

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Campus Botucatu**

**Pós-Graduação em Ciências Biológicas - AC: Zoologia**

**Doutorado**

**Avaliação morfológica e molecular do gênero  
*Xiphopenaeus* no Atlântico Ocidental e Pacífico: existe  
apenas uma espécie?**

**Abner Carvalho-Batista**

**Orientador: Prof. Dr. Rogério Caetano da Costa**

**Co-Orientadora: Dra. Mariana Terossi Rodrigues Mariano**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP - Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Zoologia.

**Botucatu**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho-Batista, Abner.

Avaliação morfológica e molecular do gênero *Xiphopenaeus*  
no Atlântico ocidental e Pacífico : existe apenas uma espécie?  
/ Abner Carvalho-Batista. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio  
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Rogério Caetano da Costa  
Coorientador: Mariana Terossi Rodrigues Mariano  
Capes: 20400004

1. Análise morfológica. 2. Camarão. 3. Decapode  
(Crustáceo). 4. Microscopia eletrônica de varredura.  
5. Atlântico, Oceano. 6. Pacífico, Oceano.

Palavras-chave: Dendrobranchiata; Espécies crípticas; Fluxo  
gênico; Identificação molecular; Microscopia eletrônica de  
varredura.

Nenhuma grande descoberta jamais foi feita sem um palpite ousado.

*Isaac Newton*

Dedico esta tese a minha família, por estar sempre ao meu lado, desde o início da caminhada, e a todos que durante esses últimos quatro anos contribuíram de alguma forma para realização deste estudo e para a minha formação.

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

### **Agradecimentos**

Agradeço ao Prof. Dr. Rogério Caetano da Costa por todos esses anos de oportunidades e aprendizado, por ter sido um grande orientador desde meu primeiro ano de graduação. Também pelas condições oferecidas para a realização desta tese e por todas as sugestões fundamentais. Além disso, pela grande amizade, confiança e incentivo, presentes em todas as fases de minha carreira científica. Assim fica o compromisso de retribuir tudo o que fez e continua fazendo por mim.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela Bolsa Produtividade PQ2 (#304784/2011-7).

À CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida para a realização desta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos financeiros concedidos para o projeto Temático BIOTA (Proc. 2010/50188-8) "Crustáceos Decápodes: multidisciplinaridade na caracterização da biodiversidade marinha do Estado de São Paulo (taxonomia, espermiotaxonomia, biologia molecular e dinâmica populacional)", ao qual esta tese encontra-se vinculada.

Aos professores Dr. Fernando L. Mantelatto (USP, Ribeirão Preto) na qualidade de coordenador, Dr. Fernando J. Zara (UNESP, Jaboticabal) e Dr. Antônio L. Castilho (UNESP, Botucatu), que juntamente ao meu orientador Dr. Rogério C. da Costa (UNESP, Bauru), foram os responsáveis por todo o planejamento e desenvolvimento do projeto Temático BIOTA-FAPESP.

Ao ministério do Meio Ambiente - IBAMA - (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis) por conceder a licença para coletar o material biológico nas áreas estudadas.

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas; ao Departamento de Zoologia e Instituto de Biociências de Botucatu (IBB – UNESP), pelas facilidades oferecidas durante a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências (FC) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Bauru, pela estrutura fornecida para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Zara e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal por toda infra-estrutura e recursos para o desenvolvimento das análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos responsáveis por empréstimos de espécimes e de amostras de tecido de coleções científicas: Prof. Dr. Darryl Felder (ULLZ), Mcs. Inácia Maria Vieira (IEPA), Fernando Alvarez (CNCR), Glauca Pontes (MCP) e ao Dr. Peter Dworschak (NHMW) pelas fotografias do espécime tipo de *Xiphopenaeus kroyeri*.

Aos amigos Raphael Grabowski, Edvanda Souza Carvalho e Rafael Robles, por ajudarem na obtenção e devolução de espécimes e tecidos vindos de empréstimos de coleções científicas.

Ao geógrafo e companheiro de república Marcelo Navarro Cardenuto, pela confecção dos mapas utilizados nessa tese.

Aos pescadores Antônio José da Silva Riscado (Báu) de Macaé e Djalma Rosa (Passarinho) de Ubatuba, não apenas por realizarem com muita competência e profissionalismo o trabalho amostral, mas também pela amizade, extrema educação que sempre nos trataram e inúmeros ensinamentos sobre a pesca e a vida no mar.

