sul do país, no complexo lagunar composto por sistemas deposicionais do tipo “laguna-barreira” desenvolvidos como consequência dos três últimos grandes ciclos de variação do nível do mar de transgressão pós-glacial (Tomazelli *et al.*, 2000). No Uruguai, a região costeira é caracterizada por promontórios rochosos, os quais podem ter sofrido processos de erosão e sedimentação devido à subida do nível do mar no Quaternário (Aguilar e Muzio, 2006). Na Argentina, a costa apresenta um baixo relevo, as flutuações do nível

Introdução

do mar geraram o avanço do mar sobre grandes extensões de terra, possibilitando a deposição de sedimentos (Cavallotto *et al.*, 2004).

Todos os fatos citados corroboram a hipótese de que *P. argentinus* teria origem a partir de ancestral marinho e que a sua colonização em ambientes de água doce seja recente. Assim, o estudo da diversidade populacional e da filogeografia desse camarão pode ser muito interessante, possibilitando inferências sobre os processos que moldaram a sua história evolutiva



Figura 1.2 –Distribuição geográfica de *Palaemon argentinus*,de acordo (Melo 2003)

Introdução

Macrobrachium potiuna (Müller, 1880)

O gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 compreende camarões que habitam toda a gama de habitats aquáticos, desde áreas marinhas até massas de água continentais, como córregos e lagoas (Liu *et al.*, 2007). Compreende aproximadamente 240 espécies, que apresentam ampla distribuição, ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais de todos os continentes. (De Grave e Fransen, 2011).

A etimologia do nome *Macrobrachium* (makros -longo, grande /brakhion - braço) remete à principal característica do gênero, que é a ampliação extrema do segundo par de pereiópodos, ao menos nos machos (Bate, 1868). Outras características de gênero são o carpo não subdividido, rostró com dentes, presença de mandíbula com palpo tri-articulado, presença de espinho hepático e ausência do espinho branquiostegal (Figura 1.3).

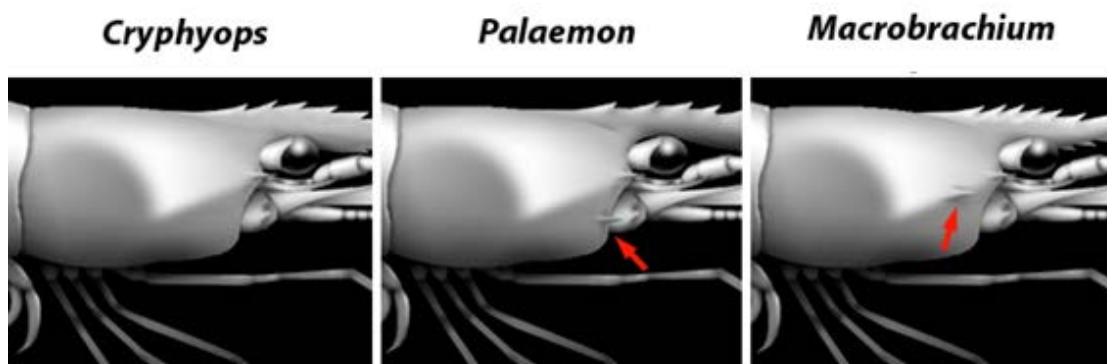


Figura 1.3 – Padrão de espinhos na carapaça dos diferentes gêneros de Palaemonídeos. Na primeira ilustração, um representante do gênero *Cryphiops*, que possui somente o espinho antenal. No gênero *Palaemon* verifica-se os espinhos antenal e branquiostegal. Já para o gênero *Macrobrachium*, nota-se a presença dos espinhos antenal e hepático, e a ausência do espinho branquiostegal. (Ilustração do site Planeta Invertebrados)

A taxonomia das espécies desse gênero é baseada principalmente em caracteres do rostró, como o formato, número e distribuição de dentes. Também são importantes as informações morfológicas dos pereiópodos, a respeito do formato, presença de espinhos

Introdução

e nas proporções entre o dátilo, própodo, carpo mero e ísquio (Holthuis, 1952). Porém, dentro de uma mesma espécie esses caracteres têm ampla variabilidade e conseqüentemente pode haver uma sobreposição de dados ao comparar espécies distintas. Assim, o forte conservadorismo interespecífico e a alta variação morfológica intraespecífica dificulta a taxonomia do gênero (Pileggi e Mantelatto, 2012).

Os caracteres diagnósticos utilizados nas análises morfológicas do gênero não são suficientes para responder as inconsistências das relações interespecíficas em *Macrobrachium*. Assim, a abordagem molecular aplicada às relações filogenéticas pode ser bastante elucidativa na taxonomia desses camarões, contribuindo para o entendimento de aspectos biológicos e evolutivos do táxon (Murphy e Austin, 2002; de Bruyn *et al.*, 2004b; Rintelen *et al.*, 2007; Rossi e Mantelatto, 2013).

Vários são os trabalhos a respeito da taxonomia e sistemática de *Macrobrachium* (Pereira, 1997; Page *et al.*, 2008; Wowor *et al.*, 2009; Pileggi e Mantelatto, 2012), mas apesar do elevado número de estudos, ainda são relatados erros de identificação, sinonímias e detecção de espécies crípticas (Murphy e Austin, 2004; Short, 2004; Carvalho *et al.*, 2013).

Macrobrachium potiuna (Müller, 1880) (figura 1.4), assim como outras espécies do gênero, apresenta grande variabilidade intraespecífica. Essa variação foi abordada em recentes estudos que detectaram sinonímia envolvendo essa espécie (Pileggi e Mantelatto, 2010; Pileggi e Mantelatto, 2012) e também a presença de espécies crípticas (Carvalho *et al.*, 2013).

Camarões da espécie *M. potiuna* apresentam pequeno porte e se distribuem nas bacias costeiras do Sudeste e Sul do Brasil, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (Bond-Buckup e Buckup, 1989; Carvalho *et al.*, 2013) (Figura 1.5). São camarões muito importantes na cadeia trófica, e podem ter importância econômica, pois apesar do seu

Introdução

pequeno tamanho, são utilizados na alimentação humana e também servem como isca (Lima e Oshiro, 2000).

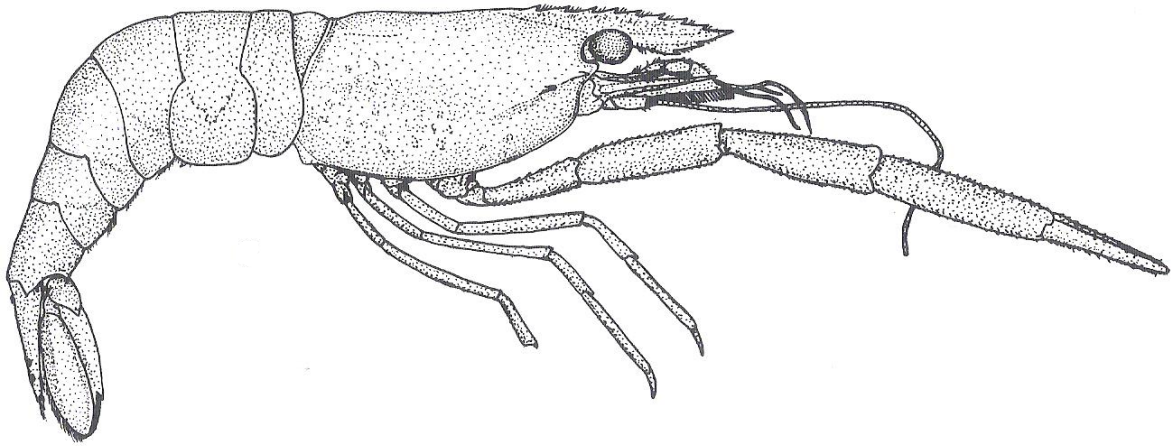


Figura 1.4 – Ilustração de um exemplar de *Macrobrachium potiuna*, visto lateralmente (Ilustração de (Melo 2003).

Macrobrachium potiuna é uma espécie tipicamente dulcícola que, diferentemente de outras espécies do gênero, independe fisiologicamente da água salobra para completar seu ciclo de vida. A estratégia reprodutiva dessa espécie está na diminuição do número de ovos, contrapondo com o aumento do material nutritivo dos mesmos, o que viabiliza o desenvolvimento embrionário mais prolongado e a eclosão da larva em uma forma mais elaborada (Antunes e Oshiro, 2004)

Exibe elevada variabilidade morfológica, tanto que, segundo Bond-Buckup e Buckup (1989), exemplares dessa espécie no Rio Grande do Sul tem similaridades com *M. borellii* (Nobili, 1896). Considerando os critérios tradicionais de identificação entre espécies do gênero, as diferenças entre *M. petronioi* (espécie com distribuição geográfica restrita à região de Cananéia no estado de São Paulo) e *M. potiuna* consiste no formato e tamanho do rostró, assim como número de dentes superiores do rostró.

Introdução

(Holthuis, 1952; Melo *et al.*, 1988; Bond-Buckup e Buckup, 1989), mas esses caracteres apresentam sobreposição de valores, dificultando a diferenciação dessas espécies.



Figura 1.5 - Distribuição geográfica de *Macrobrachium potiuna*, de acordo (Melo 2003)

Em uma análise filogenética do gênero, abrangendo principalmente espécies da América, foi verificado que a divergência genética de *M. petronioi* a posicionava dentro do nível de variação intraespecífica de *M. potiuna* (Pileggi e Mantelatto, 2010). Essas evidências genéticas conduziram à necessidade de uma análise morfológica mais detalhada destas espécies e à investigação de novos caracteres, antes não utilizados no

Introdução

reconhecimento específico, que indicaram uma ampla variabilidade morfológica ao longo da limitada distribuição geográfica de *M. potiuna* e reforçaram a hipótese de sinonímia dessa espécie e *M. petronioi*, anteriormente proposta (Pileggi e Mantelatto, 2012).

Visto que diferenças morfológicas nos camarões dessa espécie distribuídos no Rio Grande do Sul já foram relatadas (Bond-Buckup e Buckup, 1989), uma análise abrangendo populações do extremo sul da distribuição de *M. potiuna* poderia auxiliar na inferência conclusiva sobre a variabilidade intraespecífica, confirmando ou refutando a hipótese de existência de espécies crípticas, e contribuindo para a correta taxonomia do táxon.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Obter e analisar dados moleculares de duas espécies de camarões ocorrentes no sul do Brasil, *Palaemon argentinus* e *Macrobrachium potiuna*, para compreender os padrões evolutivos dessas espécies.

Objetivos específicos

- Desenvolver primers de regiões microssatélites específicos para *P. argentinus*;
- Analisar os padrões filogeográficos e populacionais de *P. argentinus* ao longo de sua distribuição geográfica;
- Relacionar os resultados obtidos pelos marcadores moleculares com a histórica geológica da região de abrangência de *P. argentinus*;
- Caracterizar a variabilidade intraespecífica de *M. potiuna* ao longo de toda a sua distribuição.
- Contribuir com a compreensão sistemática de *M. potiuna*, através da verificação de existência de espécies crípticas relacionadas.

3. CAPÍTULO I

**Desenvolvimento de marcadores microsatélites para *Palaemon argentinus*
(Crustacea: Decapoda: Palaemonidae)**

Gisele Oliveira de Souza¹, Thales Renato O. de Freitas^{1,2}

1 - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15007, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

2 - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15007, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

* Autor correspondente: gisouza@gmail.com

Artigo em preparação a ser submetido na Nauplius.

3.1. RESUMO

Palaemon argentinus (Nobili, 1901) é um camarão da região costeira do sul da América do Sul e que apresenta várias características que levantam a hipótese de que seja uma espécie de ocupação recente de ambientes dulcícolas. Aqui nós relatamos o desenvolvimento de marcadores microssatélites isoladas dessa espécie e a caracterização de suas variabilidades de alelos. O número de alelos observados para cada loci variou de 3 a 9. Esses marcadores podem ser úteis para estudos populacionais de *P. argentinus*, e podem trazer informações sobre os padrões filogeográficos da referida espécie.

3.2. INTRODUÇÃO

Há um consenso geral de que *Palaemon argentinus* (Nobili, 1901), assim como outras espécies da família Palaemonidae, evoluiu no mar antes colonizar ambientes salobres costeiros, estuarinos e límnicos (Freire *et al.* 2003). Apesar de bem adaptados ao meio dulcícola, camarões dessa espécie apresentam características fisiológicas, tais como a tolerância à ambientes de alta salinidade, que são indícios da sua história evolutiva recente em ambientes de água doce (Bauer and Delahoussaye 2008; Freire *et al.* 2003). Além disso, a hipótese de ocupação recente de ambientes interiores também é suportada pelo desenvolvimento larval do tipo estendido, com 9 estágios larvais (Anger 2001), típico de espécies marinhas.

A espécie *P. argentinus* ocorre em lagoas costeiras do sul do Brasil até a região centro-litoral da Argentina (Bond-Buckup and Buckup 1989). A distribuição geográfica dessa espécie coincide com áreas que foram modificadas nos eventos de transgressões e

Capítulo I

regressões marinhas ocorridas no Pleistoceno e no Holoceno. Sua ocorrência no Brasil se dá por toda a Planície Costeira, do sul do estado de Santa Catarina até o litoral norte do Uruguai. Essa região é geologicamente caracterizada pela sequência de terraços planos, alternados com alongadas depressões, que deram origem a lagunas, lagos e pântanos em diferentes estágios evolutivos (Villwock and Tomazelli 1995). Este complexo lagunar é composto por sistemas deposicionais do tipo “laguna-barreira” desenvolvidos como consequência dos eventos de transgressão/regressão ocorridos nos últimos 325 mil anos (Tomazelli *et al.* 2000).

Os últimos grandes ciclos de variação do nível do mar também afetaram regiões costeiras uruguaias e argentinas onde são encontrados espécimes de *P. argentinus*. Essas áreas apresentam baixo relevo e por isso as flutuações do nível do mar geraram avanço da água salgada sobre grandes extensões de terra, transportando muitos exemplares da vida marinha para regiões interiores e possibilitando a deposição de sedimentos (Cavallotto *et al.* 2004).

Diante do exposto, acredita-se que *P. argentinus* tenha evoluído de uma espécie marinha aprisionada em ambiente límnico durante as grandes variações do nível do mar ocorridas desde o Pleistoceno.

Histórias evolutivas recentes podem ser geneticamente descritas principalmente pelo uso de microssatélites (SSRs), uma vez que esses marcadores moleculares apresentam evolução mais rápida quando comparada ao DNA nuclear (Avisé 2000). Os microssatélites são sequências simples repetidas (SSRs), as quais consistem de 1 a 6 nucleotídeos dispostos repetidamente no genoma. O alto polimorfismo apresentado por esse marcador molecular (que tem taxa de mutação que varia de 10^{-2} a 10^{-6} por geração) pode ser decorrente do deslizamento de uma das fitas do DNA durante a replicação ou

Capítulo I

de um crossing-over desigual entre cromossomos homólogos imperfeitamente alinhados ao longo das repetições de microssatélites (Hancock 1999).

Os marcadores microssatélites apresentam muitos alelos, padrão de herança mendeliana co-dominante e uma considerável variação entre populações, e por isto, quando usados com cautela, podem fornecer informações valiosas sobre especiação, filogenia e taxa de expansão (Hewitt 2001). Dessa forma, acreditamos que o uso desse marcador molecular seja o mais adequado para estudos populacionais de *P. argentinus*.

Algumas espécies da família *Palaemonidae* já tiveram “primers” SSRs desenvolvidos e descritos (Bhassu *et al.* 2005; Chand *et al.* 2005; Jia *et al.* 2013; See *et al.* 2009; Song *et al.* 2009), porém a aplicação de iniciadores já descritos para outra espécie pode não obter sucesso. O êxito no uso de primers SSRs em diferentes espécies depende do tamanho do genoma e do sistema de reprodução (Turcheto-Zolet *et al.* 2013). Entre os animais, o filo Arthropoda é o que apresenta menor taxa de amplificação heteróloga entre espécies de um mesmo gênero (Barbará *et al.* 2007).

Na família *Palaemonidae* o sucesso em tal procedimento também demonstra ser reduzido. Um exemplo dessa dificuldade é encontrado entre os camarões *Macrobrachium rosenbergii* e *M. dacqueti* (espécies anteriormente conhecidas como as formas oriental e ocidental de *M. rosenbergii* respectivamente) que são muito relacionados filogeneticamente e que não obtiveram sucesso de amplificação cruzada com os primers microssatélites (Bhassu *et al.* 2005; Chand *et al.* 2005).

A limitação de uso de primers já desenhados para outras espécies de palaemonídeos, juntamente com as incertezas filogenéticas desse táxon (*Palaemon argentinus* era, até pouco tempo atrás, pertencente ao gênero *Palaemonetes*), nos

Capítulo I

conduziram à necessidade de desenvolvimento de primers SSRs para a espécie em estudo.

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. Desenvolvimento da biblioteca genômica

Foi escolhida para gerar a biblioteca genômica uma amostra de DNA de *P. argentinus* coletado na lagoa Itapeva (RS), que apresentou boa qualidade e grande quantidade de material (quantificado em 428 ng/ul de DNA com absorvância de 1,82). O passo inicial foi digerir o DNA genômico, com a enzima de restrição Afa I (antiga Rsa I, de sítio de restrição em 5' GT↓AC 3') para gerar fragmentos de tamanhos adequados. Os fragmentos gerados foram ligados aos adaptadores Rsa21 e Rsa25 através da ação da enzima T4 DNA ligase.

Rsa21: 5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3'

Rsa25: 5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3'

A ligação aos adaptadores garante que todos os fragmentos digeridos tenham uma terminação comum e conhecida e que possibilite a realização de uma reação de polimerase em cadeia (PCR). Além de amplificar a quantidade de fragmentos, essa etapa também é uma confirmação de que a ligação dos adaptadores tenha ocorrido. O material amplificado foi preparado para etapa seguinte através da purificação com o “Quiquick PCR purification kit” (Qiagen®) seguindo protocolo do fabricante.

Capítulo I

Os fragmentos seguiram então para a hibridização com oligos de microssatélites biotinolado, de acordo com o descrito por (Kijas *et al.* 1994). Foram usados as repetições (CT)₈ e (GT)₈. As sondas se anelaram com fragmentos que continham regiões complementares, ou seja, com aqueles que continham regiões microssatélites. Dessa forma, somente os fragmentos de interesse foram selecionados através da associação entre a biotina da sonda e a estreptavidina ligada à microesferas magnéticas (também chamada de beads magnéticas). Esse complexo formado foi isolado por um ímã, enquanto que os demais fragmentos não ligados às sondas foram descartados através de sucessivas lavagens. Essa etapa permitiu a seleção de fragmentos com SSRs, enriquecendo a biblioteca genômica e aumentando a chance de obtenção de várias sequências com regiões microssatélites.

Os fragmentos selecionados passaram novamente por uma PCR com a finalidade de gerar fragmentos em fita dupla em maior quantidade, que foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T da Promega®. Para proporcionar a amplificação do inserto, células de *Escherichia coli* (linhagem XL1-blue) foram transformadas por eletroporação. As células foram então plaqueadas em meio LB com adição de IPTG e X-Gal para distinção dos transformantes. Para certificar-se que os clones transformados continham os insertos foi realizada a amplificação dos clones por PCR.

Confirmado que as colônias escolhidas eram de células transformadas, foi realizada a inoculação em meio Circle Grow contendo ampicilina, seguida de extração plasmidial por lise alcalina.

Um total de 48 colônias foram selecionadas para o sequenciamento (forward e reverse), realizado com o kit *Big Die Terminator V3.1*. O serviço de sequenciamento foi contratado como serviço terceirizado realizado pela Unicamp.

3.3.2. Identificação das regiões de microssatélites e construção de primers

As seqüências obtidas foram analisadas com o auxílio dos programas Chromas 2.01 (Technelysium) e Mega v5.1 (Tamura *et al.* 2011)

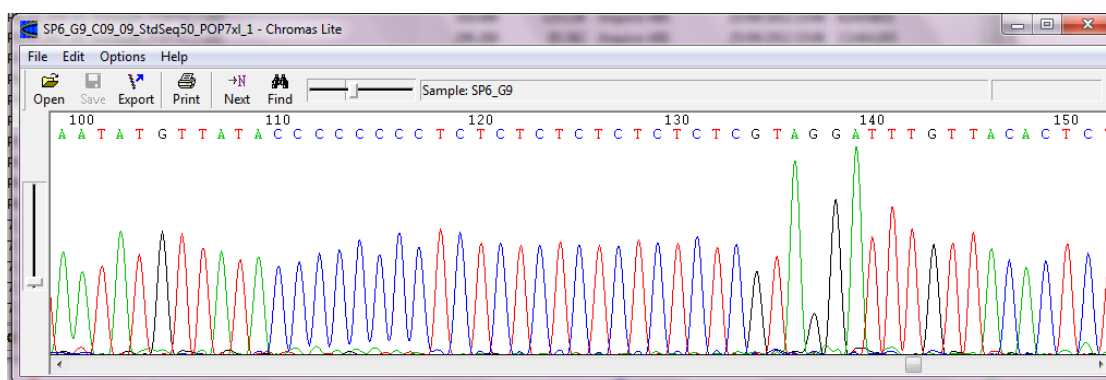


Figura 3.1 – Cromatograma de um fragmento com seqüência SSR (TC)₈

A identificação e a caracterização das regiões microssatélites foram realizadas com auxílio da ferramenta SSRIT – Simple Sequence Repeat Identification Tool do programa Gramene (Jaiswal *et al.* 2006), sempre tendo o cuidado de excluir as seqüências dos adaptadores utilizados para a construção da biblioteca genômica. Os primers foram desenhados nas regiões flanqueadoras dos microssatélites, utilizando o programa PRIMER3 plus (Untergasser *et al.* 2007).

3.3.3. Amplificação dos Microssatélites

As reações de PCR foram realizadas seguindo o protocolo descrito por (Schuelke 2000), que é um método para diminuir os custos de genotipagem. De acordo

Capítulo I

com esse método a amplificação utiliza 3 primers: (1) primer universal M13 marcado com um corante fluorescente, (2) o primer forward com a cauda M13 na extremidade 5', e com (3) o primer reverse.

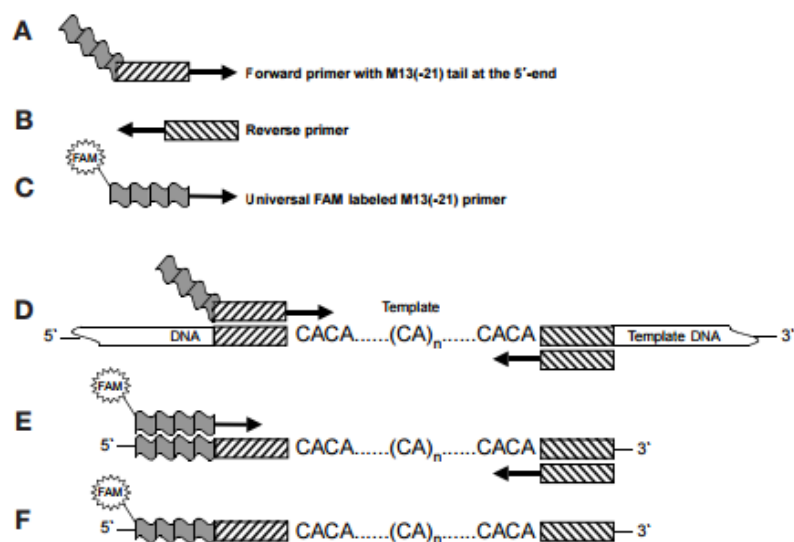


Figura 3.2 – Esquema da amplificação descrita por Schuelke (2000). Os retângulos riscados (A, B) indicam os primers microssatélites específicos e a figura ondulada (C) representa a sequência M13 universal marcada com a fluorescência. No primeiro ciclo de PCR (D) o primer forward com a cauda M13 é incorporada aos produtos de PCR. Nos ciclos seguintes (E) esses produtos são amplificados com o primer M13 marcado com a fluorescência, o qual é incorporado durante os ciclos subsequentes com uma baixa temperatura de anelamento (53°C). Os produtos finais (F) podem então ser analisados por um sistema de detecção a laser.

As reações de PCR continham 40ng de DNA, 1x de tampão de reação, 8 pmol do primer reverse, 2 pmol do primer forward, 8 pmol do primer M13 marcado, 0,4 mM de dNTP, 1U de Taq DNA polimerase e de 4 a 6 mM de MgCl₂ (dependendo da região microssatélite a ser amplificada), em um total de 20µL de mix.

As condições de amplificação seguiram os seguintes ciclos de temperaturas: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53-62°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, seguidos por 8 ciclos para o anelamento do primer M13, que

Capítulo I

consistem de 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Foram utilizados 3 diferentes primers M13, com distintas marcações fluorescentes: HEX, FAM e TAMRA. Assim, a genotipagem foi otimizada, fazendo leitura de três diferentes fragmentos em cada unidade de reação. A genotipagem foi realizada em equipamento ABI 3100 (Applied Biosystems) na empresa Macrogen.

Os resultados da genotipagem foram visualizados e registrados usando o programa Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems). Os loci foram verificados para avaliação de existência de erros de registro e alelos nulos com o programa Micro-Checker v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004), de acordo com intervalo de confiança de 95% e 1000 repetições. Os cálculos da heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram realizados com auxílio do programa Arlequin v3.5.2 (Excoffier *et al.* 2005), com 10000 passos na cadeia Markov/permutações e 1000 passos de memorização. Níveis significantes de HWE foram ajustados com correção estrita de Bonferroni considerando múltiplas comparações simultâneas (Rice 1989).

3.4. RESULTADOS

Foi obtida uma biblioteca genômica de *P. argentinus* contendo 48 clones, sendo que somente 42 sequências (87,5% do total) tiveram boa qualidade de sequenciamento. Destas, 34 apresentaram sequências com SSRs. Assim, a eficiência da biblioteca enriquecida em regiões microssatélites foi de 70,83%

Foi observada a predominância de motivos de repetição do tipo dinucleotídica, sendo este motivo presente em quase 95% dos microssatélites apurados na biblioteca.

Capítulo I

Não foram verificados motivos de repetição classificados como penta e hexanucleotídeos. A maioria dos microssatélites encontrados é classificada como microssatélites perfeitos, sendo verificado apenas dois motivos interrompidos, um imperfeito e um composto.

Tabela 3.1 – Descrição das regiões microssatélites encontradas na biblioteca genômica construída.

| CLONE | Motivo de repetição | Número de repetições |
|-------|---------------------|----------------------|
| E1 | GA | 37 |
| E3 | TC | 22 |
| E5 | AT | 4 |
| E6 | AG | 16 |
| E7 | CA | 4 |
| E8 | AG | 30 |
| E9 | AG | 31 |
| E10 | GA | 13 |
| F1 | CT | 6 |
| F2 | CT | 31 |
| F4 | TC | 29 |
| F5 | GA | 17 |
| F8 | CT | 23 |
| F9 | TC | 13 |
| F10 | TC | 12 |
| F12* | TC | 10/9 |
| G1 | CT | 30 |

| CLONE | Motivo de repetição | Número de repetições |
|-------|---------------------|----------------------|
| G2 | CT | 23 |
| G3 | GT | 7 |
| G4 | AG | 25 |
| G5 | GT | 5 |
| G6 | TG | 8 |
| G8 | TC | 33 |
| G9 | CT | 19 |
| G11 | TC | 15 |
| G12 | GA | 32 |
| H2 | AG | 34 |
| H3** | ATC | 8 |
| H4 | GA | 21 |
| H5 | GA | 21 |
| H6* | AG | 17/19 |
| H7 | AG | 22 |
| H8*** | AATC/TC | 5/21 |
| H10 | CT | 25 |

(*) SSR interrompido (**) SSR Imperfeito (***) SSR Composto

O motivo mais comum foi CT/GA, presente em 30 das 37 regiões com SSRs detectadas. Os motivos de variação variaram, entre 4 e 37, com média de 18,89 repetições por região com SSR.

Das 34 regiões contendo repetições microssatélites, 12 estavam próximas à extremidade da sequência, inviabilizando o desenho dos primers para esses clones. Assim, somente 22 microssatélites poderiam ter primers desenhados.

Capítulo I

Foram selecionadas 16 regiões para o desenho dos primers, priorizando aqueles que continham mais número de repetições, o que aumentaria a chance de amplificação de um sítio polimórfico.

Dos 16 pares de primers desenhados, dois não foram possíveis de amplificar e outros três demonstraram amplificação de vários fragmentos, e por esses motivos não foram enviados para o serviço de genotipagem por eletroforese capilar automatizada.

Dos onze pares de primers restantes, dois tiveram um comportamento atípico, que pode ser decorrente da formação de quimeras. A verificação em gel de acrilamida demonstrava amplificação do fragmento do tamanho esperado, mas a genotipagem eletroforese capilar não demonstrava nenhum pico. Foram feitos vários testes, trocando os primers M13 fluorescentes usados, e o resultado continuava sendo falho. A efetividade de cada reagente foi testada em outras amostras, e detectamos que o problema não estava na qualidade dos reagentes, pois esses funcionavam para outras amostras. Acreditamos que seja alguma incompatibilidade da cauda M13 com os primers.

Foram genotipados com sucesso nove fragmentos (Tabela 3.2), porém três desses fragmentos se demonstraram monomórficos (Paar 2, Paar 7 e Paar 8) para a população analisada.

O número de alelos encontrados nos loci polimórficos variou de 3 a 9, mas como o número de amostras amplificadas para cada loci foi variável é possível que o número de alelos esteja subestimado. Houve evidências de alelos nulos para os loci Paar 1 e Paar 9 e, com exceção do Paar16, todos os fragmentos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 3.2 - Características dos nove *loci* microsatélites isolados de *Palaemon argentinus*

| Loci | Primer 5'-3' | Repeat motif | AT (°C) | Size range | N | Na | Ho | He | PHW |
|---------|---|--|------------|------------|----|----|------|------|----------|
| Paar 1 | F: CAAAGAAATGCCAAGAATGACA R: GAAAAACTGTGAAAGCCGAATC | (GA) ₃₇ | 57 | 236-246 | 18 | 6 | 0,50 | 0,82 | 0,00580* |
| Paar 2 | F: GAGAGATGTCGGATGTTGGAAT R: TGTATCGGCAATTCAGAGTGAC | (TC) ₂₂ | 61 | 161 | 20 | 1 | - | - | - |
| Paar 5 | F: CACTGGAAAATGAAAGACCATC R: CGGAAAGTGAGAACTGAACAGA | (TC) ₂₉ | 59 | 263-281 | 7 | 9 | 0,85 | 0,91 | 0,22204 |
| Paar 7 | F: TGACATTTGAAAAATTCGGAGA R: CCGAGCTACAAGTCAGTTACGA | (TC) ₁₃ | 57 | 162 | 16 | 1 | - | - | - |
| Paar 8 | F: TCCTATCTTCTTACAACCTCGCTTTC R: CGTGATAATGTTTCAAATCAAGA | (TC) ₁₀ | 62 | 222 | 22 | 1 | - | - | - |
| Paar 9 | F: GCGTTAGCTTTGCTCCTGTTA R: AAATTGTGCCACATTCAGACAG | (TC) ₃₃ | 56 | 226-244 | 26 | 8 | 0,65 | 0,83 | 0,02372 |
| Paar 12 | F: GAAAACGATACCGGATGTAGGA R: ATCCTCAAAGACGATAAGCAAA | (GA) ₃₂ | 53 | 344-352 | 14 | 4 | 0,78 | 0,62 | 0,79995 |
| Paar 14 | F: CGCGTGGACTAGCTCTCTATTT R: GGCTACTGATAGAAACGGTTGG | (ATC) ₈ | 58 | 180-186 | 5 | 3 | 0,60 | 0,51 | 1,000 |
| Paar 16 | F: AAGGAGTTCCAACACCAGAAAA R: TTCACTATGTAGCGCAGCACTT | (AATC) ₅ (TC) ₂₁ | 62 | 219-149 | 23 | 8 | 0,52 | 0,77 | 0,00292* |

F: Sequência do primer forward; R: Sequência do primer reverse; AT: Temperatura de Anelamento; N: número de amostras analisadas; Na: Número de alelos; Ho Heterozigidade observada; He: Heterorigosidade esperada; PHW: Probabilidade de desequilíbrio de Hardy–Weinberg

3.5. CONSIDERAÇÕES

Uma das grandes dificuldades em aplicar microssatélites como marcadores moleculares em pesquisa é a necessidade de desenvolver primers específicos para a espécie estudada. A construção da biblioteca genômica requer grande investimento financeiro e muito tempo dedicado, se a espécie não possui genoma sequenciado.

O uso da M13 é uma boa alternativa para diminuir os custos do estudo, porém há interferências na eficiência da genotipagem. Em muitos casos, a perda de qualidade na genotipagem não prejudica as análises dos eletroferogramas. Para *P. argentinus* a aplicação dessa técnica não se demonstrou eficiente, uma vez que a visualização dos dados da genotipagem não foi satisfatória e muitas vezes falharam mesmo em amostras que demonstravam através da eletroforese, a amplificação do fragmento de interesse. Assim, o uso de primers já marcados com fluorescências é o recomendado para esse caso, mesmo que exijam investimento financeiro maior.

Apesar de se mostrarem bastante polimórficos e promissores o serem aplicados em estudos populacionais, a biblioteca não gerou uma quantidade adequada de marcadores para serem usados em estudos populacionais, nos quais geralmente são amplificados de 10 a 20 marcadores polimórficos. De qualquer maneira, esses marcadores desenvolvidos podem se somar a outros a serem desenvolvidos futuramente e então, auxiliar as futuras pesquisas a respeito de *P. argentinus* e/ou outras espécies relacionadas.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anger K (2001) *The Biology of Decapod Crustacean Larvae*. A.A. Balkema, The Netherlands.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, London.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**:3759-3767.
- Bauer RT, Delahoussaye J (2008) Life history migrations of the amphidromous river shrimp *Macrobrachium ohione* from a continental large river system. *Journal of Crustacean Biology* **28**:622-632.
- Bhassu S, Hassan R, Yusoff K, Jamari Z, Siraj SS, Guan TS (2005) Single Locus Microsatellite Development for the Malaysian Giant Freshwater Prawns, *Macrobrachium rosenbergii* *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* **28**:87-94.
- Bond-Buckup G, Buckup L (1989) Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia* **49**:883-896.
- Cavallotto JL, Violante RA, Parker G (2004) Sea-level fluctuations during the last 8600 years in the de la Plata river (Argentina). *Quaternary International* **114**:155-165.
- Chand V, Bruyn MD, Mather PB (2005) Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Molecular Ecology Notes* **5**:308-310.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* **1**:47-50.
- Freire CA, Cavassin F, Rodriguez EN, Torres AH, McNamara JC (2003) Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps *Comparative Biochemistry and Physiology* **136**:771-778.
- Hancock JM (1999) Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein D, Schlötterer C eds., *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, New York.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography — or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**:537-549.
- Jaiswal P, Ni J, Yap I, Ware D, Spooner W, Youens-Clark K, Ren L, Wei X, Liang C, Pasternak S, Zhao W, Teclé I, Faga B, Canaran P, Ravenscroft D, Hebbard C, Avraham S, Casstevens T, Buckler ES, Stein L, Mccouch S (2006) GRAMENE: A GENOMICS AND GENETICS RESOURCE FOR MAIZE *Maize Genetics Cooperation Newsletter* **80**:99-107.

Capítulo I

- Kijas J, Fowler J, Garbett C, Thomas M (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques* **16**:656-662.
- Rice W (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**:223-225.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* **18**:233-234.
- See LM, Tan SG, Hassan R, Siraj SS, Bhassu S (2009) Development of Microsatellite Markers from an Enriched Genomic Library for the Genetic Analysis of the Malaysian Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biochemical Genetics* **47**.
- Song K-H, Jung J, Kim W (2009) Polymorphic microsatellite markers of freshwater prawn *Palaemon paucidens* (De Haan, 1844) (Crustacea: Palaemonidae). *Molecular Ecology Resources* **9**:418-420.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**:2731-2739
- Tomazelli LJ, Dillenburg SR, Villwock JA (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul Coastal plain, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Geociências* **30**:474-476.
- Turcheto-Zolet AC, Segatto ALA, Turchetto C, Palma-Silva C, Freitas LBd (2013) *Guia Prático para estudos filogeográficos*. Editora SBG, Ribeirão Preto
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* **35**:W71-W74.
- Van Oosterhout C, Hutchison W, Shipley P, Wills D (2004) Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology* **4**:535-538.
- Villwock JA, Tomazelli LJ (1995) *Geologia Costeira do Rio Grande do Sul*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

4. CAPÍTULO II

A influência das mudanças climáticas do Quaternário na filogeografia do camarão de água doce *Palaemon argentinus* (Crustacea: Decapoda)

Gisele Oliveira de Souza¹, Gislene Lopes Gonçalves², Thales Renato O. de Freitas^{1,2}

1 - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15007, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

2 - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15007, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

* Autor correspondente: gisouza@gmail.com

ARTIGO A SER SUBMETIDO Á GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

4.1. RESUMO

Os efeitos evolutivos de períodos glaciais são muito importantes para as espécies, em especial para organismos que ocupam regiões costeiras afetadas pelos eventos de elevação do nível do mar. Foi avaliado o padrão filogeográfico do camarão de água doce *Palaemon argentinus*, uma espécie que apresenta características biológicas e fisiológicas que o tipifica como uma espécie ainda em estágio inicial de invasão evolutiva de habitats de água doce. A estruturação genética populacional desse crustáceo foi avaliada a partir da investigação de regiões do DNA mitocondrial (COI e CytB) de 171 indivíduos amostrados em 21 localidades ao longo de toda a distribuição geográfica da espécie. As análises revelam uma baixa diversidade para a espécie, indicando uma baixa divergência genética condizente com a hipótese de evolução recente. As análises de variação molecular permitiram o arranjo de quatro grupos de populações, cujos coeficientes de diferenciação indicaram a homogeneidade dentro dos grupos e evidenciaram maior heterogeneidade entre grupos, onde a estruturação desses grupos pode ser considerada como reflexo de uma significativa diferenciação histórica entre os camarões de lagoas do norte da planície costeira do sul do Brasil e as demais lagoas. A rede de haplótipos e a filogenia revelaram a proximidade de populações geograficamente distantes, que pode ser considerada como decorrente de um contato secundário entre essas populações. Todos os resultados demonstram uma forte correspondência entre a estrutura populacional da espécie e os eventos glaciais que moldaram a região de abrangência da espécie, corroborando para a hipótese filogeográfica de aprisionamento dessa espécie em ambiente dulcícola, seguido por eventos de alopatria, expansão populacional e dispersão de espécimes intercorridos nos três últimos ciclos de transgressão e regressão marinhas, ocorridas desde o Pleistoceno superior.

4.2. INTRODUÇÃO

Os ciclos glaciais do passado provocaram mudanças climáticas em todo o globo, alterando a temperatura e a precipitação em todos os continentes. Essas alterações influenciaram diretamente no nível do mar, que periodicamente invadiram e recuaram sobre os continentes ao longo do tempo geológico (Lambeck e Chappell 2001). Essas oscilações tornam as regiões costeiras áreas altamente dinâmicas do ponto de vista da geografia histórica (Beheregaray *et al.* 2002), afetando diretamente a história evolutiva e a distribuições de muitos grupos biológicos (Hewitt 1996). Múltiplos ciclos de glaciação e re-colonização a partir de refúgios, associados a uma complexa geologia resultaram em um mosaico de distribuições das espécies (Altermatt *et al.* 2014).

Os movimentos de transgressão e regressão marinhas ocorridos no Quaternário foram muito importantes em todo o litoral atlântico da América do Sul. Nas regiões costeiras da Argentina, Uruguai e sul do Brasil esses eventos deixaram vestígios, sendo possível encontrar registros fósseis e geológicos relacionados às oscilações marinhas, como a Planície Costeira do Sul do Brasil (PCSB) (Aguilar e Muzio 2006; Cavallotto *et al.* 2004; López e Marcomino 2011; Villwock e Tomazelli 1995). Numerosos estudos têm demonstrado que as alterações ambientais decorrentes das últimas glaciações podem ser consideradas como agentes provocadores de alterações no fluxo gênico, mudanças demográficas (efeito de gargalo ou deriva gênica) e extinção de populações locais tanto em espécies terrestres (vegetais ou animais) quanto em espécies aquáticas (dulcícolas ou marinhas) (Beheregaray *et al.* 2002; Mäder *et al.* 2013; Mora *et al.* 2006; Turchetto-Zolet *et al.* 2013).

Um conhecimento detalhado das características ambientais do passado e dos eventos históricos que moldaram a distribuição espacial das espécies é de suma importância para o conhecimento ecológico das espécies, assim como para discernir

Capítulo II

sobre os processos de diferenciação inter e intrapopulacionais (Aulsebrook 2000). Animais aquáticos marinhos e costeiros são modelos interessantes para estudos a respeito de como as modificações ocasionadas pelos períodos glaciais e interglaciais podem ter influenciado na divergência evolutiva de linhagens (Beheregaray *et al.* 2002; De Bruyn *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2014). Estudos filogeográficos sobre esses organismos são bastante informativos e podem fornecer uma ligação natural entre a evolução geológica e biótica, uma vez que a dispersão destes animais depende de conexões entre massas de água adjacentes (Hughes *et al.* 2009).

Alterações geográficas decorrentes da glaciação podem ter contribuído para a evolução de espécies dulcícolas a partir de ancestrais marinhos, representando uma grande mudança evolutiva para os animais (Lee e Bell 1999). Daqueles que fizeram a transição para a água doce, os crustáceos estão entre os mais frequentemente estudados (Ashelby *et al.* 2012). Segundo Freire *et al.* (2003), a invasão bem sucedida em ambiente de água doce por uma espécie ancestral de *Palaemon* e *Macrobrachium* pode ter surgido através da seleção de processos eficientes de captação de íons juntamente com uma redução na permeabilidade tegumentar e branquial. Há estudos que citam, inclusive, que a evolução de alguns grupos de crustáceos do ambiente marinho para águas interiores não seja decorrente de uma única colonização, mas sim de várias invasões (Botello e Alvarez 2013; Liu *et al.* 2007).

Palaemon argentinus Nobili, 1901 é um camarão que apresenta várias características que sugerem que a espécie esteja em um estágio inicial de invasão evolutiva de habitats de água doce. Sua distribuição se dá nas bacias costeiras do sul da costa Leste da América do Sul (Holthuis 1952) abrangendo desde o Estado de Santa Catarina no Brasil até a província de Santa Fé, na Argentina (Bond-Buckup e Buckup 1989). Há correspondência entre a área de ocorrência da espécie e áreas afetadas pelos

Capítulo II

eventos transgressivos e regressivos do mar do Pleistoceno e Holoceno. Nessas regiões a elevação do nível do mar possibilitou a inundação de grandes extensões de terra e a deposição de sedimentos, acarretando o avanço de espécies marinhas sobre corpos de água anteriormente dulcícolas e o aprisionamento delas em novas lagoas formadas (Cavallotto *et al.* 2004). Assim, é plausível a hipótese de que *P. argentinus* tenha se originado a partir de um ancestral marinho com alta capacidade osmorregulatória que tenha ficado aprisionado em águas continentais após a regressão marinha.