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

A todos os companheiros de LABCAM: Gabriel (Woody), Thiago (Chuck Norris), Ana Paula, Regis, Sarah, João, Daphine, Sabrina, Julia, Josiane, Emerson (Cotia), Dalila, Lizandra, Icaro, Natalia, Fernanda e Isabela, pela amizade, convivência e toda a ajuda que já me prestaram nesses anos todos.

Ao amigo Alexandre Ribeiro da Silva (DinoZord) por me receber em sua casa em Botucatu, oferecendo hospedagem durante o período em que cursava as disciplinas exigidas para o doutorado.

Aos amigos Léo Jaime e Guilherme por me receberem em suas casa, em Jaboticabal, durante as análises de microscopia eletrônica de varredura.

A todos os demais membros do IML (Invertebrate Morphology Laboratory), Lucas, Camila, Fernanda, Timoteo, Marcia e Maria Alice por terem me recebido de portas abertas e terem me dado toda a ajuda necessária para o preparo das amostras e realização das análises.

Ao professor Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto, por ter me recebido em seu laboratório e disponibilizado toda a estrutura necessária para realização das análises moleculares desta tese, e por tudo o que aprendi nos meses em que estive lá.

Ao professor Dr. Antônio Leão Castilho por fornecer espécimes para as análises, além manter sempre abertas as portas de seu laboratório para que eu pudesse dar continuidade aos meu estudos enquanto estava em Botucatu.

A minha co-orientadora Dra. Mariana Terossi por toda sua disposição, paciência e otimismo, ajudando a encontrar soluções para problemas que iam surgindo durante a elaboração desta tese. Suas sugestões, correções, críticas, sem dúvida alguma, contribuíram em muito para melhorar este trabalho.

Ao Dr. Rafael Robles por todos os ensinamentos de biologia molecular. Pelas discussões questionamentos que me fizeram pensar muito mais sobre meu trabalho.

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Ao amigo Mateus Lopes, grande companheiro nas viagens de coleta ao Rio Grande do Norte e Amapá, as quais trouxeram resultados muito importantes para o presente estudo, sem dúvida foram grandes momentos desse doutorado.

A todos os demais companheiros do LBSC, Ana Francisca (Kelps), Natalia Rossi, Fabrício, Edvanda, Raquel, Mariana (Kana), Tatiana, Mateus, Barbara, Juliana, Silvia, Keity, Ana e Caio, pela amizade e por todos os momentos divertidos, bolos de aniversário e por toda a ajuda que me deram.

Aos amigos Danilo, André (Besouro) e Bruno Francisco (Sushi) pelos anos de amizade e tudo de divertido que passamos juntos nesse tempo.

Ao meu irmão Eriko por todo que ele me ajudou nos últimos anos, e pela grande amizade durante a vida inteira.

A minha namorada Monica, por todo o carinho, companheirismo, amizade e por ter tornado meus dias mais felizes na metade final desse doutorado.

E por fim, aos meus pais Carlos e Durcineia, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e me incentivando, desde o início.



**Sumário**

Resumo.....	10
Abstract .....	12
1. Introdução.....	14
2. Objetivos .....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. Material e Métodos .....	21
3.1 Obtenção dos espécimes .....	21
3.2 Obtenção dos dados moleculares .....	25
3.2.1 Extração de DNA.....	25
3.2.2 Amplificação dos genes.....	26
3.2.3 Purificação do produto de PCR .....	27
3.2.4 Sequenciamento do DNA .....	27
3.2.5 Edição das sequências .....	28
3.3 Análises de distância genética.....	28
3.4 Análises filogenéticas .....	29
3.4.1 Datação molecular.....	30
3.5 Análises morfológicas comparativas .....	30
3.6 Microscopia eletrônica de Varredura .....	31
3.7 Análises morfológicas comparativas do holótipo de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> .....	31
3.8 Análises populacionais .....	31
3.8.1 Rede de haplótipos.....	31
3.8.2 Análises de estrutura populacional: Análises de Variância Molecular (AMOVA).....	32
3.8.3 Estatística descritiva.....	32
3.8.4 Testes de neutralidade .....	32
3.8.5 Mismatch distribution .....	33
4. Resultados.....	33
4.1 Análises de distância genética.....	34
4.2 Análises filogenéticas .....	39
4.3 Análises morfológicas comparativas .....	42
4.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	44
4.5 Análises comparativas com o holótipo de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> .....	48