Ainda hoje *P. argentinus* apresenta grande elasticidade fisiológica quanto à tolerância a salinidade, uma vez que, apesar de ser reconhecida como um camarão de água doce, a espécie também ocorre em ambientes salobres, tais como a Laguna dos Patos (Spivak 1997). Outra característica relacionada à sua ancestralidade marinha é o seu desenvolvimento larval do tipo estendido, com nove estágios larvais (Menú-Marque 1973). Percebe-se assim que a evolução de *P. argentinus* pode estar diretamente relacionada à evolução geológica recente da região costeira Atlântica do sul da América do Sul e o estudo filogeográfico dessa espécie pode fornecer informações sobre vias e mecanismos de invasão de água doce. A análise da diversidade genética populacional desses camarões pode fornecer informações sobre as rotas, a datação e a direção das invasões (Lee e Bell 1999). O objetivo desse trabalho é verificar a existência de descontinuidade genética entre as populações de *P. argentinus* e a sua possível relação com os eventos geológicos que afetaram as lagoas costeiras do sul do Brasil, Uruguai e Argentina e assim, poder identificar potenciais processos de especiação. A compilação desses resultados com dados de trabalhos de outras espécies da mesma região pode reforçar o conhecimento a respeito das alterações geológicas da área, ocorridas no Quaternário.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS.

4.3.1. Obtenção de amostras

Foram amostradas um total de 171 exemplares de *P. argentinus* em 21 corpos d'água no Brasil, Uruguai e Argentina (com 43, 81 e 47 exemplares para cada país respectivamente). As amostras da Argentina foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Romina Ituarte (Universidad Nacional de Mar del Plata Argentina) e as demais foram coletadas com auxílio de rede puçá. Os espécimes coletados foram conservados em etanol 95% e parte do tecido muscular abdominal do camarão foi utilizada para a extração de DNA. O número de amostras por população variou de 1 a 15 indivíduos (tabela 4.1)

Tabela 4.1 - Locais amostrados e seus respectivos números amostrais

| PAÍS | LAGOA | AMOSTRAS | COORDENADAS GEOGRÁFICAS |
|-----------|-------------|----------|-------------------------|
| Brasil | Caverá | 10 | S 29.04 / O 49.55 |
| | Itapeva | 1 | S 29.40 / O 49.84 |
| | Pinguela | 2 | S 29.78 / O 50.18 |
| | Armazém | 1 | S 29.98 / O 50.13 |
| | Fortaleza | 5 | S 30.13 / O 50.22 |
| | Figueira | 8 | S 30.78 / O 50.59 |
| | Sumidouro | 11 | S 31.11 / O 51.14 |
| | Mirim | 5 | S 33.48 / O 53.42 |
| Uruguai | Negra | 14 | S 33.99 / O 53.59 |
| | Castillos | 10 | S 34.30 / O 53.97 |
| | Rocha | 14 | S 34.51 / O 54.25 |
| | Garzon | 8 | S 34.79 / O 54.33 |
| | Del Sauce | 13 | S 34.85 / O 55.06 |
| | Cisne | 10 | S 34.75 / O 55.83 |
| | Calcagno | 7 | S 34.84 / O 56.02 |
| | Santa Lucía | 5 | S 34.78 / O 56.35 |
| Argentina | Chascomús | 9 | S 35.61 / O 57.99 |
| | Burro | 5 | S 35.68 / O 57.95 |
| | Vivoratá | 7 | S 37.73 / O 57.44 |
| | Brava | 12 | S 37.86 / O 57.98 |
| | Los Padres | 14 | S 37.93 / O 57.73 |

4.3.2. Extração de DNA, amplificação por reação de polimerase em cadeia, e sequenciamento.

A extração do DNA foi feita utilizando-se o método por CTAB (protocolo modificado a partir de (Doyle e Doyle 1987)). Os genes mitocondriais Citocromo Oxidase I (COI) e Citocromo B foram escolhidos como marcadores moleculares para o presente estudo. Foram amplificados dois fragmentos parciais do gene mitocondrial CCOI: o primeiro fragmento com 451 pares de bases que foi amplificado utilizando os primers CoiA (5' – AGTATAAGCGTCTGGG TAGTC – 3') e CoiF (5' – CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC – 3') (Hillis *et al.* 1996); e o outro fragmento de 551 pares de bases a partir do uso dos primers Coi HCO-1490 (5' – GGTCACAAATCATAAAGATATTGG – 3') e HCO-2198 (5' – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA – 3') (Folmer *et al.* 1994). Para o marcador molecular Cyt B, foram amplificados um total de 472 pares de bases com o seguinte par de iniciadores Cyb 1 (5' – CGAGATGTRAAYTAYGG – 3') e Cyb2 (5' – CATTGNGGYTGRATRTG – 3') (Hunter *et al.* 2008).

As amplificações de reação de polimerase em cadeia (PCR) para cada marcador foram efetuadas num volume total de reação de 20 µl contendo 100 ng de DNA, 0,2 uM de cada primer, 0,2 mM de dNTP, tampão de PCR 1x, 4 mM de MgCl₂ 4 para CytB e 2,5 mM para os dois fragmentos de COI e 1,0 unidade de enzima Taq polimerase (Empresa Ludwig) perfil de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94° C por 3 minutos, seguida por 36 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica para cada marcador durante 30 segundos e extensão a 72° por 40 segundos, seguidos por uma extensão final a 72°C por 5

Capítulo II

minutos. As temperaturas de anelamento foram 48°C para os primers HCO e LCO; 50° para os primers CoiA e CoiF e 52°C para os primers da região CytB.

Os resultados das amplificações foram avaliados em gel de agarose 1%. O produto de PCR foi purificado utilizando exonuclease I (EXO) e fosfatase alcalina de camarão (SAP) (GE Healthcare), de acordo com as orientações dos fornecedores e enviado para sequenciamento realizado pela empresa Macrogen Inc. (Coreia do Sul).

4.3.3. Variação das sequências, estrutura genética populacional, análises filogenética e demográfica.

Os eletroferogramas das diferentes sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) foram examinadas visualmente e alinhadas utilizando o programa CodonCode 6.0.2 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Os três fragmentos dos dois marcadores moleculares foram concatenados em todas as análises.

Os índices de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (H_d) (Nei 1987) foram calculados utilizando o programa DNAsp, versão 5.10.01 (Librado e Rozas 2009). Barreiras históricas ao fluxo gênico foram identificadas usando análise espacial da variação molecular no programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002) com 1000 permutações. Esse método identifica grupos de populações geograficamente homogêneos que são maximamente diferenciados uns dos outros e também estima a porcentagem de variação genética total entre os grupos de populações (FCT).

O programa Arlequin, versão 3.5.2 (Excoffier e Lischer 2010) foi utilizado para calcular o grau de divergência entre populações e entre os grupos diagnosticados no Samova através do coeficiente de diferenciação haplotípica (F_{ST}). Este mesmo programa ainda foi utilizado para realizar a análise de variância molecular (AMOVA), utilizando

Capítulo II

1.000 permutações entre os grupos diagnosticados no Samova e suas diferenças pareadas (F_{st})

O teste de Mantel para verificar a correlação entre as distâncias genéticas e geográficas foi executado no programa Alleles in Space versão 1.0 (Miller 2005).

As relações evolutivas entre as sequências foram inferidas pelo método de median-joining network $\{\epsilon = 0;$ (Bandelt *et al.* 2005)} realizadas pelo programa Network 5.0.0.0. A estimativa de tempo de divergência da espécie foi calculada com base nas taxas de substituição nucleotídica para sequências do gene COI, que para crustáceos decápodes, varia entre 2% e 3,5% - (Knowlton e Weigt 1998; Schubart *et al.* 1998)

As relações filogenéticas entre os haplótipos foram estimadas em uma árvore de máxima verossimilhança obtidos através do software MEGA versão 6.06 (Tamura *et al.* 2013), usando sequências representativas de *Palaemon gravieri*, *P. carinicauda* e *Macrobrachium nipponense*, disponíveis no Genbank, como grupos externos. O suporte para os nós foi testado através de 1000 réplicas de bootstrap.

A história demográfica de *P. argentinus* foi investigada usando dois diferentes métodos, os testes estatísticos de neutralidade D de Tajima (Tajima 1989) e F_s de Fu (Fu 1997), que foram calculados com o programa Arlequin 3.5.2 (Excoffier e Lischer 2010) para todo o conjunto de dados e para cada grupo encontrado na análise de SAMOVA.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Dados das sequências e diversidade genética

Capítulo II

Foram obtidas sequências de 1002 pb para a região COI, sendo um fragmento parcial de 551 pb amplificados com o par de primers HCO/LCO, e outro fragmento de 451 pb amplificados com os iniciadores A/F. Já para a região Cytb foram amplificadas sequências com 472 pb. Foram detectados 13 sítios polimórficos, sendo quatro deles com mutação única e outros nove parsimonicamente informativos, para um total de 171 amostras. Dado que muitas sequências apresentaram sítios com picos duplos em alguns sítios específicos, surgiu a preocupação se estas alterações poderiam ter sido geradas por erros na PCR ou no sequenciamento. No entanto, para evitar esses problemas durante as etapas experimentais foram amplificadas sequências forward e reverse, onde se percebeu que a constância dos sítios ambíguos. Esses sítios atípicos foram tratados como “N”, de forma conservadora e sem assumir aquele sítio como confiável. O valor de diversidade nucleotídica foi baixo ($\pi = 0,00103$) enquanto que o valor de diversidade haplotípica foi moderado ($Hd = 0,6348$ no total), refletindo o grande número de haplótipos estreitamente relacionados. Foram diagnosticados 16 haplótipos, dos quais poucos somente cinco foram compartilhados entre diferentes populações. No entanto, o haplótipo mais frequente (H9) foi representado em 15 das 21 populações amostradas (Tabela 4.1). Houve também um elevado número de haplótipos com três ou menos representantes, que diferem em poucas alterações nucleotídicas dos haplótipos mais representativos.

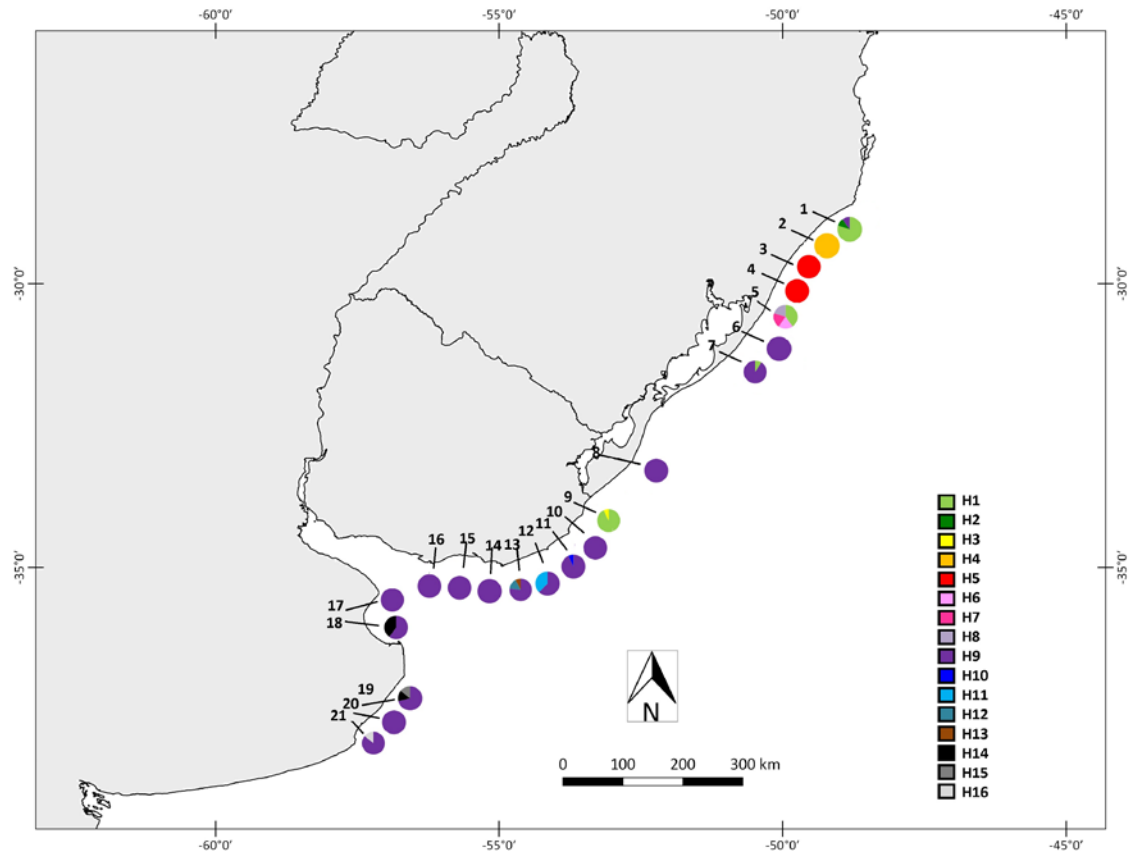


Figura 4.1 – Mapa dos locais amostrados e as respectivas porcentagens de representabilidade dos haplótipos para cada população. (1 – Caverá; 2 – Itapeva; 3 – Pinguela; 4 – Armazém; 5 – Fortaleza; 6 – Figueira; 7 – Sumidouro; 8 – Mirim; 9 – Negra; 10 – Castillos; 11 – Rocha; 12 – Garzon; 13 – Del Sauce; 14 – Cisne; 15 – Calcagno; 16 – Santa Lucia; 17 – Chascomús; 18 – Burro; 19 – Vivoratá; 20 – Brava; 21 – Los Padres).

4.4.2. Filogeografia e estruturação populacional

A análise SAMOVA foi usada para inferir o melhor agrupamento de populações baseada na variação molecular, resultando em um arranjo de quatro grupos, considerada melhor configuração por apresentar maior valor de F_{CT} (0,89829; $p < 0,001$). Os quatro grupos inferidos foram: um grupo que abrange as populações do extremo norte de distribuição de *P. argentinus* (Lagoas Caverá, Itapeva e Fortaleza) (G1), um outro grupo que também reúne populações do norte da distribuição da espécie (Lagoas Pinguela e

Capítulo II

Armazém) (G2), um grupo contendo somente a população de Laguna Negra, no Uruguai (G3) e um último grupo abrangendo todas as populações amostradas da Argentina, do Uruguai (exceto a Laguna Negra) e as populações do centro e do sul do litoral do Rio Grande do sul (Lagoas Figueira, Sumidouro e Mirim), no Brasil (G4). (tabela 4.2) Essa estruturação genética baseada nos quatro grupos foi testada por AMOVA, que estimou que 89,21% da variação ocorrem entre os grupos diagnosticados pela SAMOVA e apenas 9,65% dessa variação ocorreria dentro das populações.

Tabela 4.2 – Informações sobre a diversidade haplotípica e as referidas populações. Na segunda coluna constam os haplótipos presentes e seus respectivos números de amostras. Na terceira, o grupo da Samova a que cada população foi atribuída.

| População | Haplótipos (n) | Grupo |
|------------------|----------------------------|--------------|
| Caverá | H1(8); H2(1) H9(1) | G1 |
| Itapeva | H4(1) | G1 |
| Pinguela | H5(2) | G2 |
| Armazém | H5(1) | G2 |
| Fortaleza | H1(2); H6(1); H7(1); H8(1) | G1 |
| Figueira | H9(8) | G4 |
| Sumidouro | H1(1);H9(10) | G4 |
| Mirim | H9(5) | G4 |
| Negra | H1(13); H3(1) | G3 |
| Castillos | H9(10) | G4 |
| Rocha | H9(13);H10(1) | G4 |
| Garzon | H9(5); H11(3) | G4 |
| Del Sauce | H9(10); H12(2); H13(1) | G4 |
| Cisne | H9(10) | G4 |
| Calcagno | H9(7) | G4 |
| Santa Lucia | H9(5) | G4 |
| Chascomús | H9(9) | G4 |
| Burro | H9(3); H14(2) | G4 |
| Vivoratá | H9(5); H14(1); H15(1) | G4 |
| Brava | H9(12) | G4 |
| Los Padres | H9(12); H16(2) | G4 |
| TOTAL | 16 | |

Capítulo II

A configuração da rede de haplótipos é do tipo “starlike”, em que haplótipos pouco frequentes são derivados a partir de um haplótipo central comum com apenas uma ou duas substituições. O haplótipo com maior número de frequência (H9) é representado em quinze populações. A rede de haplótipos resultou em dois haplogrupos: um haplogrupo contendo todas as populações do grupo G4 da SAMOVA, e outro haplogrupo onde se encontram os demais grupos do SAMOVA. Esse último haplogrupo evidenciou a proximidade genética dos grupos G1, G2 e G3 do SAMOVA, havendo inclusive, o compartilhamento do haplótipo H1 entre as populações das Lagoas Negra, Fortaleza e Caverá. Geograficamente, esse haplogrupo pode ser definido como as populações dos extremos norte e sul PCSB.

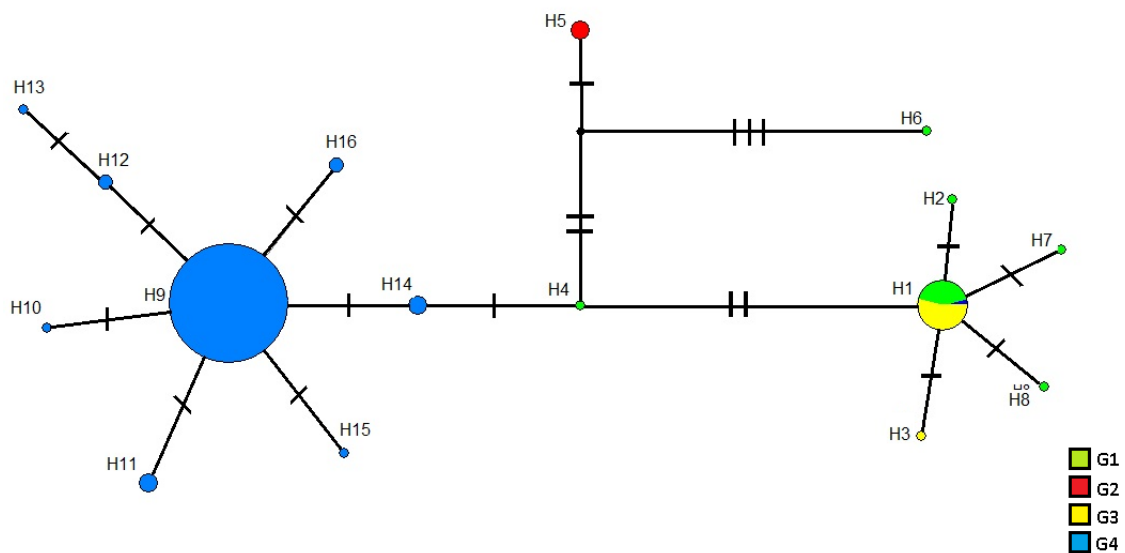


Figura 4.2 – Relações evolutivas entre os haplótipos de *Palaemon argentinus* pela abordagem de Neighbor Joining. As cores identificam os grupos Samova. Os tamanhos dos círculos são proporcionais à frequência de haplótipos e as linhas perpendiculares representam as substituições inferidas nos ramos.

Capítulo II

O nível geral de divergência genética entre as localidades estimaram que o fluxo gênico global para todas as localidades amostradas é considerado de moderado ($F_{st} = 0,275$, $p < 0,001$). Ao comparar os índices de F_{st} entre as populações, os valores variaram bastante, onde os menores valores foram encontrados entre as populações representantes do G4 (mínimo valor $F_{st} = 0,00799$ ($p > 0,01$), entre Lagoa Mirim e Lagoa Vivoratá) e os maiores valores encontrados quando comparadas as lagoas do G4 em relação às populações dos grupos G1, G2 e G3 (maior valor significativo estimado em 0,98102, $p < 0,01$ entre Laguna Negra e Laguna Garzon), evidenciando maior divergência genética entre esses grupos (Tabela Suplementar). Ao analisar o F_{st} entre os grupos da SAMOVA, a divergência genética desses grupos é evidenciada pelos altos valores encontrados (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Coeficientes de diferenciação estimados para os Grupos diagnosticados na Samova

| | G1 | G2 | G3 |
|----|---------------------|---------------------|---------------------|
| G2 | 0,66 ($p < 0,01$) | | |
| G3 | 0,06 ^{NS} | 0,98 ($p < 0,01$) | |
| G4 | 0,88 ($p < 0,01$) | 0,94 ($p < 0,01$) | 0,94 ($p < 0,01$) |

^{NS} = Valor estatisticamente não significativo

O teste de Mantel demonstrou uma baixa e não significativa correlação entre as distâncias genéticas e geográficas (coeficiente de correlação = 0,060; $P = 0,01998$). Esse resultado é concordante com outras análises, visto que populações geograficamente muito distantes são semelhantes, compartilhando haplótipos (haplótipo mais representativo) e englobadas em um grupo SAMOVA (por exemplo, lagoa da Figueira e Laguna de Los Padres que se distanciam uma da outra em mais de mil quilômetros.),

Capítulo II

enquanto que Lagoas próximas (por exemplo, as lagoas Negra e Castillos, no Uruguai, que tem em torno de 35 km separando-as) são geneticamente distintas.

4.4.3. Relações filogenéticas e mudança demográfica histórica

O valor da divergência intraespecífica (PI) somente para a região COI foi de 0,00112, o que nos permitiu a inferência de que essa espécie tenha um tempo de divergência estimado entre 32.000 e 56.000 anos.

A filogenia baseada no método de Máxima Verossimilhança (Figura 4.3) apresentou os mesmos dois haplogrupos que foram identificados na análise de rede de haplótipos. Como esperado, devido à baixa divergência entre as sequências nesta espécie, os valores de suporte para a maioria dos nós foram baixas, mas a proximidade filogenética dos grupos G1, G2 e G3 pode ser especulada. A falta de suporte para alguns ramos é possivelmente resultante da grande divergência dos grupos externos, que apresentam limitações para resolver relações interespecíficas tão recentes.

O teste de D de Tajima não foi significativo, mas apresentou valor negativo (Tajima's $D = -1.24020$, $P = 0.08770$). Por outro lado o teste de F_s de FU foi significativo e negativo (F_u 's $F_s = -28.29$, $P < 0,001$), indicando uma recente expansão populacional.

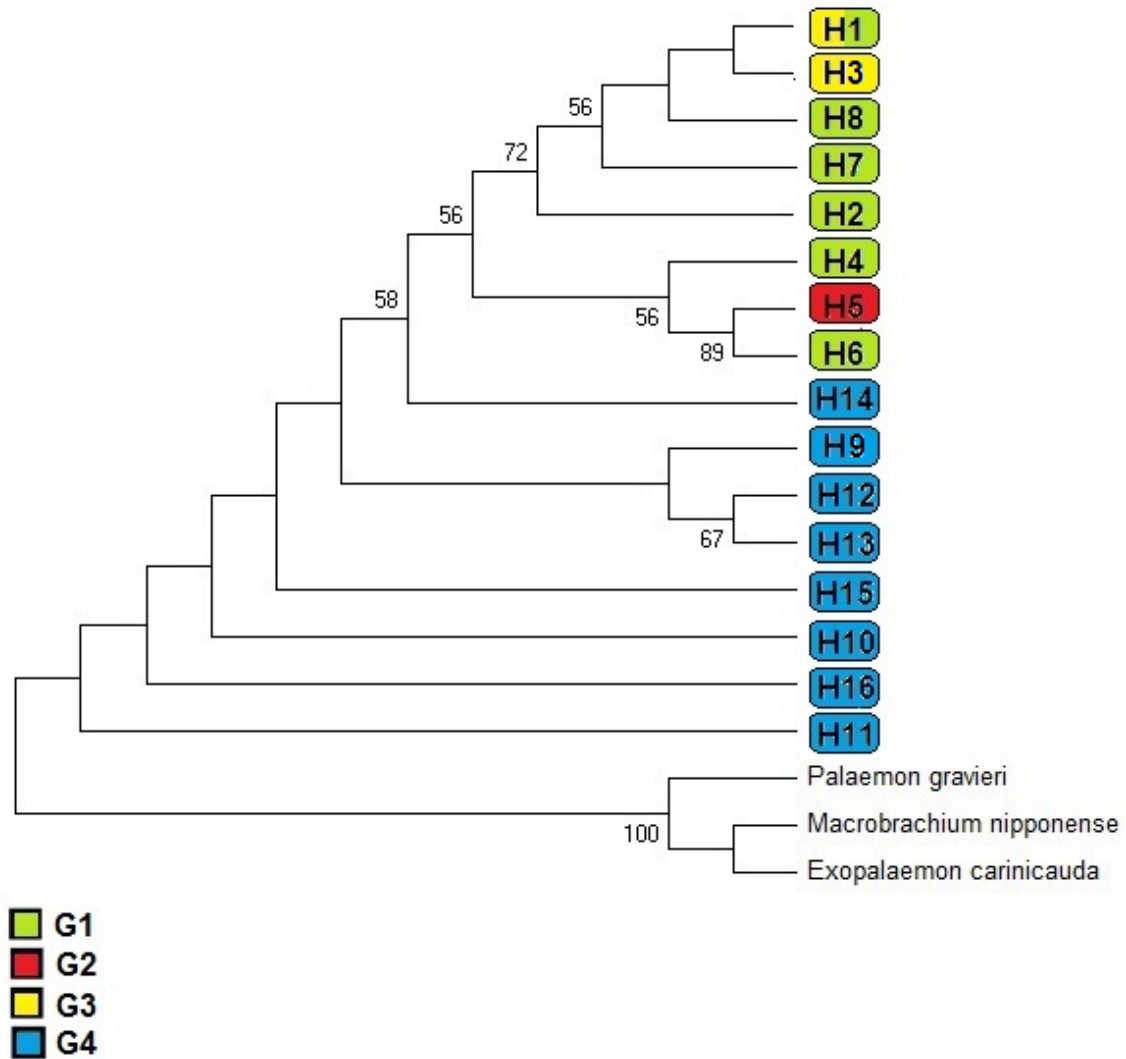


Figura 4.3 – Árvore de máxima verossimilhança estimada para os haplótipos de *P. argentinus*. Somente os valores de bootstrap acima de 50 são apresentados. As cores indicam os grupos estimados pela Samova

4.5. DISCUSSÃO

Esse é o primeiro trabalho sobre a diversidade genética molecular abrangendo toda a distribuição da espécie *P. argentinus*. Muitos trabalhos estudaram a ecologia e a fisiologia desses camarões, englobando dados sobre demografia, sobrevivência, fecundidade, crescimento, osmorregulação, efeitos fisiológicos de compostos químicos, reprodução, ciclo de mudas e variabilidade intraespecífica baseada em condições

Capítulo II

ambientais (Capitulo e Freyre 1995; Charmantier e Anger 1999; Dumont e D’Incao 2004; Felix e Petriella 2003; Ituarte *et al.* 2007; Montagna e Collins 2007). Apenas um trabalho (Souza 2010) abordou a genética das populações brasileiras desses organismos. Segundo Lee *et al.* (1999) a aplicação de ferramentas moleculares para estudos de espécies tidas como invasoras recentes de ambientes dulcícolas é uma importante abordagem, que pode fornecer informações sobre caminhos, datação, fontes e direção de invasões.

A presença de picos duplos pouco influenciou nas análises, visto que ao adotar critério conservador e utilizar o código N para não assumir a base amplificada, o sítio contendo tais considerações foi tido como não polimórfico. De fato, para todos os sítios que apresentaram esse comportamento atípico, todas as sequências não duvidosas apresentaram uma única base e, portanto, a opção adotada não suprimiu nenhum sítio sabidamente polimórfico. A presença de picos duplos parece não ser incomum em sequências mitocondriais de crustáceos, já sendo relatada na literatura (Luttikhuisen *et al.* 2007). Esses autores, consideram que, entre outras alternativas, as possíveis explicações para a origem dos produtos duplos de amplificação são a heteroplasmia ou a extração de DNA de dois indivíduos. Essa contaminação na extração é fácil de ocorrer, visto que fêmeas de crustáceos podem carregar esperma armazenado e/ou ovos fertilizados contendo mitocôndrias paternas. Para o presente estudo foram utilizados na extração de DNA os tecidos musculares do abdômen das amostras, e assim, pode ter ocorrido a eventualidade de utilizar parte da espermateca de algumas fêmeas.

O tempo de divergência entre as populações é refletido diretamente na diversidade genética, sendo que populações separadas há mais tempo apresentam maiores taxas de diversidade (Botello e Alvarez 2010). As lagoas apresentam barreiras físicas que limitam o contato de diferentes populações, influenciando diretamente na diferenciação

Capítulo II

genética da espécie. Assim, a baixa diversidade nucleotídica encontrada para *P. argentinus* pode ser decorrente do recente isolamento das lagoas amostradas. Dados semelhantes são relatados para outras espécies de palaemonídeos de água doce que apresentam histórias evolutivas recentes, como por exemplo, *Creaseria morleyi* (Botello e Alvarez 2010). Em populações que têm maior tempo de isolamento ou que tiveram curtos períodos de comunicação, o nível de diversidade é mais elevado, como em algumas populações do camarão-fada, *Phallocryptus spinosa*, que apresentaram maior variabilidade (aproximadamente 45% para o marcador COI) (Ketmaier *et al.* 2008).

Entre os grupos diagnosticados, a maior homogeneidade apresentada em várias análises pelo G4, permite a inferência de que as populações inclusas nesse grupo tiveram livre fluxo gênico e/ou apresentaram conectividade em um passado recente, ainda não suficiente para surgir divergências (Hughes *et al.* 2009). Dados semelhantes foram encontrados em um estudo sobre o camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, cujas populações isoladas demonstraram ser geneticamente relacionadas entre si, sugerindo que até recentemente essas populações estavam conectadas através de um lago com características dulcícolas/salobres existente antes do Golfo de Carpentaria (norte da Austrália) ser inundado durante as elevações do mar ocorridas no Quaternário (De Bruyn *et al.* 2004).

Apesar da grande homogeneidade observada para a espécie, a estruturação em grupos e as relações evolutivas entre os haplótipos, possibilitaram a verificação de que algumas populações distantes geograficamente estão mais intimamente relacionadas entre si do que com populações próximas (como por exemplo, as populações do G1 e G3). Em um trabalho sobre peixes presentes na PCSB foi encontrado resultado semelhante, onde animais de tributários distantes foram mais associados entre si do que àqueles mais próximos e essa conformação geográfica de diversificação foi analisada

Capítulo II

conforme o contexto histórico geológico das lagoas (Beheregaray *et al.* 2002). Essa abordagem biogeográfica, considerando o contexto das alterações ambientais decorrentes das últimas grandes alterações do nível do mar no Quaternário, pode ser esclarecedora também para o entendimento da história evolutiva de *P. argentinus*, visto que a estruturação genética populacional verificada para esses camarões não é claramente compreendida diante de uma análise geográfica da estrutura hidrográfica contemporânea.

Os padrões de mudança histórica na paisagem podem alterar a estrutura genética de uma espécie, uma vez que populações podem se conectar e/ou desconectar de acordo com alterações ambientais (Hughes *et al.* 2009). Sabe-se que os movimentos de transgressão e regressão marinhas do Quaternário afetaram diretamente a estruturação de várias espécies do sul da América do Sul, como peixes (Beheregaray *et al.* 2002), mamíferos (Lopes *et al.* 2013; Mora *et al.* 2006; Quintela *et al.* 2015; Roratto *et al.* 2015), e até mesmo plantas (Mäder *et al.* 2013). Essas modificações climáticas e geológicas podem também ser propostas como hipóteses que expliquem a estruturação genética populacional de *P. argentinus*.

Os eventos interglaciais do Pleistoceno superior (há cerca de 120 mil anos) parecem ser relevantes para o avanço de espécies marinhas sobre o continente, pois a elevação do nível do mar teria inundado grandes extensões de terra e possibilitado a invasão desses animais em ambientes de água doce. Na Argentina essa transgressão, conhecida como mar Belgranense, deixou registros fósseis de moluscos marinhos (Aguirre e Whatley 1995). No Brasil, essa transgressão possibilitou a deposição da laguna-barreira III, dando início ao isolamento de grandes corpos lagunares na PCSB. Acredita-se que essa transgressão seja a responsável pelo início da história evolutiva de *P. argentinus*, que teve seu tempo de divergência estimada entre 32.000 e 56.000 anos

Capítulo II

O evento regressivo subsequente, com duração entre 60.000 e 17.000 anos atrás, permitiu que a planície fosse regida por regimes fluviais que formaram lagoas de água doce ao longo de toda a costa atlântica do sul da América do Sul (Lambeck e Chappell 2001). A individualização das lagoas pode ter atuado com um evento vicariante para os animais represados. Estudos a respeito de peixes *Odonthestes perugiae* revelam que o isolamento das lagoas do norte da PCSB pode ter permitido o estabelecimento das primeiras linhagens dulcícolas desse complexo de espécies (Beheregaray *et al.* 2002). Análises genético-populacionais para *P. argentinus* da PCSB, demonstraram que a deposição da laguna-barreira III, formando os complexos lagunares Patos e Mirim, pode ser considerada o primeiro evento vicariante para a separação das populações do extremo norte de distribuição desses camarões (Souza 2010). Tal resultado é concordante com o encontrado no presente trabalho, que apresenta na região norte da PCSB as populações com maiores divergências (tabela suplementar).

A última grande transgressão marinha, que atingiu seu máximo há aproximadamente 5.000 anos, gerou elevação de mais de seis metros acima do atual nível do mar, inundando lagoas pré-existentes e possibilitando a conexão entre elas (Cavallotto *et al.* 2004; Villwock e Tomazelli 1995). As condições salinas podem ter prejudicado as espécies habitantes das lagoas inundadas. Porém, para *P. argentinus*, que apresenta alta tolerância ao incremento da salinidade (Ituarte *et al.* 2010), esse evento pode ter colaborado para o aumento do seu habitat, possibilitando a expansão populacional, indicada pelos testes de neutralidade do presente trabalho. Adicionalmente, a prolongada duração do estágio larval desses camarões (Menú-Marque 1973) pode ter permitindo a sua disseminação entre lagoas distantes que estavam em contato no momento transgressivo marinho. Essa suposição justifica a inexistência de correlação entre as distâncias geográficas e genéticas entre as

Capítulo II

populações e também explica a homogeneidade genética de todas as populações amostradas na Argentina, Uruguai e parte sul da PCSB.

Durante a regressão marinha do Holoceno o nível do mar decaiu, fazendo com que as lagoas deixassem de ter ampla conexão (Schwarzbold e Schäeffler 1984) o que pode ter permitido a formação de novas e isoladas populações de *P. argentinus*. Porém essa queda do nível do mar não foi contínua (Cavallotto *et al.* 2004), alterando de forma desigual a conexão entre as lagoas. Sabe-se que a inundação de algumas áreas foi limitada pela topografia antecedente, e que as lagunas-barreiras podem ter agido como barragens, impedindo o prolongado contato entre algumas lagoas e o mar (Tomazelli *et al.* 2000). Acredita-se, portanto que as regiões limítrofes norte e sul da PCSB, que apresentam somente a deposição da laguna-barreira IV (ver figuras em Villwock e Tomazelli 1995), podem ter tido maior tempo de contato com o ambiente marinho. Esse maior tempo de comunicação lagoa/mar ocorrido nos extremos norte e sul da PCSB explicaria o compartilhamento do haplótipo 1 entre as lagoas Caverá, Fortaleza (G1) e Negra (G3), cujo os camarões poderiam ter livre dispersão pelo mar. Os efeitos das eras glaciais também já foram considerados como responsáveis para uma recente recolonização detectada em populações do camarão *Crangon crangon*, que assim como *P. argentinus*, apresentaram haplótipos compartilhados entre regiões distantes. (Luttikhuisen *et al.* 2007)

Os resultados encontrados refletem uma significativa diferenciação histórica entre os camarões de lagoas do norte da PCSB e as demais lagoas da abrangência da espécie, o que pode representar um evento de alopatria seguida por grande expansão populacional e dispersão para o sul da distribuição, e a proximidade genética de populações geograficamente distantes pode ser consequência de um contato secundário entre elas.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar CAG, Muzio R (2006) Geología de la costa uruguaya y sus recursos minerales asociados. In: Menafrá R, Rodríguez-Gallego L, Scarabino F, D C eds., *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Vida silvestre uruguay, Montivideo, pp. 668.
- Aguirre ML, Whatley RC (1995) Late Quaternary marginal marine deposits and paleoenvironments from northeastern Buenos Aires province: a review. *Quaternary Science Reviews* **14**:223-254.
- Altermatt F, Alther R, Fiser C, Jokela J, Konec M, Kürty D, Mächler E, Stucki P, Westram AM (2014) Diversity and Distribution of Freshwater Amphipod Species in Switzerland (Crustacea: Amphipoda). *Plos-One* **9**:e110328.
- Ashelby CW, Page TJ, De Grave S, Hughes JM, Johnson ML (2012) Regional scale speciation reveals multiple invasions of freshwater in Palaemoninae (Decapoda). *Zoologica Scripta* **41**:293-306.
- Avisé J (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (2005) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**.
- Beheregaray LB, Sunnucks P, Briscoe DA (2002) A rapid fish radiation associated with the last sea level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **269**:65–73.
- Bond-Buckup G, Buckup L (1989) Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia* **48**:883-896.
- Botello A, Alvarez F (2010) Genetic variation in the stygobitic shrimp *Creaseria morleyi* (Decapoda: Palaemonidae), evidence of bottlenecks and re-invasions in the Yucatan Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society* **99**:315-325.
- Botello A, Alvarez F (2013) Phylogenetic relationships among the freshwater genera of palaemonid shrimps (Crustacea: Decapoda) from Mexico: evidence of multiple invasions? *Latin American Journal of Aquatic Research* **41**:773-780.
- Capitulo AR, Freyre LR (1995) Demografía de *Palaemonetes argentinus* Nobili (Decapoda Natantia) en La Laguna Chascomus, Buenos Aires, Argentina. Supervivencia, migraciones, biomasa y fecundidad. *Limnética* **11**:39-47.
- Cavallotto JL, Violante RA, Parker G (2004) Sea-level fluctuations during the last 8600 years in the de la Plata river (Argentina) *Quaternary International* **114**:155-165.

Capítulo II

- Charmantier G, Anger K (1999) Ontogeny of osmoregulation in the palaemonid shrimp *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda) *Marine Ecology Progress Series* **181**:125-129.
- De Bruyn M, Wilson JC, Mather PB (2004) Reconciling geography and genealogy: phylogeography of giant freshwater prawns from the Lake Carpentaria region. *Molecular Ecology* **13**:3515-3526.
- Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**:11-15.
- Dumont LFC, D'Incao F (2004) Growth and reproductive pattern of the caridean shrimp *Palaemonetes argentinus*, Nobili, 1901 (Decapoda: Palaemonidae) in the South of Rio Grande do Sul, Brazil. *Nauplius* **12**:151-163.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* **11**:2571-2581.
- Espinosa M, Francesco CD, Isla F (2003) Paleoenvironmental reconstruction of Holocene coastal deposits from the Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Journal of Paleolimnology* **29**:49-60.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**.
- Felix MML, Petriella AM (2003) Molt cycle of the natural population of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Palaemonidae) from Los Padres lagoon (Buenos Aires, Argentina). *Iheringia Série Zoologia* **93**:399-411.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**:294-299.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**:915-925.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role, in divergence and speciation *Biological Journal of the Linnean Society* **58**:247-276.
- Hillis D, Mable B, Larson A, Davis S, Zimmer E (1996) Nucleic acids IV: sequencing and cloning. In: Hillis D, Moritz C, BK M eds., *Molecular Systematic*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 321–381.
- Holthuis L (1952) A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. *Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation* **12**:1-396.
- Hughes JM, Schmidt DJ, Finn DS (2009) Genes in streams: using DNA to understand the movement of freshwater fauna and their riverine habitat. *BioScience* **59**:573-583.

Capítulo II

- Hunter RL, Webb MS, Iliffe TM, Bremer JRA (2008) Phylogeny and historical biogeography of the cave-adapted shrimp genus *Typhlatya* (Atyidae) in the Caribbean Sea and western Atlantic. *Journal of Biogeography* **35**:65-75.
- Ituarte RB, Spivak ED, Anger K (2007) Intraspecific variability in life-history traits of a freshwater shrimp, *Palaemonetes argentinus*. *Annales de Limnologie* **43**:293-302.
- Ituarte RB, Spivak ED, Camiolo M, Anger K (2010) Effects of salinity on the reproductive cycle of female freshwater shrimp, *Palaemonetes argentinus*. *Journal of Crustacean Biology* **30**:186-193.
- Ketmaier V, Pirolo D, De Matthaes E, Tiedemann R, Mura G (2008) Large-scale mitochondrial phylogeography in the halophilic fairy shrimp *Phallocryptus spinosa* (Milne-Edwards, 1840) (Branchiopoda: Anostraca). *Aquat Sci* **70**:65-76.
- Knowlton N, Weigt LA (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **265**:2257-2263.
- Lambeck K, Chappell J (2001) Sea level change through the last glacial cycle. *Science* **292**:679-686.
- Lee CE, Bell MA (1999) Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. *Trends in Ecology and Evolution* **14**:284-288.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**:1451-1452.
- Liu M-Y, Cai Y-X, Tzeng C-S (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**:272-289.
- Lopes CM, Ximenes SSF, Gava A, de Freitas TRO (2013) The role of chromosomal rearrangements and geographical barriers in the divergence of lineages in a South American subterranean rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). *Heredity (Edinburgh Print)* **111**:293-305.
- López RÁ, Marcomino SC (2011) *Problemática de los ambientes costeros*. Editorial Croquis S.R.L., Buenos Aires.
- Luttikhuisen PC, Campos J, Bleijswijk Jv, Peijnenburg KTCA, Veer HWvd (2007) Phylogeography of the common shrimp, *Crangon crangon* (L.) across its distribution range. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**:1015-1030.
- Mäder G, Fregonezi JN, Lorenz-Lemke AP, Bonatto SL, Freitas LB (2013) Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. *BMC Evolutionary Biology* **13**:178.