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

4.6 Análises populacionais .....	54
4.6.1 Rede de haplótipos .....	54
4.6.2 Análise de variância molecular (AMOVA).....	56
4.6.3 Estatística descritiva.....	57
4.6.4 Testes de Neutralidade .....	59
4.6.5 Mismatch distribution .....	60
5. Discussão.....	61
6. Conclusão .....	74
Referências .....	75

## **Resumo**

Espécies crípticas constituem um desafio ao conhecimento da biodiversidade e tem sido tema de um número cada vez maior de estudos nos últimos anos. O gênero *Xiphopenaeus* por 90 anos teve reconhecidamente duas espécies, *Xiphopenaeus kroyeri* no Atlântico e *Xiphopenaeus riveti*, no Pacífico. Contudo, nos últimos 20 anos, a taxonomia do gênero tem passado por grandes reviravoltas, com a sinonimização das duas espécies em 1997 com base em dados morfológicos, tornando o gênero monotípico, com *X. kroyeri* como a única espécie válida. E nos últimos dez anos além da revalidação de *X. riveti* baseada em dados moleculares, a existência de na verdade, duas espécies crípticas no Atlântico, veio a tona. Assim, o presente estudo averiguou utilizando ferramentas moleculares (os genes mitocondriais Citocromo c Oxidase Subunidade I e 16S rDNA) e morfológicas, o possível número de espécies constituintes do gênero *Xiphopenaeus*, e quais caracteres morfológicos podem ser utilizados na identificação destas. Foram analisados indivíduos provenientes de 16 localidades nos oceanos Atlântico e Pacífico. Foi detectada a divisão dos indivíduos analisados em cinco grupos, três no Atlântico, aqui denominadas a principio de A1, A2 e A3 e dois no Pacífico, P1 e P2, os quais pelas divergências genéticas observadas em ambos os marcadores empregados, mostraram-se constituir cinco diferentes espécies. Tal divisão foi suportada pelas demais análises empregadas (análises filogenéticas, Amova, rede de haplótipos). As fotografias obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura dos caracteres sexuais secundários dos machos mostraram diferenças morfológicas substâncias capazes de separar quatro das cinco espécies detectadas nas análises moleculares (uma vez que não foram encontrados machos do grupo P2). A análise comparativa com o holótipo de *Xiphopenaeus kroyeri* mostrou que espécie corresponde ao grupo A1 detectado no presente estudo, e que A2 e A3 são novas espécies a serem

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

descritas. Por fim, valores significativos de  $F_{st}$  foram encontrados entre as populações de A1, porém sem um padrão geográfico, enquanto as demais espécies do Atlântico parecem ser panmíticas, e sinais de expansão demográfica recente e desvios da seleção neutra foram detectados nas três.

Palavras chave: Dendrobranchiata, espécies crípticas, identificação molecular, microscopia eletrônica de varredura, fluxo gênico.

## **Abstract**

Cryptic species comprise a challenge to the knowledge of biodiversity, and they have been increasingly studied in past recent years. For 90 years, the genus *Xiphopenaeus* had recognized two species: *Xiphopenaeus kroyeri*, in the Atlantic, and *Xiphopenaeus riveti*, in the Pacific. In the last 20 years, however, the taxonomy of the genus has been changed; the synonymization of the species in 1997, based on morphological characters, turned the genus monotypic, with *X. kroyeri* as the only valid species. In the last decade, besides the revalidation of *X. riveti* based on molecular data, the existence of two cryptic species in the Atlantic came to light. Thus, the present study aimed to verify, using molecular (the mitochondrial genes Cytochrome Oxidase Subunit I and 16S rDNA) and morphological tools, how many species comprise the genus *Xiphopenaeus*, and which morphological characters can be used for their reliable identification. Individuals from 16 localities in Atlantic and Pacific oceans were analyzed. A structuration of the analyzed individuals into five groups was observed, three from the Atlantic (A1, A2 and A3) and two from the Pacific (P1 and P2). The genetic divergence observed indicates the existence of five different species. Such structuration was also supported by the phylogenetic analyzes, AMOVA and haplotype network. The images obtained by scanning electronic microscopy of secondary sexual characters of males showed morphological differences reliable enough to discriminate four of five species detected by molecular analyzes (there were no males from P2). The comparative analyzes of the holotype of *Xiphopenaeus kroyeri* showed that the specimen corresponds to A1 group, and A2 and A3 are new species to be described. Finally, statistically significant  $F_{st}$  values were found among A1 populations, although without a clear geographic pattern. The other species from Atlantic seems to be

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

panmictic, with recent demographic expansion and deviation of neutral selection been observed for the three species.