Capítulo II

- Menú-Marque SA (1973) Desarrollo larval de *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) en el laboratorio (Crustacea, Caridea, Palaemonidae). *Phylis* **32**:149-169.
- Miller MP (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* **96**:722-724.
- Montagna MC, Collins PA (2007) Survival and Growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) Exposed to Insecticides with Chlorpyrifos and Endosulfan as Active Element. . *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **53**:371-378.
- Mora MS, Lessa EP, Kittlein MJ, Vassallo AI (2006) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy* **87**:1192-1203.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Quintela FM, Gonçalves GL, Bertuol F, González EM, Freitas TRO (2015) Genetic diversity of the swamp rat in South America: Population expansion after transgressive-regressive marine events in the Late Quaternary. *Mammalian Biology* **80**:510-517.
- Roratto PA, Fernandes FA, de Freitas TRO (2015) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys torquatus* : an evaluation of the riverine barrier hypothesis. *Journal of Biogeography* **42**:694-705.
- Schubart CD, Diesel R, Hedges SB (1998) Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature* **393**:363-365.
- Schwarzbold A, Schaeffer A (1984) Gênese e morfologia das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil. *Amazoniana* **9**:81-104.
- Souza GOd (2010) *Análise da estrutura genética populacional de Palaemonetes argentinus, Nobili 1901 (Decapoda: Palaemonidae) na região costeira do sul do Brasil*. Instituto de Oceanografia, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande - RS.
- Spivak ED (1997) Life history of a brackish-water population of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda: Caridea) in Argentina. *Annales de Limnologie* **33**:179-190.
- Tajima F (1989) Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**:585-595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**:2725-2729.
- Tomazelli LJ, Dillenburg SR, Villwock JA (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul Coastal plain, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Geociências* **30**:474-476.

Capítulo II

- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* **22**:1193-1213.
- Villwock JA, Tomazelli LJ (1995) Geologia Costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* **8**:1-45.
- Zhang D, Ding G, Ge B, Zhang H, Tang B, Yang G (2014) Comparative phylogeography of two marine species of crustacean: Recent divergence and expansion due to environmental changes. *Gene* **550**:141-147.

4.7. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S 4.1 – Coeficientes de diferenciação entre populações de *P. argentinus*

| | CAVE | ITAP | PING | ARMA | FORT | FIGU | SUMI | MIRI | NEGR | CAST | ROCH | GARZ | SAUC | CISN | CALC | STAL | CHAS | BURR | VIVO | BRAV | PADR | |
|------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------|---------|
| CAVE | * | 0.99099 | 0.02703 | 0.99099 | 0.11712 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.27928 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00901 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | |
| ITAP | 0.52381 | * | 0.19820 | 0.99099 | 0.56757 | 0.06306 | 0.16216 | 0.16216 | 0.04505 | 0.14414 | 0.04505 | 0.07207 | 0.12613 | 0.16216 | 0.14414 | 0.18919 | 0.04505 | 0.12613 | 0.07207 | 0.09910 | 0.14414 | |
| PING | 0.78972 | 1.00 | * | 0.99099 | 0.16216 | 0.04505 | 0.00000 | 0.07207 | 0.00000 | 0.00901 | 0.01802 | 0.00901 | 0.01802 | 0.05405 | 0.00901 | 0.05405 | 0.00901 | 0.01802 | 0.00901 | 0.02703 | 0.04505 | |
| ARMA | 0.75610 | 1.00 | 0.00000 | * | 0.29730 | 0.14414 | 0.22523 | 0.19820 | 0.05405 | 0.11712 | 0.04505 | 0.06306 | 0.09910 | 0.18018 | 0.13514 | 0.12613 | 0.10811 | 0.09009 | 0.07207 | 0.07207 | 0.17117 | |
| FORT | 0.05583 | -0.34615 | 0.36652 | 0.16667 | * | 0.00000 | 0.00000 | 0.00901 | 0.02703 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00901 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00901 | 0.00000 | |
| FIGU | 0.84997 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.72723 | * | 0.99099 | 0.99099 | 0.00000 | 0.99099 | 0.60360 | 0.99099 | 0.13514 | 0.12613 | 0.99099 | 0.99099 | 0.99099 | 0.99099 | 0.27928 | 0.25225 | 0.99099 | 0.99099 |
| SUMI | 0.74834 | 0.63636 | 0.84012 | 0.81818 | 0.64473 | -0.03165 | * | 0.99099 | 0.00000 | 0.99099 | 0.27027 | 0.37838 | 0.82883 | 0.37838 | 0.99099 | 0.99099 | 0.42342 | 0.07207 | 0.15315 | 0.99099 | 0.99099 | |
| MIRI | 0.81964 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.65000 | 0.00000 | -0.08911 | * | 0.00000 | 0.99099 | 0.53153 | 0.99099 | 0.99099 | 0.37838 | 0.99099 | 0.99099 | 0.99099 | 0.17117 | 0.52252 | 0.99099 | 0.99099 | |
| NEGR | 0.02528 | 0.93103 | 0.96764 | 0.96491 | 0.22993 | 0.97729 | 0.89181 | 0.97335 | * | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 |
| CAST | 0.86486 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.76150 | 0.00000 | -0.00917 | 0.00000 | 0.97932 | * | 0.48649 | 0.99099 | 0.16216 | 0.08108 | 0.99099 | 0.99099 | 0.99099 | 0.99099 | 0.07207 | 0.26126 | 0.99099 | 0.99099 |
| ROCH | 0.85082 | 0.87692 | 0.94163 | 0.93634 | 0.77250 | 0.02041 | 0.03264 | -0.03576 | 0.95176 | 0.04328 | * | 0.40541 | 0.12613 | 0.13514 | 0.54054 | 0.52252 | 0.44144 | 0.00901 | 0.06306 | 0.47748 | 0.56757 | |
| GARZ | 0.87701 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.78793 | 0.00000 | 0.00826 | 0.00000 | 0.98102 | 0.00000 | 0.06145 | * | 0.08108 | 0.05405 | 0.99099 | 0.99099 | 0.99099 | 0.02703 | 0.18919 | 0.99099 | 0.99099 | |
| SAUC | 0.77973 | 0.71429 | 0.88017 | 0.85714 | 0.63684 | 0.02041 | -0.04741 | -0.05528 | 0.93060 | 0.05405 | 0.05882 | 0.08197 | * | 0.54054 | 0.25225 | 0.99099 | 0.29730 | 0.18018 | 0.11712 | 0.18919 | 0.99099 | |
| CISN | 0.74474 | 0.62500 | 0.86928 | 0.83333 | 0.55435 | 0.36340 | 0.02791 | 0.25000 | 0.93008 | 0.41748 | 0.18288 | 0.46188 | -0.02351 | * | 0.08108 | 0.39640 | 0.07207 | 0.06306 | 0.08108 | 0.09009 | 0.20721 | |
| CALC | 0.85782 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.74556 | 0.00000 | -0.01957 | 0.00000 | 0.97835 | 0.00000 | 0.03263 | 0.00000 | 0.03817 | 0.39189 | * | 0.99099 | 0.99099 | 0.06306 | 0.30631 | 0.99099 | 0.99099 | |
| STAL | 0.81964 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.65000 | 0.00000 | -0.08911 | 0.00000 | 0.97335 | 0.00000 | -0.03576 | 0.00000 | -0.05528 | 0.25000 | 0.00000 | * | 0.99099 | 0.20721 | 0.45045 | 0.99099 | 0.99099 | |
| CHAS | 0.86633 | 0.93103 | 0.96764 | 0.96491 | 0.78855 | -0.04523 | 0.01474 | -0.09771 | 0.96552 | 0.02593 | 0.05128 | 0.01158 | 0.05474 | 0.34365 | -0.03474 | -0.09771 | * | 0.05405 | 0.09009 | 0.99099 | 0.99099 | |
| BURR | 0.80554 | 0.77444 | 0.89497 | 0.87755 | 0.67837 | 0.28571 | 0.13786 | 0.20000 | 0.93626 | 0.32773 | 0.25950 | 0.36340 | 0.16294 | 0.27283 | 0.30769 | 0.20000 | 0.29656 | * | 0.02703 | 0.07207 | 0.23423 | |
| VIVO | 0.81502 | 0.76667 | 0.88736 | 0.87500 | 0.73052 | 0.06806 | 0.05999 | 0.00799 | 0.92390 | 0.09408 | 0.11268 | 0.11543 | 0.06724 | 0.20462 | 0.08184 | 0.00799 | 0.10633 | 0.21309 | * | 0.26126 | 0.41441 | |
| BRAV | 0.86486 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.76150 | 0.00000 | -0.00917 | 0.00000 | 0.97932 | 0.00000 | 0.04328 | 0.00000 | 0.05405 | 0.41748 | 0.00000 | 0.00000 | -0.02593 | 0.32773 | 0.09408 | * | 0.99099 | |
| PADR | 0.84115 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.70588 | 0.00000 | -0.04620 | 0.00000 | 0.97612 | 0.00000 | 0.00592 | 0.00000 | 0.00000 | 0.33121 | 0.00000 | 0.00000 | -0.05814 | 0.26121 | 0.05208 | 0.00000 | * | |

5. CAPÍTULO III

CRYPTIC SPECIES OR INTRASPECIFIC VARIABILITY? HIGH GENETIC VARIATION IN THE FRESHWATER PRAWN *MACROBRACHIUM POTIUNA* (DECAPODA, PALAEMONIDAE) BASED ON 16S RRNA SEQUENCES

Gisele O. Souza ¹, Gislene L. Gonçalves ^{2,3}, Georgina Bond-Buckup ¹, Thales R. O. Freitas ^{1,2}

1 - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9.500, Prédio 43435, Porto Alegre-RS, 91501-970, Brazil. E-mail: gisouza@gmail.com

2 - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9.500, Prédio 43.323, 91501-970, Porto Alegre-RS, Brazil.

3 Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá, Antofagasta 1520, Arica, Chile

Running title: Genetic variation in the freshwater prawn

Keywords: Atlantic Forest, isolation by distance, mitochondrial DNA, molecular taxonomy, species boundaries

ARTIGO SUBMETIDO À GENETIC AND MOLECULAR BIOLOGY (EM 29/12/2015)

5.1. ABSTRACT

Macrobrachium potiuna is an endemic species from freshwater drainage systems in Brazil, and shows low morphological variation. Recently, molecular analyses detected two highly divergent intraspecific groups: ‘sensu stricto’ (CSS) and ‘affinis’ (CA), suggesting the existence of cryptic species. However, these analyses did not include samples from the species’ southernmost distribution (CSM). The aim of this study is to characterize the genetic variability of *M. potiuna* throughout its entire distribution range, adding new populations from the southernmost occurrence. Analyses were based on partial sequences of the mitochondrial 16S rRNA gene. Individuals from the CSM formed a strongly supported clade, sister to CSS-II and I, within CSS. The CSM presented ca. 5% of genetic divergence in relation to its sister clade and to CA. A strong association between genetic and geographic distances was found for CSS. This suggests that the divergence observed between groups could have resulted from population genetic structure, due to isolation by distance. The intraspecific genetic distance found in *M. potiuna* is within the known range of other *Macrobrachium* species. The CA clade was previously proposed as a potential cryptic species, since it showed a deeper genetic divergence compared to the CSS. Despite of morphological similarity, we suggest that two levels of the same evolutionary process are acting to determine and maintain the intraspecific variation in CSS (isolation by distance due to limited dispersal) and putative new species in the CA (adaptive response for a particular environment).

5.2. INTRODUCTION

Species is the fundamental unit of biogeography, evolutionary biology and conservation (Coyne and Or 2004; Mace 2004). Therefore, the delimitation of species boundaries, and new taxa discovery, is critical (Sites and Marshall 2003). Conversely, inaccurately classification of individuals or populations to species could result in erroneous inferences in any analysis that require a priori designation of species limits, such as comparative assessments of diversification (Bickford *et al.* 2007; Ruane *et al.* 2013) or misallocation of conservation resources. However, the definition of species boundaries is challenging in many taxa, such as in ‘non-adaptive radiations’ that include morphologically cryptic lineages (e.g. (Barão *et al.* 2014). The freshwater prawn *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 is a striking example of complex taxonomy.

Macrobrachium is one of the most diverse genera of Palaemonidae, with approximately 240 recognized species. The genus has a circumtropical distribution and occupies different freshwater and brackish environments, such as lakes, rivers, estuaries, and lagoons (Wowor *et al.* 2009). In general, species of *Macrobrachium* present a well conserved external morphology (Acuña-Gómez *et al.* 2013), although marked intraspecific variation are found in some taxa (Pileggi and Mantelatto 2012). Overall, the taxonomy of the group is based on characters of the rostrum and the second pair of pereiopods. However, these characters might be very similar in some species, which makes the diagnosis difficult (Holthuis 1952). Additionally, the morphological plasticity makes species identification even more confuse (Álvarez *et al.* 2014).

Molecular tools have been particularly useful to solve taxonomic problems within freshwater prawns (Pileggi and Mantelatto 2010; Rintelen *et al.* 2007; Vergamini *et al.* 2011). Several uncertainties were resolved through the study of mitochondrial

Capítulo III

DNA (mtDNA) regions, which led to species redefinitions (Mantelatto *et al.* 2011; Rintelen *et al.* 2007; Rossi and Mantelatto 2013). Moreover, recent studies have been detecting cryptic species using mtDNA analysis (Almeida *et al.* 2014; Liu *et al.* 2007).

Cryptic species can arise from speciation processes that did not result in morphological differences, but derived genetically distinct groups. In the last 10 years, DNA sequencing has been frequently used in taxonomic studies due to its reduced cost and high recovery rate, helping to detect and infer mechanisms of differentiation between species. Such approach improved the knowledge about groups that have been only defined by morphological characters (Bickford *et al.* 2007).

Macrobrachium potiuna Müller, 1880 (Decapoda, Palaemonidae) is an endemic species from freshwater drainage systems in Brazil. It has low morphological variation (Pileggi and Mantelatto 2010), but comprises potentially distinct genetic groups (Carvalho 2014). Molecular analyses of the mitochondrial 16S rRNA gene of *M. potiuna* detected the existence of two divergent clades (~5%), associated to different ecological characteristics (i.e. habitat and lifestyle). The first was named ‘sensu stricto’ clade (CSS), and included individuals from clear, lotic and rocky-bottom watercourses. The second group, the “affinis” clade (CA), included individuals from turbid waters and lentic watercourses with marginal vegetation (Carvalho 2014). Carvalho *et al.* (2013) suggested that *M. potiuna* is a cryptic species complex.

Population structure can be caused by different mechanisms and ongoing/historical events, either as an adaptive response to the environment (i.e. local adaptation to a particular habitat), or as a by-product of an event that affected populations, such as vicariance. A particular event that progressively reduces gene flow, similar to a vicariant barrier, is isolation by distance (IBD). This is a simple consequence of limited dispersal across space, i.e. it is expected that pairs of

Capítulo III

populations close to each other will present more genetic similarities than distant populations, not because of any selective need for those genetic similarities, but because individuals (or their larvae), are less likely to travel longer distances (Wright 1943). Thus, broadly distributed species with low dispersion capabilities, such as *M. potiuna*, are highly susceptible to IBD.

In this study, we characterized the genetic variability of *M. potiuna* throughout its entire distribution range, including populations from the southernmost occurrence, using sequences of the mitochondrial 16S RNA ribosomal (rRNA) gene. We hypothesized that an ongoing event, such as reduced gene flow due to IBD, is causing population structuring, particularly in the CSS group. Alternative processes underlying the genetic differences among groups of *M. potiuna* are discussed as well.

5.3. MATERIAL AND METHODS

5.3.1. Taxa sampling and 16S rRNA sequence acquisition

In order to cover, for the first time, the southernmost distribution of *M. potiuna*, individuals were collected in the states of Rio Grande do Sul (RS) and Santa Catarina (SC) (n = 11). These were analyzed together with data obtained by Carvalho *et al.* (2013), to account for the entire distribution of the species (Figure 5.1). *Macrocrachium borelli* (n = 6) is closely related to *M. potiuna*, and occur in sympatry in the southernmost location of *M. potiuna*, according (Pileggi and Mantelatto 2010). We thus decided to investigate the relationship between populations of these species, since we had original samples of *M. potiuna* from the contact area at the South of Brazil. In addition, several closely related species (Carvalho 2014) were included in the analysis using data from the GenBank (Table 5.1).

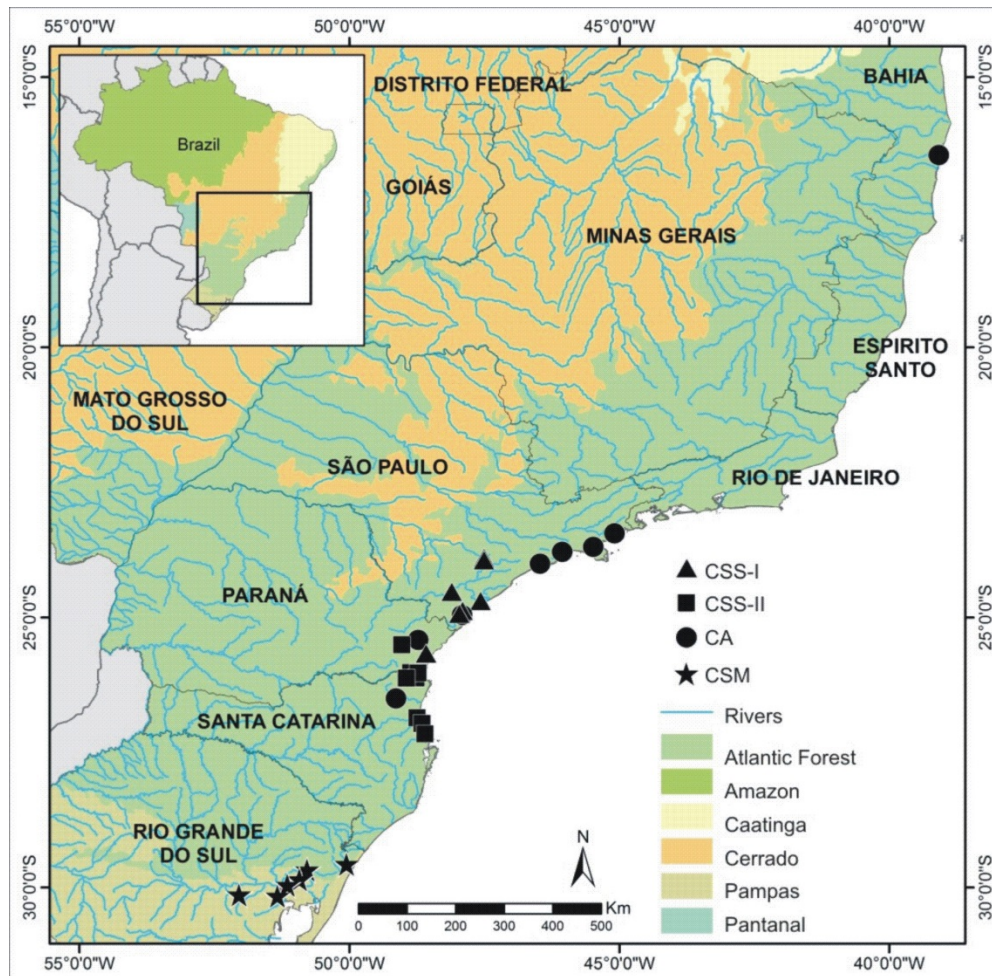


Figure 5.1. Geographical distribution of *Macrobrachium potiuna* along the Brazilian coast. The symbols indicate the main clades recovered in the Bayesian analysis (CA, CSS-II and I, CSM). The stars indicate the populations from the southernmost range of distribution which formed the new clade CSM.

Genomic DNA was purified from the 11 individuals of southernmost area (n=6 from RS; n=5 from SC), and from six individuals of *M. borelli* obtained from the Carcinological Collection of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Tissue from the abdominal muscle was used for DNA extraction, using the CTAB method (Doyle and Doyle 1987). A fragment encoding the 16S ribosomal RNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR), using the universal primers 16Sar (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') and 16Sbr (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Palumbi and Benzie 1991), following the

Capítulo III

protocol and conditions described by Carvalho *et al.* (2013). The PCR products were purified using the enzymatic method (Exonuclease I and Thermosensitive Alkaline Phosphatase), and sequenced on an ABI 3700XL (Applied Biosystems) sequencer with the 16Sar primer. The obtained sequences were deposited in the GenBank, under the accession numbers xxx-xxx (Table 5.1).

Table 5.1. *Macrobrachium* individuals used in the phylogenetic analysis, with sample location, catalogue number in their respective collections, and GenBank access number.

| Species | Locality* | Catalogue | Genbank |
|-------------------|-----------------------|-------------|----------|
| INGROUP | | | |
| <i>M. potiana</i> | BR, BA: Porto Seguro | CCDB 1661-1 | JX466929 |
| | | CCDB 1161-2 | JX466930 |
| | BR, SP: Ubatuba | CCDB 2481 | JX466940 |
| | BR, SP: Caraguatatuba | CCDB 2844 | JX466947 |
| | BR, SP: Bertiooga | CCDB 3745 | JX466945 |
| | BR, SP: Praia Grande | CCDB 3747 | JX466944 |
| | BR, SP: Tapiraí | CCDB 2498 | JX466931 |
| | | CCDB 2499 | JX466938 |
| | BR, SP: Iguape | CCDB 2496 | JX466934 |
| | BR, SP: Eldorado | CCDB 2131 | HM352438 |
| | BR, SP: Cananéia | CCDB 1092 | JX466943 |
| | | CCDB 2456 | JX466946 |
| | | CCDB 3653 | JX466937 |
| | | CCDB 3652 | JX466936 |
| | | CCDB 3664 | JX466942 |
| | BR, PR: Antonina | CCDB 2132 | HM352439 |
| | BR, PR: Piraquara | CCDB 2471 | JX466933 |
| | BR, PR: Matinhos | CCDB 2283 | JX466935 |
| | BR, SC: Itajaí | CCDB 1921 | JX466941 |
| | | CCDB 1920 | JX466939 |
| BR, SC: Garuva | CCDB 2281 | JX466932 | |
| | UFRGS 5882 | - | |

Capítulo III

| | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|------------|----------|
| | | UFRGS 742 | - |
| | BR, SC: Jaraguá do Sul | UFRGS 647 | - |
| | BR, SC: Joinville | UFRGS 2649 | - |
| | BR, SC: Porto Belo | UFRGS 648 | - |
| | BR, RS: Terra de Areia | UFRGS 2235 | - |
| | BR, RS: Taquara | UFRGS 2820 | - |
| | BR, RS: Gravataí | UFRGS 387 | - |
| | BR, RS: Canoas | UFRGS 396 | - |
| | BR, RS: Guaíba | UFRGS 117 | - |
| | BR, RS: Minas do Leão | UFRGS 4895 | - |
| <i>M.petronioi</i> | BR, SP: Cananéia | MZUSP 8037 | HM352440 |
| OUTGROUP | | | |
| <i>M. amazonicum</i> | BR, Itacoatiara | CCDB 2085 | HM352443 |
| <i>M.borellii</i> | BR, RS: Uruguaiana | UFRGS 983 | |
| | BR, RS: Sta Vitória do Palmar | UFRGS 2673 | |
| | AR, Provincia Salla | UFRGS 3219 | |
| | AR, Buenos Aires | UFRGS 3669 | GU929445 |
| <i>M. borellii</i> | BR, RS: Candelária | UFRGS 3407 | |
| | BR, RS: Porto Alegre | UFRGS 3491 | |
| | UY, Dep Rivera | UFRGS 4239 | |
| <i>M.brasiliense</i> | BR, Serra Azul | CCDB 2135 | GU929446 |
| <i>M. iheringi</i> | BR, Itatinga | CCDB 2126 | HM352432 |
| <i>M. olfersii</i> | VZ, Isla Margarita | CCDB 2446 | HM352460 |
| <i>Cryphiops brasiliensis</i> | BR, DF: Brasília | CCDB 2195 | HM352434 |

*BR, Brazil; UR, Uruguay; AR, Argentina; VZ, Venezuela

5.3.2. Molecular phylogeny and genetic diversity analysis

Sequences were aligned using the software MUSCLE (*Multiple Sequence Alignment*; www.ebi.ac.uk/tools/msa/muscle) within MEGA 6 (Tamura *et al.* 2011). In order to characterize the genetic relatedness of haplotypes from the southernmost distribution to those already described for *M. potiuna*, a genealogical inference was performed through a phylogenetic tree and haplotype network. The tree reconstruction

Capítulo III

included individuals from clades already described (CSS and CA), as well as related taxa (*M. borelli*, *M. amazonicum*, *M. olfersii*, *M. brasiliense*, *M. iheringi* and *Cryphiops brasiliensis*). Bayesian inference was performed to estimate relationships using BEAST 2.02 (Drummond *et al.* 2012). We used the HKY substitution model (chosen based on the Akaike Information Criterion), with variation of substitution rates between sites, and gamma distribution. Clades with posterior probability (PP) > 95% were considered as well-supported (Alfaro *et al.* 2003; Douady *et al.* 2003; Lewis *et al.* 2005).

5.3.3. Intra- and interspecific genetic distance

In order to characterize the genetic divergence between the clades supported by the Bayesian inference herein and those previously found by Carvalho *et al.* 2013, the pairwise genetic distance was calculated. We used Kimura-2-parameter model to calculate the mean distances, using MEGA 6, with 1000 bootstrap replications. Inter- and intraspecific divergence in *Macrobrachium* was estimated based on 208 sequences from 48 taxa available in GenBank (Tabela S 5.1).

Haplotypes were defined using DnaSP 5 (Librado and Rozas 2009). A haplotype network was built in Network 4.6 (<http://www.fluxus-engineering.com>), using the median joining method (Bandelt *et al.* 2005).

The hypothesis of reduced gene flow, specifically based on IBD, underlying genetic structure of populations, was tested with Pearson correlation between the geographical (linear) and genetic distance matrices, using pairwise localities from the CSS clade. A Mantel test (Mantel 1967) with 10000 permutations (χ^2 , $\alpha = 0.05$) was performed using XLSTAT 2015.3 (Addinsoft).

5.4. RESULTS

We observed 124 (26%) variable sites in the 11 new sequences of *M. potiuna*. The phylogenetic analysis resulted in a topology similar to Carvalho *et al.* (2013). The monophyly of *M. potiuna* was highly supported (PP = 1), and the split into two internal clades (CSS and CA) was recovered (Figure 5.2). Similar to previous findings (Carvalho 2014), two subclades within the CSS (PP = 0.96) were found: CSS-II and I. These were composed by individuals from geographically close localities: CSS-I (PP = 0.99) was formed by individuals from the coastal plains of São Paulo (SP) and Paraná (PR) states, while the CSS-II (PP = 0.98) was composed by individuals from Santa Catarina (SC) and *Serra do Mar* (PR). Additionally, a well-supported clade (PP=1) within the CSS was observed, hereafter named as “southernmost” clade (CSM). The CSM included only individuals from the southernmost localities (RS), closely related to the two groups formed by individuals from the southeast/south of Brazil (SP, PR and SC). The CSM individuals inhabit small river tributaries (that might have fast currents, environment similar to CSS) often presenting marginal vegetation (Bond-Buckup, personal communication).

Capítulo III

olfersii and *M. potiuna* CSM). Intraspecific divergences in *Macrobrachium* ranged from 0% to 9.3%, and the interspecific ranged from 3 to 25% (Figure 5.3, 5.5).

Table 5.2. Pairwise genetic distance (Kimura-2-parameter) based on 16S rRNA sequences between clades of *Macrobrachium potiuna* (in bold) recovered in the Bayesian analysis, and between closely related species.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1. <i>M. olfersii</i> | | | | | | | | | |
| 2. <i>M. amazonicum</i> | .117 | | | | | | | | |
| 3. <i>Cryphiops brasiliensis</i> | .131 | .128 | | | | | | | |
| 4. <i>M. iheringi</i> | .142 | .127 | .066 | | | | | | |
| 5. <i>M. brasiliense</i> | .171 | .137 | .096 | .126 | | | | | |
| 6. <i>M. borellii</i> | .134 | .107 | .095 | .079 | .089 | | | | |
| 7. <i>M. potiuna</i> CA | .145 | .123 | .090 | .087 | .104 | .067 | | | |
| 8. <i>M. potiuna</i> CSS - I | .129 | .121 | .088 | .075 | .101 | .069 | .040 | | |
| 9. <i>M. potiuna</i> CSS- II | .137 | .129 | .091 | .080 | .113 | .076 | .052 | .014 | |
| 10. <i>M. potiuna</i> CSM | .154 | .142 | .100 | .102 | .119 | .083 | .061 | .034 | .041 |

Capítulo III

To investigate the cryptic speciation process in the CSM clade, based on the criteria established by Held (2003), the pairwise genetic distances were estimated considering only the two CSSs and the CSM clades (Figure 5.3). The genetic distances intra groups (0–2.5% for CSS, 0–0.9% for CSM) and inter groups (2.7–4.9%) resulted in distinct patterns, with a clear bimodal distribution and no evidence of intermediate values.

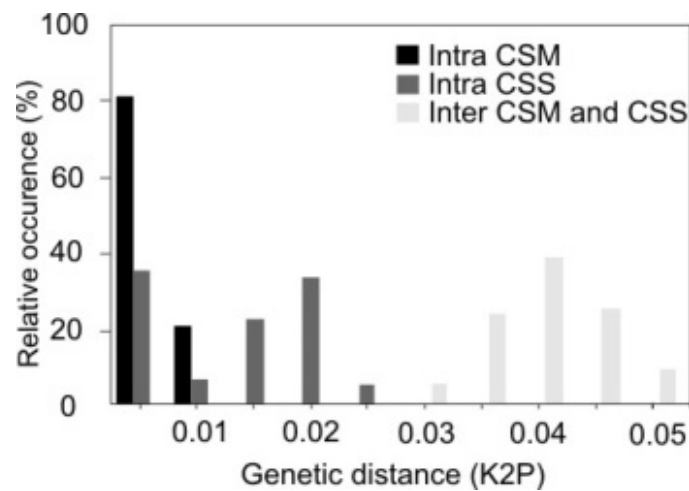


Figure 5.3. Intraspecific pairwise genetic distances (Kimura 2-parameter) in *Macrobrachium potiuna*, based on sequences of 16S. Clades CSM and CSS refers to groups recovered in the Bayesian analysis.

The Mantel test (Figure 5.4) showed a strong and highly significant correlation between the genetic and geographic distances between *M. potiuna* populations ($r = 0.8$; $P < 0.001$), suggesting an IBD process for the regional groups of CSS and CSM.

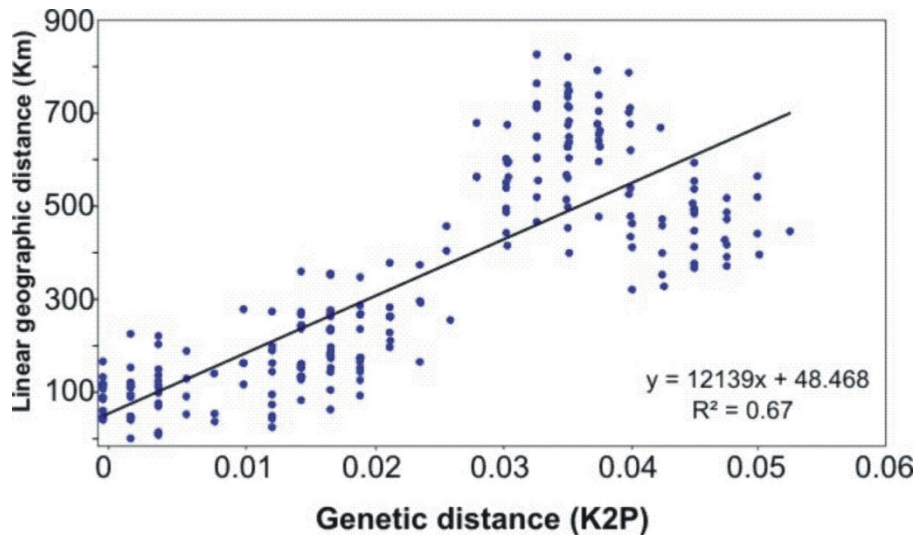


Figure 5.4. Relation between geographic and genetic distance (Kimura 2-parameter) in the major clade of *Macrobrachium potiuna*. (Correlation analysis: $r = 0.82$; Mantel-test: $P < 0.05$).

5.5. DISCUSSION

5.5.1. Intraspecific Variability

Individuals of *M. potiuna* from the southernmost distribution grouped as a distinct clade in relation to those formed by populations previously analyzed (Carvalho 2014). The observed genetic distance, ca. 3.5%, falls within the intraspecific range found for other *Macrobrachium* species. Conspicuous external morphological differences were not identified in the CSM, since the morphology of *M. potiuna* is highly conserved. Although morphological characters were not able to distinguish *M. potiuna* groups (Pileggi and Mantelatto 2012), further detailed comparative analyses could be useful to rule out the hypothesis of phenotypic distinction between CSM and major CSS (CSS-I and CSS-II).

Based on the 16S sequencing, we suggest that the genetic variation found in the CSS clade resulted from a population structure caused by isolation by distance. The geographical distance can affect the genetic divergence, especially in the case of freshwater organisms that depend on the connections between adjacent water bodies for

Capítulo III

dispersion. Since the dispersion capacity of *M. potiuna* is limited due to its abbreviated free-swimming larval stage, low gene flow can be expected, particularly in the extremes of the distribution, acting as a vicariant barrier. The abbreviated larval period can hamper dispersion even between close tributaries. Consequently, the reduced gene flow between distinct drainages may lead to local accumulation of mutations, and/or losses of variants, and could explain the high genetic divergence found between the clades. The significant correlation between the genetic and geographical distances indicates a strong spatial structure in the major clade CSS. Therefore, it is possible to assume that intraspecific genetic differentiation resulted from the genetic structure of the studied populations. Likewise, the genetically similar subclades CSS-II and I show a marked structure, supporting the hypothesis of IBD. The genetic divergence observed between the CA, CSS, and CSM clades exceeds the interspecific distances reported for the 16S gene of other crustaceans (Grandjean *et al.* 2002; Tong *et al.* 2000). Differences were also evident in the haplotype network, as there were no shared haplotypes between clades.

According to Carvalho *et al.* (2013), environmental and niche differences might have been acting as ecological barriers, leading to the genetic differentiation between CA and CSS. However, individuals from the CSM and CA clades occur in the same biome, the Atlantic Forest (even though CSM occupy a transitional zone between Atlantic Forest and Pampas). Moreover, they are found in similar environmental conditions, according to general description of the species' habitat (Bond-Buckup and Buckup 1989). Contrary to the CA, differences in ecological characteristics are not evident for the CSS clades (CSS-II and I, and CSM), therefore, local adaptation to a particular environment can be ruled out in this case.

Capítulo III

5.5.2. Genetic divergence in Macrobrachium

The mean intraspecific divergence of *M. potiuna* is high, compared to other species of the genus, and overlaps the interspecific variability (Murphy and Austin 2002). The range of inter- and intraspecific divergence in *Macrobrachium* is an intriguing characteristic of this genus, as there is an overlap between their distribution (see Figure 5.5). This fact raises the question of whether the high genetic variability is an inherent characteristic of the group, or if it is an evidence of taxonomic concerns. The results obtained here are similar to those found for *M. rosebergii* De Man, 1879 (De Bruyn *et al.* 2004), in which the intraspecific genetic distance was 6.2%, and the evident geographic structure suggested a sub-specific status for the clades studied. Despite the strong evidences, the authors did not indicate this as a case of cryptic speciation due to the constraints of using a single molecular marker analysis.

5.5.3. Taxonomic considerations

Held (2003) used the mitochondrial 16S rRNA to identify cryptic species of *Ceratoserolis trilobitoides* (Eights, 1833) (Crustacea: Isopoda), and proposed the following criteria as evidences of cryptic speciation: (I) the pairwise genetic distances have a bimodal distribution, without overlap between intra- and interspecific values; (II) the differentiation between groups is compatible with estimates for the same gene in related species; and (III) maintenance of high levels of genetic divergence, even in sympatry.

Individuals from the southernmost distribution of *M. potiuna* partially fit the abovementioned criteria. The first criterion is satisfied, since there was no overlap in the genetic distance within and between CSM and CSS. It should be highlighted that, although the genetic distance followed a bimodal distribution, the difference between

Capítulo III

the intraspecific (< 2.5%) and interspecific (> 2.7%) distances was small. In addition, the amplitude of genetic divergence observed between species of *Macrobrachium* supports the difficulty in establishing a threshold for *M. potiuna*. In relation to the second criterion, the mean divergence between CSM and CSS (grouping CSS-I and CSS-II) is low (3.7%), compared to closely related groups (see Table 5.2). However, when the genetic differentiation of other *Macrobrachium* spp. is considered (Figure 5.5), > 3% of divergence is found. Thus, the second criterion is considered satisfied, but with remarks. Considering the criterion of divergence between sympatric individuals, the sample size limitation does not allow inferences.

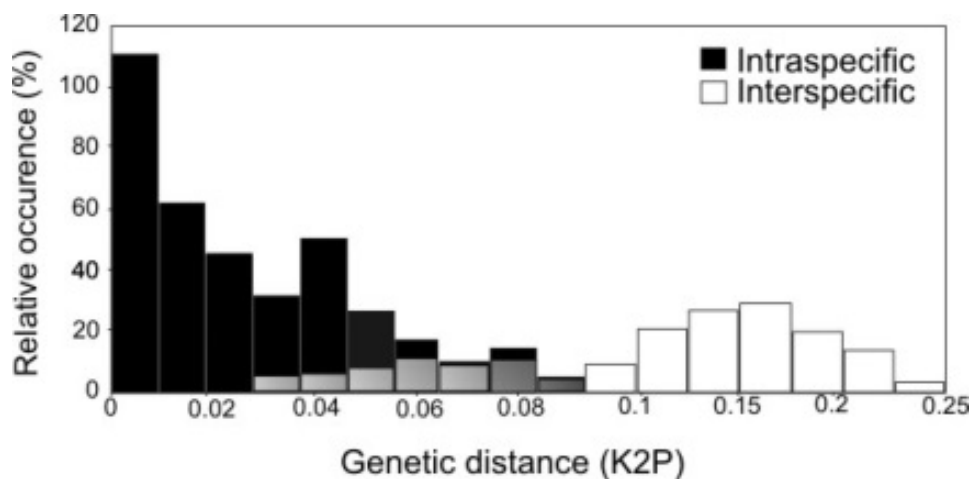


Figure 5.5. Intra and interspecific genetic distances (Kimura 2-parameter) in *Macrobrachium*, calculated based on 208 sequences of 16S from 48 species. Grey bars indicate the range where there was overlap of intra and interspecific distances.

Regarding the CSS and CA clades, and considering the subdivisions proposed by Carvalho *et al.* (2013) (even though they are not supported by the Bayesian analysis performed herein), it can be stated that: I) there was no overlap between intra- and interspecific genetic distance; II) the divergence of these clades is compatible with the divergence seen in related species; III) individuals of CSS and CA occur in sympatry in

Capítulo III

Cananeia (SP). Thus, all Held's criteria are satisfied, reinforcing the hypothesis raised by Carvalho *et al.* (2013), which proposed the 'affinis' group as a cryptic species. Despite this strong evidence for cryptic speciation, we must also consider an ongoing speciation process, in which the high genetic divergence could result from reduced gene flow. The reduced gene flow led to the accumulation of differences, but these are not enough to support the separation into distinct species. The criteria established by Held (2003) were also applied for *Acanthaspidia drygalskii* Vanhöffen, 1914 (Raupach and Wägele 2006). Their study demonstrated that, although the criteria for cryptic species detection were satisfied, the authors were cautious and did not interpret the high genetic divergence found for the isopod because of reproductive isolation.

Considering the intraspecific genealogy (i.e. the haplotype network), there was a similar number of mutational steps between the CA and CSS, and between the CSS and CSM clades. Thus, the CSM could constitute a conspicuous biological entity, in the same way as the CA, which was proposed as a cryptic species by Carvalho *et al.* (2013). However, considering our results, the existence of cryptic species in the CSM is less plausible. Alternatively, we consider the differences as intraspecific variation, genetically structured along the geographical distribution. Over time, these populations might accumulate a higher degree of genetic differentiation that would distinguish them as deeply divergent lineages (currently, the CSS and CSM clades are sister groups with shallow divergence). In contrast, the CA clade requires further studies since it represents potentially cryptic species (Carvalho 2014).

Finally, the results of the present study demonstrate that two stages of the same evolutionary process seem to be operating in this taxonomic complex, generating both intraspecific variability (due to geographic structure), and cryptic species (originated from local adaptations), from a large genetic variation pool.

5.6. ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Paula B. Araújo (UFRGS) for making available specimens from the Crustacean Collection at Universidade Federal do Rio Grande do Sul and Aline Quadros (UFRGS) for editing the text. We also thank to Josias A. Rezini (UFPR) for building the map (Figure 1), Luiz A. Campos, Vera L. S. V. Gaiesky and Carolina C. Sokolowicz (UFRGS) for suggestions made to an earlier version of the manuscript. The financial support for this study came in part from a CNPq project 454551/2014-2. G. Souza and G. Gonçalves were supported by CNPq Fellowships 143329/2011-1 and 56153/2011-4, respectively.

5.7. REFERENCES

- Acuña-Gómez EP, Álvarez F, Hiriart JLV, Eguiarte LE (2013) Molecular phylogeny of Mexican species of freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae: Palaemoninae). *Hidrobiologica* **23**:399-409.
- Aguilar CAG, Muzio R (2006) Geología de la costa uruguaya y sus recursos minerales asociados. In: Menafrá R, Rodríguez-Gallego L, Scarabino F, D C eds., *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Vida silvestre uruguay, Montivideo, pp. 668.
- Aguirre ML, Whatley RC (1995) Late Quaternary marginal marine deposits and paleoenvironments from northeastern Buenos Aires province: a review. *Quaternary Science Reviews* **14**:223-254.
- Alfaro ME, Zoller S, Lutzoni F (2003) Bayes or Bootstrap? A Simulation Study Comparing the Performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo Sampling and Bootstrapping in Assessing Phylogenetic Confidence. *Mol Biol Evol* **20**:255-266.
- Almeida AO, Terossi M, Mantelatto FL (2014) Morphology and DNA analyses reveal a new cryptic snapping shrimp of the *Alpheus heterochaelis* Say, 1818 (Decapoda: Alpheidae) species complex from the western Atlantic. *Zoosystema* **36**:53-71.
- Altermatt F, Alther R, Fiser C, Jokela J, Konec M, Küry D, Mächler E, Stucki P, Westram AM (2014) Diversity and Distribution of Freshwater Amphipod Species in Switzerland (Crustacea: Amphipoda). *Plos-One* **9**:e110328.
- Álvarez F, Pedraza-Lara C, Villalobos J (2014) Identity of freshwater shrimp populations (*Palaemon* Weber, 1795) from northern Mexico: genetic variation at local and regional scales. *Journal of Crustacean Biology* **34**:481-493.
- Anger K (2001) *The biology of Decapod Crustacean Larvae*. AA Balkema, Lisse, The Netherlands.
- Antunes LS, Oshiro LMY (2004) Aspectos reprodutivos do camarão de água doce *Macrobrachium potiuna* (Müller) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) na Serra do Piloto, Mandaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **21**:261-266.
- Ashelby CW, Page TJ, De Grave S, Hughes JM, Johnson ML (2012) Regional scale speciation reveals multiple invasions of freshwater in Palaemoninae (Decapoda). *Zoologica Scripta* **41**:293-306.
- Avice J (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (2005) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**.