Key words: Dendrobranchiata, cryptic species, molecular identification, scanning electronic microscopy, gene flow.

# **1. Introdução**

São consideradas crípticas quando duas ou mais espécies são classificadas como uma única, devido a sua similaridade morfológica (Bickford et al., 2007). Principalmente devido ao desenvolvimento de métodos moleculares, as pesquisas envolvendo espécies crípticas têm aumentado nas últimas duas décadas (Pfenninger & Schwenk, 2007), demonstrando que elas podem ser mais comuns no reino animal do que se pensava (Trontelj & Fiser, 2009). Sua proporção na natureza ainda não é totalmente conhecida, contudo, esta parece similarmente distribuída entre os mais altos níveis taxonômicos no reino animal e entre as regiões biogeográficas (Pfenninger & Shwenk, 2007).

Uma suposição comum, porém nem sempre correta, é que espécies crípticas são frutos de especiação muito recente, e os caracteres morfológicos diagnósticos ainda não tiveram tempo de evoluir (Bickford et al., 2007). Estudos em diferentes táxons, como peixes ósseos, anfípodas e copépodos têm mostrados que espécies crípticas podem apresentar divergências consideravelmente antigas, sendo a similaridade mantida por estase morfológica (Colborn et al., 2001; Rocha-Olivares et al., 2001; Léfubere et al., 2006).

As recentes descobertas de espécies crípticas têm levado a mudanças de paradigmas em ecologia, com espécies anteriormente consideradas generalistas sendo descobertas como complexos de espécies especialistas (Hebert et al., 2004a; Blair et al., 2005; Stireman et al., 2005; Santos et al., 2014). Similarmente, relações consideradas espécie-específico mostraram, na verdade, envolver mais uma espécie (Molbo et al., 2003).

A maioria das informações processadas pelo cérebro humano é visual, o que explica porque caracteres morfológicos são mais proeminentes em nossas classificações

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

do mundo natural do que os químicos, auditivos e comportamentais (Bickford et al., 2007). Espécies crípticas são aparentemente comuns naqueles tipos de organismos em que o olfato é muito mais desenvolvido do que a visão. Embora as diferenças sejam invisíveis ao olho humano, essas espécies são evidentemente não similares entre si. Assim, espécies crípticas são aparentemente mais raras em organismos nos quais a visão tem maior papel na reprodução (Mayr, 1963).

A ocorrência de espécies crípticas tende a ser maior em táxons marinhos, uma vez que, os taxonomistas raramente tem a chance de observar esses organismos em vida e, conseqüentemente, existe uma lacuna no conhecimento sobre seu comportamento (Knowton, 2000). Além disso, organismos marinhos geralmente dependem de sinais químicos para o reconhecimento de gametas e seleção sexual e variações interespecíficas nessas características raramente levam a um traço morfológico visível (Palumbi, 1994; Stanhope, 1992). Apesar disso, diversos grupos marinhos, como os crustáceos decápodes tem sua identificação baseada principalmente em caracteres morfológicos que podem ser reconhecidos em espécimes preservados (McLaughlin et al., 1982).

Um exemplo da problemática envolvendo espécies crípticas é verificado no camarão peneídeo *Xiphopenaeus* Smith, 1869. Esse gênero foi descrito em 1869 com a espécie tipo *Xiphopeneus hartii* Smith, 1869 a partir de exemplares do sul da Bahia. Posteriormente esta espécie tornou-se sinônimo júnior de *Penaeus kroyeri* Heller, 1862, descrita para o Rio de Janeiro, passando então ao nome de *Xiphopeneus kroyeri* (Heller, 1862). Esta última foi a única espécie conhecida para o gênero até 1907, quando foi então descrito *Xiphopeneus riveti* Bouvier, 1907 para a costa do Peru. Em 1969, por decisão do International Commission on Zoological Nomenclature (Opinion 864) o gênero passou a se chamar *Xiphopenaeus*.



## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Há algumas controversas na literatura sobre a validade de *X. riveti*. Considerando esta como válida, o gênero contaria com duas espécies, uma em cada costa das Américas, sendo *X. kroyeri*, no Atlântico, com distribuição geográfica da Carolina do Norte, EUA, até Rio Grande do Sul, Brasil (Costa et al., 2007b) e *X. riveti* no Pacífico com a distribuição geográfica se estendendo de Sinaloa, México até Paita, Peru (Perez-Farfante, 1970).