Capítulo III

- Barão KR, Gonçalves GL, Mielke OHH, Kronforst MR, Moreira GRP (2014) Species boundaries in Philaethria butterflies: an integrative taxonomic analysis based on genitalia ultrastructure, wing geometric morphometrics, DNA sequences, and amplified fragment length polymorphisms. *Zool J Linnean Soc* **170**:690-709.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**:3759-3767.
- Bate C (1868) On a new genus, with four new species, of freshwater prawns. *Proceedings of the Zoological Society of London* **1868**:363-368.
- Bauer RT, Delahoussaye J (2008) Life history migrations of the amphidromous river shrimp *Macrobrachium ohione* from a continental large river system. *Journal of Crustacean Biology* **28**:622-632.
- Beheregaray LB, Sunnucks P, Briscoe DA (2002) A rapid fish radiation associated with the last sea level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **269**:65-73.
- Bhassu S, Hassan R, Yusoff K, Jamari Z, Siraj SS, Guan TS (2005) Single Locus Microsatellite Development for the Malaysian Giant Freshwater Prawns, *Macrobrachium rosenbergii* *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* **28**:87-94.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PK, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* **22**:148-155.
- Bond-Buckup G, Buckup L (1989) Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia* **48**:883-896.
- Botello A, Alvarez F (2010) Genetic variation in the stygobitic shrimp *Creaseria morleyi* (Decapoda: Palaemonidae), evidence of bottlenecks and re-invasions in the Yucatan Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society* **99**:315-325.
- Botello A, Alvarez F (2013) Phylogenetic relationships among the freshwater genera of palaemonid shrimps (Crustacea: Decapoda) from Mexico: evidence of multiple invasions? *Latin American Journal of Aquatic Research* **41**:773-780.
- Capitulo AR, Freyre LR (1995) Demografia de *Palaemonetes argentinus* Nobili (Decapoda Natantia) en La Laguna Chascomus, Buenos Aires, Argentina. Supervivencia, migraciones, biomasa y fecundidad. *Limnética* **11**:39-47.
- Carvalho FLd (2014) *Sistemática do gênero Palaemon Weber, 1975 (Decapoda, Palaemonidae): uma abordagem molecular e morfológica de padrões filogeográficos, evolução de características ecológicas e status taxonômicos das espécies no Brasil*. Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

Capítulo III

- Cavallotto JeL, Violante RA, Parker G (2004) Sea-level fluctuations during the last 8600 years in the de la Plata river (Argentina) *Quaternary International* **114**:155-165.
- Chand V, Bruyn MD, Mather PB (2005) Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Molecular Ecology Notes* **5**:308-310.
- Charmantier G, Anger K (1999) Ontogeny of osmoregulation in the palaemonid shrimp *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda) *Marine Ecology Progress Series* **181**:125-129.
- Coyne JA, Or HA (2004) *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Daniels SR (2011) Reconstructing the colonisation and diversification history of the endemic freshwater crab (*Seychellum alluaudi*) in the granitic and volcanic Seychelles Archipelago. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **61**:534-542.
- De Bruyn M, Wilson JC, Mather PB (2004) Blackwell Publishing, Ltd. Reconciling geography and genealogy: phylogeography of giant freshwater prawns from the Lake Carpentaria region. *Molecular Ecology* **13**:3515-3526.
- Douady CJ, Delsuc F, Boucher Y, Doolittle WF, Douzery EJP (2003) Comparison of Bayesian and Maximum Likelihood Bootstrap Measures of Phylogenetic Reliability. *Mol Biol Evol* **20**:248-254.
- Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**:11-15.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* **29**:1969-1973.
- Dumont LFC, D'Incao F (2004) Growth and reproductive pattern of the caridean shrimp *Palaemonetes argentinus*, Nobili, 1901 (Decapoda: Palaemonidae) in the South of Rio Grande do Sul, Brazil. *Nauplius* **12**:151-163.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* **11**:2571-2581.
- Espinosa M, Francesco CD, Isla F (2003) Paleoenvironmental reconstruction of Holocene coastal deposits from the Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Journal of Paleolimnology* **29**:49-60.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* **1**:47-50.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**.

Capítulo III

- Felix MML, Petriella AM (2003) Molt cycle of the natural population of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Palaemonidae) from Los Padres lagoon (Buenos Aires, Argentina). *Iheringia Série Zoologia* **93**:399-411.
- Fernández MV, Heras S, Viñas J, Maltagliati F, Roldán MI (2013) Multilocus comparative phylogeography of two aristeid shrimps of high commercial interest (*Aristeus antennatus* and *Aristaeomorpha foliacea*) reveals different responses to past environmental changes. *Plos-one* **8**:e59033.
- Ferreira R, Vieira R, D’Incao F (2010) The marine and estuarine shrimps of the Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Caridea) from Brazil. *Zootaxa* **2606**:1-24.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**:294-299.
- Freire CA, Cavassin F, Rodrigues EN, Torres AH, McNamara JC (2003) Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **136**:771-778.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**:915-925.
- García-Merchán VH, Robainas-Barcia A, Abelló P, Macpherson E, Palero F, García-Rodríguez M, Sola LGd, Pascual M (2012) Phylogeographic patterns of decapod crustaceans at the Atlantic–Mediterranean transition. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **62**:664-672.
- Grandjean F, Frelon-Raimond M, Souty-Grosset C (2002) Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *Austropotamobius*: one species or several. *Bull Fr Pêche Piscic* **367**:671-680.
- Hancock JM (1999) Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein D, Schlotterer C eds., *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, New York.
- Held C (2003) Molecular evidence for cryptic speciation within the widespread Antarctic crustacean *Ceratoserolis trilobitoides* (Crustacea, Isopoda). In: Huiskes AHL, Gieskes WWC, Rozema J, Schorno RML, Van Der Vies SM, W.J. W eds., *Antarctic biology in a global context*. Backhuys, Leiden, pp. 135-139.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role, in divergence and speciation *Biological Journal of the Linnean Society* **58**:247-276.
- Hillis D, Mable B, Larson A, Davis S, Zimmer E (1996) Nucleic acids IV: sequencing and cloning. In: Hillis D, Moritz C, BK M eds., *Molecular Systematic*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 321–381.

Capítulo III

- Holthuis L (1952) A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. *Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation* **12**:1-396.
- Hughes JM, Schmidt DJ, Finn DS (2009) Genes in streams: using DNA to understand the movement of freshwater fauna and their riverine habitat. *BioScience* **59**:573-583.
- Hunter RL, Webb MS, Iliffe TM, Bremer JRA (2008) Phylogeny and historical biogeography of the cave-adapted shrimp genus *Typhlatya* (Atyidae) in the Caribbean Sea and western Atlantic. *Journal of Biogeography* **35**:65-75.
- Ituarte R, Spivak E, Anger K (2007a) Intraspecific variability in life-history traits of a freshwater shrimp, *Palaemonetes argentinus*. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* **43**:293-302.
- Ituarte RB, Spivak ED, Anger K (2007b) Intraspecific variability in life-history traits of a freshwater shrimp, *Palaemonetes argentinus*. *Annales de Limnologie* **43**:293-302.
- Jaiswal P, Ni J, Yap I, Ware D, Spooner W, Youens-Clark K, Ren L, Wei X, Liang C, Pasternak S, Zhao W, Teclé I, Faga B, Canaran P, Ravenscroft D, Hebbard C, Avraham S, Casstevens T, Buckler ES, Stein L, Mccouch S (2006) GRAMENE: A GENOMICS AND GENETICS RESOURCE FOR MAIZE *Maize Genetics Cooperation Newsletter* **80**:99-107.
- Ketmaier V, Pirolo D, De Matthaëis E, Tiedemann R, Mura G (2008) Large-scale mitochondrial phylogeography in the halophilic fairy shrimp *Phallocryptus spinosa* (Milne-Edwards, 1840) (Branchiopoda: Anostraca). *Aquat Sci* **70**:65-76.
- Kijas J, Fowler J, Garbett C, Thomas M (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques* **16**:656-662.
- Kou Q, Li X, Chan T, Chu K, Gan Z (2013) Molecular phylogeny of the superfamily Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Caridea) based on mitochondrial and nuclear DNA reveals discrepancies with the current classification. *Invertebrate Systematics* **27**:502-514.
- Lambeck K, Chappell J (2001) Sea level change through the last glacial cycle. *Science* **292**:679-686.
- Lee CE, Bell MA (1999) Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. *Trends in Ecology and Evolution* **14**:284-288.
- Lewis PO, Holder MT, Holsinger KE (2005) Polytomies and Bayesian Phylogenetic Inference. *Syst Biol* **54**:241-253.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**:1451-1452.

Capítulo III

- Lima EAC, Oshiro LMY (2000) Distribuição, abundância e biologia reprodutiva de *Macrobrachium potiuna* (Müller, 1880) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) do rio Paraíba do Sul, RJ. *Acta Biologica Leopoldensia* **22**:67-77.
- Liu M-Y, Cai Y-X, Tzeng C-S (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**:272-289.
- López RÁ, Marcomino SC (2011) *Problemática de los ambientes costeros*. Editorial Croquis S.R.L., Buenos Aires.
- Luttikhuisen PC, Campos J, Bleijswijk Jv, Peijnenburg KTCA, Veer HWvd (2007) Phylogeography of the common shrimp, *Crangon crangon* (L.) across its distribution range. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**:1015-1030.
- Mace GM (2004) The role of taxonomy in species conservation. *Phil Trans R Soc* **359**:711-719.
- Mäder G, Fregonezi JN, Lorenz-Lemke AP, Bonatto SL, Freitas LB (2013) Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. *BMC Evolutionary Biology* **13**:178.
- Mantel N (1967) The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Res* **27**:209-220.
- Mantelatto FL, Pileggi LG, Miranda I, Wehrtmann IS (2011) Does *Petrolisthes armatus* (Anomura, Porcellanidae) form a Species Complex or Are We Dealing with Just One Widely Distributed Species? *Zool Stud* **50**:372-384.
- Melo G (2003) Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. In: Melo G ed., *Manual de identificação dos crustáceos decápodos de água doce brasileiros*. Editora Loyola, São Paulo, pp. 289-415.
- Melo G, Lobão V, Fernandes W (1988) Redescrição de *Macrobrachium birai* Lobão, Melo & Fernandes e *Macrobrachium petronioi* Melo, Lobão & Fernandes (Crustacea, Decapoda), Palaemonídeos da região Sul de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo* **15**:89-97.
- Menú-Marque SA (1973) Desarrollo larval de *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) en el laboratorio (Crustacea, Caridea, Palaemonidae). *Phylis* **32**:149-169.
- Montagna MC, Collins PA (2007) Survival and Growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) Exposed to Insecticides with Chlorpyrifos and Endosulfan as Active Element. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **53**:371-378.
- Mora MS, Lessa EP, Kittlein MJ, Vassallo AI (2006) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy* **87**:1192-1203.

Capítulo III

- Murphy NP, Austin CM (2002) A preliminary study of 16S rRNA sequence variation in Australian Macrobrachium shrimps (Palaemonidae: Decapoda) reveals inconsistencies in their current classification. *Invertebrate Systematics* **16**:697-701.
- Murphy NP, Austin CM (2004) Phylogeography of the widespread Australian freshwater prawn, *Macrobrachium australiense* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Biogeography* **31**:1065-1072.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Neigel JE (2002) Is Fst obsolete? *Conservation Genetics* **3**:167-173.
- Palumbi SR, Benzie J (1991) Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. *Mol Mar Biol Biotechnol* **1**:27-34.
- Pedraza-Lara C, Alda F, Carranza S, Doadrio I (2010) Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **57**:327-342.
- Pereira G (1997) A cladistic analysis of the freshwater shrimps of the family Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Caridae). *Acta Biologica Venezuelica* **17**:1-69.
- Pileggi L, Mantelatto F (2010) Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae) with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebrate Systematics* **24**:194-208.
- Pileggi LG, Mantelatto FL (2012) Taxonomic revision of doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Iheringia, Série Zoologia* **102**:426-437.
- Rafinesque CS (1815) Analyse de la Nature ou Tableau de l'univers et des corps organisés. *Palermo: L'Imprimerie de Jean Barravecchia*, Palerme, pp. 224 pp.
- Raupach MJ, Wägele J-W (2006) Distinguishing cryptic species in Antarctic Asellota (Crustacea: Isopoda) - a preliminary study of mitochondrial DNA in *Acanthaspidia drygalskii*. *Antarct Sci* **18**:191-198.
- Reuschel S, Cuesta JA, Schubart CD (2010) Marine biogeographic boundaries and human introduction along the European coast revealed by phylogeography of the prawn *Palaemon elegans*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **55**:765-775.
- Reynolds TV, Matthee CA, Heyden Svd (2014) The influence of pleistocene climatic changes and ocean currents on the phylogeography of the southern african barnacle, *Tetraclita serrata* (Thoracica; Cirripedia) *Plos-One* **9**:e102115.
- Rice W (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**:223-225.
- Rintelen Kv, Rintelen Tv, Glaubrecht M (2007) Molecular phylogeny and diversification of freshwater shrimps (Decapoda, Atyidae, Caridina) from

Capítulo III

- ancient Lake Poso (Sulawesi, Indonesia)—The importance of being colourful. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **45**:1033-1041.
- Rossi N, Mantelatto FL (2013) Molecular analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) supports the existence of a single species throughout its distribution. *Plos-one* **8**:e54698.
- Ruane S, Bryson RWJr, Pyron RA, Burbrink FT (2013) Coalescent species delimitation in milksnakes (genus *Lampropeltis*) and impacts on phylogenetic comparative analyses. *Syst Biol* **62**:231-250.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* **7**:465-474.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* **18**:233-234.
- See LM, Tan SG, Hassan R, Siraj SS, Bhassu S (2009) Development of Microsatellite Markers from an Enriched Genomic Library for the Genetic Analysis of the Malaysian Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biochemical Genetics* **47**.
- Short JW (2004) A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Hydrobiologia* **525**:1-100.
- Sites JWJr, Marshall JC (2003) Delimiting species a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol Evol* **18**:462-470.
- Sivasundar A, Bermingham E, Ortí G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* **10**:407-417.
- Song K-H, Jung J, Kim W (2009) Polymorphic microsatellite markers of freshwater prawn *Palaemon paucidens* (De Haan, 1844) (Crustacea: Palaemonidae). *Molecular Ecology Resources* **9**:418-420.
- Souza GOd (2010) *Análise da estrutura genética populacional de Palaemonetes argentinus, Nobili 1901 (Decapoda: Palaemonidae) na região costeira do sul do Brasil*. Instituto de Oceanografia, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande - RS.
- Spivak ED (1997) Life history of a brackish-water population of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda: Caridea) in Argentina. *Annales de Limnologie* **33**:179-190.
- Tajima F (1989) Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**:585-595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**:2731-2739

Capítulo III

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**:2725-2729.
- Tomazelli LJ, Dillenburg SR, Villwock JA (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul Coastal plain, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Geociências* **30**:474-476.
- Tong JG, Chan T-Y, Chu KH (2000) A Preliminary Phylogenetic Analysis of *Metapenaeopsis* (Decapoda: Penaeidae) Based on Mitochondrial DNA Sequences of Selected Species from the Indo-West Pacific. *J Crustacean Biol* **20**:541-549.
- Turcheto-Zolet AC, Segatto ALA, Turchetto C, Palma-Silva C, Freitas LBd (2013) *Guia Prático para estudos filogeográficos*. Editora SBG, Ribeirão Preto
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* **22**:1193-1213.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* **35**:W71-W74.
- Van Oosterhout C, Hutchison W, Shipley P, Wills D (2004) Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology* **4**:535-538.
- Vergamini FG, Pileggi LG, Mantelatto FL (2011) Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contrib Zool* **80**:67-83.
- Villwock JA, Tomazelli LJ (1995) Geologia Costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* **8**:1-45.
- Wowor D, Muthu V, Meier R, Balke M, Cai Y, Ng PKL (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**:340-350.
- Wright S (1943) Isolation by distance genetics. *Genetics* **28**:114-138.
- Zhang D, Ding G, Ge B, Zhang H, Tang B, Yang G (2014) Comparative phylogeography of two marine species of crustacean: Recent divergence and expansion due to environmental changes. *Gene* **550**:141-147.

5.8. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S 5.1. Espécimes do gênero *Macrobrachium* utilizados na análise de distância genética, incluindo informações de número de acesso do GenBank das sequencias incorporadas e suas referências.

| <i>SPECIES</i> | <i>Accession number</i> | <i>References</i> |
|----------------------|--|----------------------------|
| <i>M. acanthurus</i> | GU929449 | Vergamini et. al., 2011 |
| | HM352444; HM352445 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. aemulum</i> | JF310709 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. amazonicum</i> | GU929450; GU929460; GU929453; GU929457; GU929456; GU929459; GU929461; GU929462; GU929451; GU929452; GU929454; GU929455; GU929458 | Vergamini et. al., 2011 |
| | HM352441; HM352443; HM352442 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. americanum</i> | GU929463 | Vergamini et. al., 2011 |
| | HM352447 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. amplimanus</i> | AB646953; AB646954 | Hanamura et al 2011 |
| <i>M. aracamuni</i> | HM352430 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. asperulum</i> | AB250428; AB250440; AB250441; AB250435; AB250436; AB250437; AB250438; AB250452; AB250454; AB250455; AB250456; AB250457; AB250429; AB250444; AB250445; AB250446; AB250447; AB250448; AB250449; AB250450; AB250451; AB250453; AB250465; AB250464; AB250461; AB250462; AB250463; AB250419; AB250420; AB250418; AB250430; AB250432 AB250431; AB250426; AB250427; AB250439; AB250433; AB250434; AB250421; AB250422; AB250423; AB250424; AB250425; AB250458; AB250459; AB250460; AB250416; AB250417 AB250442; AB250443 | Liu e Tzeng, 2007 |
| | | |
| <i>M. australe</i> | JF310710; JF310711; DQ681290 | Page e Hughes, 2011 |
| | KP725549 | Aznar et al 2015 |

Capítulo III

| | | |
|----------------------------|---|----------------------------|
| <i>M. borellii</i> | GU929445 | Vergamini et. al., 2011 |
| | HM352426 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. brasiliense</i> | GU929446 | Vergamini et. al., 2011 |
| | HM352429 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. bullatum</i> | JF310712 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. carcinus</i> | GU929464 | Vergamini et. al., 2011 |
| <i>M. carcinus</i> | HM352451; HM352448; HM352450; HM352449; HM352452 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. cf. esculentum</i> | JF310713; JF310714 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. cf. lorentzi</i> | JF310715 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. crenulatum</i> | KM101475 | Pileggi et al, 2014 |
| | HM352463 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>C. brasiliensis</i> | HM352434 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>C. caementarius</i> | HM352453 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. denticulatum</i> | HM352462 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. depressimanum</i> | HM352435 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. dienbienphuense</i> | DQ991103 | Yang et al, 2008 |
| <i>M. faustinum</i> | HM352461 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. ferreirai</i> | GU929447 | Vergamini et. al., 2011 |
| <i>M. ferreirai</i> | HM352427 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. handschini</i> | JF310716; JF310717 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. heterochirus</i> | HM352454 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. horstii</i> | JF310718; JF310719 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. iheringi</i> | HM352432; HM352431 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. inpa</i> | HM352433 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. jelskii</i> | GU929448 | Vergamini et. al., 2011 |
| | HM352436; HM352437 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. lanatum</i> | JF310720 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. lanchesteri</i> | KP725551; KP725550; KP725550; KP725552 | Aznar et al 2015 |
| <i>M. latidactylus</i> | JF310721; JF310722 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. mammillodactylus</i> | DQ194915 | Liu e Tzeng, 2007 |
| | JF310723; JF310724 | Page e Hughes, 2011 |
| | AY377845 | Murphy e Austin, 2005 |
| <i>M. nattereri</i> | HM352428 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. nipponense</i> | DQ462408; DQ462407; DQ462406; DQ462411; DQ462410; DQ462409 | Sun et al, 2006 |
| <i>M. novaehollandiae</i> | JF310725; JF310726; JF310727 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. ohione</i> | EU868694 | Bracken et al, 2009 |

Capítulo III

| | | |
|------------------------|---|-----------------------------|
| | HM352464 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. olfersii</i> | GU929466 | Vergamini et. al., 2011 |
| | HM352458; HM352457; HM352459; JQ805836; | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. olfersii</i> | HM352456; HM352455 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. petronioi</i> | HM352440 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. rosenbergii</i> | AY773964 | Jiang, 2004 |
| | KM610154 | Deepak e Harikrishnan, 2014 |
| <i>M. rosenbergii</i> | HM352465 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. saigonense</i> | JF310728 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. shokitai</i> | AB250466 | Liu e Tzeng, 2007 |
| <i>M. sp.</i> | JF310729 | Page e Hughes, 2011 |
| | AY282767; AY282775 | Murphy e Austin, 2003 |
| | JF310730; JF310731; JF310732 | Page e Hughes, 2011 |
| <i>M. surinamicum</i> | HM352446 | Pileggi e Mantelatto, 2010 |
| <i>M. villosimanus</i> | KJ544769; KJ544756; KJ544757; KJ544758; | Sharma et al, 2014 |
| | KJ544759; KJ544760; KJ544761; KJ544762; | |
| | KJ544763; KJ544764; KJ544765; KJ544766 | |

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de ferramentas moleculares em camarões das espécies *Palaemon argentinus* e *Macrobrachium potiuna*, permitiram importantes considerações para a história evolutiva dessas espécies:

As análises de genes mitocondriais para *P. argentinus* suportam a hipótese de que essa espécie deve ter se especiada recentemente e se dispersado pelos ambientes de água doce. A estrutura genética populacional verificada corrobora para uma história evolutiva da espécie correlacionada aos eventos geológicos decorrentes dos últimos ciclos de transgressivo-regressivos do mar, a partir do Pleistoceno Superior (há aproximadamente 120 mil anos). Além das análises mitocondriais, essa tese possibilitou a descrição de iniciadores específicos para regiões microssatélites, que poderão auxiliar em análises sobre o fluxo gênico entre populações de *P. argentinus*, que possibilitem uma reconstrução mais refinada da história de evolução recente desse camarão.

Já para *M. potiuna* as análises permitiram uma importante colaboração para a filogenia do gênero, visto as dúvidas sistemáticas que ainda persistem para esses crustáceos. As análises permitiram verificar que todo o gênero apresenta grande variabilidade intraespecífica, que deve ser investigada do ponto de vista taxonômico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, C. A. G., e R. Muzio, 2006 Geología de la costa uruguaya y sus recursos minerales asociados, pp. 668 in *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*, edited by R. Menafrá, L. Rodríguez-Gallego, F. Scarabino e D. Conde. Vida Silvestre Uruguay, Montivideo.
- Álvarez, F., C. Pedraza-Lara e J. Villalobos, 2014 Identity of freshwater shrimp populations (*Palaemon* Weber, 1795) from northern Mexico: genetic variation at local and regional scales. *Journal of Crustacean Biology* 34: 481-493.
- Anger, K., G. Torres e U. Nettelmann, 2007 Adaptive traits in ecology, reproduction and early life history of *Sesarma meridies*, an endemic stream crab from Jamaica. *Marine and Freshwater Research* 58: 743-755.
- Antunes, L. S., e L. M. Y. Oshiro, 2004 Aspectos reprodutivos do camarão de água doce *Macrobrachium potiuna* (Müller) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) na Serra do Piloto, Mandaritiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21: 261-266.
- Ashelby, C., T. Page, S. De Grave, J. Hughes e M. Johnson, 2012 Regional scale speciation reveals multiples invasões of freshwater in Palaemoninae (Decapoda). *Zoologica Scripta* 41: 293-306.
- Avisé, J., 2000 *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Bate, C., 1868 On a new genus, with four new species, of freshwater prawns. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1868: 363-368.
- Bond-Buckup, G., e L. Buckup, 1989 Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia* 49: 883-896.
- Capítulo, A. R., e L. R. Freyre, 1995 Demografía de *Palaemonetes argentinus* Nobili (Decapoda, Natantia) en la laguna Chascomus, Buenos Aires, Argentina. Supervivencia, migraciones, biomasa y fecundidad. *Limnética* 11: 39-47.
- Carvalho, F. L. d., 2014 Sistemática do gênero *Palaemon* Weber, 1795 (Decapoda, Palaemonidae): uma abordagem molecular e morfológica de padrões filogeográficos, evolução de características ecológicas e status taxonômico das espécies no Brasil, pp. 192 p in *Departamento de Biologia*. USP, Ribeirão Preto - SP.
- Carvalho, F. L. d., L. G. Pileggi e F. L. Mantelatto, 2013 Molecular data raise the possibility of cryptic species in the Brazilian endemic prawn *Macrobrachium potiuna* (Decapoda, Palaemonidae). *Latin American Journal of Aquatic Research* 41: 707-713.
- Cavallotto, J. L., R. A. Violante e G. Parker, 2004 Sea-level fluctuations during the last 8600 years in the de la Plata river (Argentina). *Quaternary International* 114: 155-165.
- Daniels, S. R., 2011 Reconstructing the colonisation and diversification history of the endemic freshwater crab (*Seychellum alluaudi*) in the granitic and volcanic Seychelles Archipelago. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 534-542.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Bruyn, M., J. Wilson e P. Mather, 2004a Reconciling geography and genealogy: phylogeography of giant freshwater prawns from the Lake Carpentaria region. *Molecular Ecology* 13: 3515-3526.
- de Bruyn, M., J. A. Wilson e P. B. Mather, 2004b Huxley's line demarcates extensive genetic divergence between eastern and western forms of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 251-257.
- De Grave, S., e C. Ashelby, 2013 A re-appraisal of the systematic status of selected genera in Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Zootaxa* 3734: 331-344.
- De Grave, S., e C. H. J. M. Fransen, 2011 Carideorum catalogus: the recent species of the dendrobranchiate, stenopodidean, procarididean and caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). *Zoologische Mededelingen* 85: 195-589.
- Fernández, M. V., S. Heras, J. Viñas, F. Maltagliati e M. I. Roldán, 2013 Multilocus comparative phylogeography of two aristeid shrimps of high commercial interest (*Aristeus antennatus* and *Aristaeomorpha foliacea*) reveals different responses to past environmental changes. *Plos-one* 8: e59033.
- Ferreira, R., R. Vieira e F. D'Incao, 2010 The marine and estuarine shrimps of the Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Caridea) from Brazil. *Zootaxa* 2606: 1-24.
- Freire, C. A., F. Cavassin, E. N. Rodrigues, A. H. Torres e J. C. McNamara, 2003 Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 136: 771-778.
- García-Merchán, V. H., A. Robainas-Barcia, P. Abelló, E. Macpherson, F. Palero *et al.*, 2012 Phylogeographic patterns of decapod crustaceans at the Atlantic–Mediterranean transition. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 664-672.
- Hillis, D., C. Moritz e B. Mable, 1996 *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Holthuis, L. B., 1952 A general revision of the Palaemonidae (Crustacea Decapoda Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. *Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation* 12: 1-396.
- Ituarte, R., E. Spivak e K. Anger, 2007 Intraspecific variability in life-history traits of a freshwater shrimp, *Palaemonetes argentinus*. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 43: 293-302.
- Ituarte, R. B., E. D. Spivak, M. Camiolo e K. Anger, 2010 Effects of salinity on the reproductive cycle of female freshwater shrimp, *Palaemonetes argentinus*. *Journal of Crustacean Biology* 30: 186-193.
- Kou, Q., X. Li, T. Chan, K. Chu e Z. Gan, 2013 Molecular phylogeny of the superfamily Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Caridea) based on mitochondrial and nuclear DNA reveals discrepancies with the current classification. *Invertebrate Systematics* 27: 502-514.
- Lee, C. E., e M. A. Bell, 1999 Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 284-288.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lima, E. A. C., e L. M. Y. Oshiro, 2000 Distribuição, abundância e biologia reprodutiva de *Macrobrachium potiuna* (Müller, 1880) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) do rio Paraíba do Sul, RJ. *Acta Biologica Leopoldensia* 22: 67-77.
- Liu, M.-Y., Y.-X. Cai e C.-S. 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: 272-289.
- Luttikhuisen, P. C., J. Campos, J. v. Bleijswijk, K. T. C. A. Peijnenburg e H. W. v. d. Veer, 2008 Phylogeography of the common shrimp, *Crangon crangon* (L.) across its distribution range. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 1015-1030.
- Melo, G., 2003 Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae, pp. 289-415 in *Manual de identificação dos crustáceos decápodos de água doce brasileiros*, edited by G. Melo. Editora Loyola, São Paulo.
- Melo, G., V. Lobão e W. Fernandes, 1988 Redescritção de *Macrobrachium birai* Lobão, Melo & Fernandes e *Macrobrachium petronioi* Melo, Lobão & Fernandes (Crustacea, Decapoda), Palaemonídeos da região Sul de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo* 15: 89-97.
- Menú-Marque, S. A., 1973 Desarrollo larval de *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) en el laboratorio (Crustacea, Caridea, Palaemonidae). *Physis* 32: 149-169.
- Murphy, N. P., e C. M. Austin, 2002 A preliminary study of 16S rRNA sequence variation in Australian *Macrobrachium* shrimps (Palaemonidae: Decapoda) reveals inconsistencies in their current classification. *Invertebrate Systematics* 16: 697-701.
- Murphy, N. P., e C. M. Austin, 2004 Phylogeography of the widespread Australian freshwater prawn, *Macrobrachium australiense* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Biogeography* 31: 1065-1072.
- Page, T., J. Short, C. Humphrey, M. Hillyer e J. Hughes, 2008 Molecular systematics of the Kakaducarididae (Crustacea: Decapoda: Caridea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 1003-1014.
- Pedraza-Lara, C., F. Alda, S. Carranza e I. Doadrio, 2010 Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 327-342.
- Pereira, G., 1997 A cladistic analysis of the freshwater shrimps of the family Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Caridae). *Acta Biologica Venezuelica* 17: 1-69.
- Pileggi, L., e F. Mantelatto, 2010 Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae) with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebrate Systematics* 24: 194-208.
- Pileggi, L. G., e F. L. Mantelatto, 2012 Taxonomic revision of doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Iheringia, Série Zoologia* 102: 426-437.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rafinesque, C. S., 1815 *Analyse de la Nature ou Tableau de l'univers et des corps organisés*, pp. 224 pp in *Palermo: L'Imprimerie de Jean Barravecchia*, Palerme.
- Reuschel, S., J. A. Cuesta e C. D. Schubart, 2010 Marine biogeographic boundaries and human introduction along the European coast revealed by phylogeography of the prawn *Palaemon elegans*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 765-775.
- Rintelen, K. v., T. v. Rintelen e M. Glaubrecht, 2007 Molecular phylogeny and diversification of freshwater shrimps (Decapoda, Atyidae, Caridina) from ancient Lake Poso (Sulawesi, Indonesia)—The importance of being colourful. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 1033-1041.
- Rossi, N., e F. L. Mantelatto, 2013 Molecular analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) supports the existence of a single species throughout its distribution. *Plos-one* 8: e54698.
- Schaal, B. A., D. A. Hayworth, K. M. Olsen, J. T. Rauscher e W. A. Smith, 1998 Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.
- Short, J. W., 2004 A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Hydrobiologia* 525: 1-100.
- Sivasundar, A., E. Bermingham e G. Ortí, 2001 Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407-417.
- Tomazelli, L. J., S. R. Dillenburg e J. A. Villwock, 2000 Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul Coastal plain, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Geociências* 30: 474-476.
- Wowor, D., V. Muthu, R. Meier, M. Balke, Y. Cai *et al.*, 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 e Evolution* 52: 340-350.

8. ANEXOS

8.1. Instructions to Authors - NAUPLIUS

ISSN 0104-6497 *printed version*

ISSN 2358-2936 *online version*

Scope and policy

The Nauplius, an electronic, open access journal, publishes original research dealing with any aspect of crustacean biology. Papers are published in English only. From 2016 on papers will be published as soon as accepted, under a continuous publication system. When submitting a manuscript, please, state that the manuscript has been submitted solely to this journal and is not published, in press, or submitted elsewhere, that all research meets the ethical guidelines, including adherence to the legal requirements of the study country, and that the manuscript is approved by all authors.

All manuscripts published in **Nauplius** are peer-reviewed for contents and presentation by at least two appropriate referees, editorial board and editor.

Open Access Policy

This journal provides complete and immediate open access to its content.

Copyright

ANEXOS

All content of the journal, except where identified, is licensed under a [Creative Commons](#) attribution-type BY.

Upon publication of the manuscript in Nauplius the authors agree that the copyright is transferred to Brazilian Crustacean Society.

Costs

There are no page charges or processing fees for authors. In addition, authors will receive a PDF version of the paper for personal use, free of charge. All costs are paid by the Brazilian Crustacean Society (SBC). Authors other than the Society members are welcome to publish their research.

Upon acceptance, authors will receive proofs by PDF attachments to email messages. Authors must correct and approve proofs promptly in accordance with instructions received with the proofs. If proofs are not returned on time, the article may be held or published in its present form.

Form and preparation of manuscripts

All manuscripts should be prepared in MS Word. Figures and Tables should be submitted as separate files, within the appropriate fields in the ScholarOne system. Figures and tables will be printed directly from the electronic files sent by authors and should therefore be of high quality (TIF, JPG, or CDR). For black and white draw/line artwork, these should be 600 dpi resolution at final size. Half-tone grayscale artwork should be 600 dpi at final size and combination (line/tone) color artwork should be at 800 dpi final size. Color half-tone images should be submitted as 300 dpi. All figures should be labeled with a medium weight sans serif font of an appropriate size to result

ANEXOS

in 8 point (3.33 mm) type when reduced to single column width. Special attention with the scale bars thickness is necessary.

Requirements of taxonomic and nomenclatural procedures need reasonable consistency in the organization of such papers. Telegraphic style is mandatory for descriptions and diagnoses. Study of articles in recent numbers should be helpful in determining style and format. The establishment of new taxa must conform to the requirements of the latest edition of the International Code of Zoological Nomenclature. The publication of new taxa in electronic journals is currently allowed by the Code (<http://iczn.org/content/electronic-publication-made-available-amendment-code>) and the new names proposed in such journals must be registered in the *Official Register of Zoological Nomenclature*, with ZooBank as its online version (zoobank.org). The Nauplius editorial team offers to the authors free registration of all publications and new taxa in Zoobank. Description of new species-group taxa must cite a type-specimen deposited in an institutional collection. Genus and species name of any animal must be in italics and followed by author and date of publication when first mentioned in the main text. Authors of species name of any other kingdom need not to be given. Publications containing the original description of any animal taxa must be cited in the references list. We recommend writing the species names in full at the beginning of each section of the manuscript and when they appear at the beginning of a sentence. In other places use the contraction (e.g., *A. spinimanus* for *Achelous spinimanus*). Genbank accession numbers must be included for DNA results such that the raw data can be accessed and compared against the presented data.

The sequence should be: Title, full names of Author(s), Address(es) and E-mail(s), Running Head, Abstract, Key Words, Text (Introduction, Material and Methods, Results

ANEXOS

and Discussion), Acknowledgements, References, Captions for Tables and Figures, Tables, Figures (each numbered and identified).

Text Formatting: Please use Times New Roman, size 12, and double-space formatting. Use hyphen between connecting words (e.g., spring-tide, fine-mesh) and en-dash between ranges (e.g., C–F, 33–39) and opposite words (e.g., size–frequency distribution, male–female pair). We recommend using a copy of a recent article as a guideline. The running head should be of no more than 52 characters. The abstract should be in English and should not exceed 250 words.

Key words: provide up to five indexing terms not used in the title. Tables and figures should be self-explanatory, not requiring reference to the text. Vertical rules and Roman numerals should be avoided.

References: All papers referred to in the text should be listed alphabetically by senior's authors surname under the heading "References". Use "in press" only when formal acceptance has been granted. Thesis, dissertations, abstracts presented at meetings, and author of quoted unpublished material (e.g., manuscripts under review, internal reports, and certain conference abstracts) should be cited only if strictly necessary. Author of quoted unpublished material should be inserted in the text and designated as "unpublished data; unpubl. data" or "personal communication; pers. comm.", but should be omitted from the reference list. In the body of the text use: Silva (2006), (Silva, 2006), (Silva and Santos, 2006), (Silva, 2005; 2006; Santos, 2006), (Tab. 1; Tabs. 1, 2), and (Fig. 1; Figs. 1A, B). Do not use "op. cit." and avoid using "apud". Name of periodicals should be given in full and italic. Both volume and number of papers published in scientific journals must be provided. Use en-dash (–) for page ranges. For further particulars consult the following examples and a recent article as a guideline:

ANEXOS

Almeida, A.O.; Coelho, P.A.; Santos, J.T. A. and Ferraz, N.R. 2006. Crustáceos decápodos estuarinos de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Biota Neotropica*, 6(2): <http://www.biotaneotropica.org.br/v6n2/pt/abstract?inventory+bn0340602> 2006 - ISSN 1676-0603.

Arcifa, M.S.; da Silva, L.H.S. and da Silva, M.H.L. 1998. The planktonic community in a tropical Brazilian reservoir: Composition, fluctuations and interactions. *Revista Brasileira de Biologia*, 58(2): 241–254.

Asakura, A. 2010. A new species of hermit crab of the teevana group of *Pylopaguropsis* (Decapoda: Anomura: Paguridae) from the western Pacific, collected during the PANGLAO expedition. *Nauplius*, 18(1): 35–43.

Hall, T.A. 2005. BioEdit 7.0.5. North Carolina State University, Department of Microbiology. Available at <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Accessed on 3 January 2011.

Matzen da Silva, J.; Creer, S.; dos Santos, A.; Costa, A.C.; Cunha, M.R.; Costa, F.O. and Carvalho, G.R. 2011. Systematic and evolutionary insights derived from mtDNA COI barcode diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). *PLoS ONE*, 6(5): e19449. doi:10.1371/journal.pone.0019449.

Miller, M.A.; Pfeiffer, W. and Scheartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. p. 1–8. In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, Louisiana, USA.

ANEXOS

Nucci, P.R. 2002. Taxonomia e biogeografia da Superfamília Paguroidea Latreille (Crustacea, Decapoda, Anomura) no litoral brasileiro. Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rio Claro, Brazil, Ph.D. Thesis. 194p. [Unpublished].

Ojeda, J.C.E. 2010. Patrón de distribución de las especies de la familia Trichodactylidae (Crustacea: Decapoda: Brachyura) en México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México - UNAM, Master Dissertation, 72 pp. [Unpublished].

Poore, G.C.B. 1991. Crustacea Isopoda: Deep-sea Chaetilidae (Valvifera) from New Caledonia and the Philippines. In: A. Crosnier (ed), Résultats des campagnes MUSORSTOM, Volume 9. Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, (Zoologie), 152: 139–153.

Powers, L.W. and Bliss, D.E. 1983. Terrestrial adaptations. p. 271–333. In: M.D. Vernberg and W. Vernberg (eds), The biology of Crustacea. Environmental adaptations, Vol. 8. New York, Academic Press.

Souza, F.E.S. and Camara, M.R. 1998. Contribuição ao estudo de anostráceos de águas interiores da região do Seridó, Rio Grande do Norte, Brasil. p. 125. In: IX Congresso de Iniciação Científica da UFRN, Natal, Brasil.

Smith, J.Q. 1981. The distribution of shrimps in South America. *Journal of Crustacean Biology*, 1(4): 105–111.

Williams, A.B. 1984. Shrimps, lobsters and crabs of the eastern United States, Maine to Florida. Washington, Smithsonian Institution Press, 500p.

ANEXOS

Short Communications: Short notes are accepted when they present information which cannot be incorporated into a regular paper. These contributions will be subjected to the full editorial process. Manuscripts should be prepared following the same recommendations of regular articles. The text should be limited until eight pages printed in times new roman, size 12, and double space formatting, since they will not normally exceed four final pages in length and will contain only one figure or table. The sequence should be: Title, Full Names of Author(s), Address(es) and email(s), Running Head, Key Words, Text, Acknowledgements, and References. When necessary, captions for Tables and Figures, Tables, Figures (each one numbered and identified), must be included at the end of the manuscript.

Manuscript submission

All manuscripts should be submitted through the ScholarOne Manuscripts system (<https://mc04.manuscriptcentral.com/nau-scielo>). In case you have any doubt, please, contact the editor:

Paula Beatriz de Araujo, Editor Nauplius, Departament of Zoology - IB, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, pr. 43435, 91501-970 - Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brazil, Ph. +55(51)33087709; E-mail: editor.nauplius@gmail.com - www.crustacea.org.br

8.2. INSTRUCTIONS TO AUTHORS – Genetic and Molecular Biology

Scope and policy

Submission of papers

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

1. Manuscripts must be submitted through a Scholar One submission platform hosted at:<http://mc.manuscriptcentral.com/gmb>

The cover letter should be addressed to:

- Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

2. For submission the following instructions must be observed:

a) The manuscript that must be submitted by the Corresponding Author. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for the payment that may incur during the editorial process.

b) Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the

ANEXOS

manuscript file. Furthermore, a cover letter addressed to the Editor is required. It must be edited by the corresponding author inserted within the reserved data field

c) Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed.

d) The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.

e) In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and not-preferred reviewer(s).

f) Files must be uploaded separately and identified according to file types. The main text file must include references and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.h).

g) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

ANEXOS

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by

ANEXOS

semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study.

Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results- Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion- The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

ANEXOS

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

ANEXOS

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilopthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. *PLoS One* 4:e7713.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM),
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

ANEXOS

LEM Software,

http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2005)

g) **Tables** must be in Word format prepared with table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted.

Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

ANEXOS

Figure legends must be included in the main text file and should be typed on a new page that immediately follows the tables.

i) **Nomenclature** should adhere to current international standards.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will delay publication.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) **Ethical issues:** reports of experiments on live vertebrates must include a statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures, they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the

ANEXOS

following statement: Supplementary material - the following online material is available for this article:

- Table S1 < short title >

- Figure S1 - < short title >

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications;

- should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited;
- should include an Abstract;
- but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion; all in a single section and without headers.
- up to four items (tables and/or figures) may be submitted;

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.m

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

ANEXOS

Review Articles are welcome. The Editor should be contacted prior to submission.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to a copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

A form of consent to publish and transfer of copyright will have to be signed by the corresponding author, also on behalf of any co-authors.

5. Reprints

Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.