As duas espécies são extremamente similares. Burkenroad (1934) sugeriu que *X. riveti* fosse apenas uma variedade de *X. kroyeri*. Dall et al. (1990) apontaram ambas como exemplo de espécies irmãs. Perez-Farfante & Kensley (1997), em sua revisão da infraordem Dendrobranchiata, consideraram *X. riveti* sinônimo junior de *X. kroyeri* devido a ausência de diferenças morfológicas significativas. O gênero também é considerado monotípico, tendo apenas *X. kroyeri* como espécie válida, por De Grave & Fransen (2011), no “Carideorum Catalogus”.

No entanto, Gusmão et al. (2006) por meio de dados moleculares, utilizando o PCR/RFLP, Polimorfismo de Isoenzimas e sequências do gene Citocromo c Oxidase Subunidade I, propuseram não só a revalidação de *X. riveti*, como também, que *X. kroyeri* trata-se, na verdade, de duas espécies no Atlântico. Contudo, tais autores não apresentaram os caracteres morfológicos que pudessem ser usados para a identificação de cada uma delas. De acordo com tais autores, é provável que, as duas espécies de *Xiphopenaeus* do Atlântico ocorram em abundâncias diferentes e estejam sujeitos a pressões pesqueiras distintas.

Outros dois trabalhos (Francisco, 2009; Pierjorge et al., 2014) utilizando técnicas moleculares, corroboraram também a existência de duas espécies do gênero *Xiphopenaeus* no Atlântico, e o segundo, a validade de *X. riveti* no Pacífico. Contudo, o levantamento bibliográfico realizado durante o presente estudo mostrou que somente

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

nos últimos dez anos, ou seja, após a detecção das espécies crípticas de *Xiphopenaeus* no Atlântico, pelo menos 40 artigos foram publicados abordando biologia populacional, ecologia, biologia pesqueira, fisiologia e toxicologia, além de mais 13 artigos sobre a fauna acompanhante da pesca, todos considerando *X. kroyeri*, como uma única espécie. Isso se deve, provavelmente, à falta de caracteres morfológicos para a identificação das duas espécies. E nessa última década, trabalhos buscando encontrar diferenças morfológicas que pudessem separar as duas espécies crípticas do Atlântico ou diferencia-las claramente de *X. riveti*, também não foram realizados, tampouco trabalhos investigando a possibilidade da existência de espécies crípticas também no Pacífico.

*Xiphopenaeus kroyeri sensu lato* destaca-se como segundo recurso pesqueiro mais importante da região sudeste brasileira, sendo o camarão mais explorado pela pesca no estado de São Paulo (D’Incao et al., 2002; Castro et al., 2005). Além disso, representa cerca de 40% do total das capturas de camarão na costa brasileira (MMA & IBAMA, 2008), chegando a corresponder algumas vezes a 90% da biomassa de camarões capturados em águas rasa (profundidades menores que 20 m) (Costa, 2002; Fransozo et al., 2002; Pantaleão et al., 2016; Costa et al., 2016). Durante a década de 1980 e início da década de 1990, a biomassa média capturada da espécie foi de 10000 t/ano, sofrendo uma grande diminuição nos anos seguintes, entre 2000 e 2012 os desembarques ficaram entre 640 e 3180 t/ano (D’Incao et al., 2002, Instituto de Pesca 2013).

A correta identificação das espécies é fundamental para o conhecimento da biodiversidade e para elaboração de planos de manejo e conservação (Perez-Farfante, 1998; Bortolus, 2008). Recentemente a junção de técnicas moleculares à análise morfológica detalhada de estruturas reprodutivas tem se mostrado eficaz na resolução

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

de problemas taxonômicos e na diferenciação e descrição de espécies crípticas de crustáceos decápodes (Magalhães et al., 2016; Tavares & Gusmão, 2016).

Dentre os diversos marcadores utilizados na identificação molecular, destacam-se os genes mitocondriais, especialmente o Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI) e o 16S rDNA. O genoma mitocondrial possui algumas vantagens em relação ao nuclear, como por exemplo: taxas de mutação mais rápidas, ausência de íntrons, grande número de cópias em cada célula e herança quase exclusivamente materna, sem recombinação (Brown et al., 1979; Ballard & Whitlock, 2004; Ballard & Rand, 2005; Avise, 2009; Hickerson et al., 2010).

Diante disso, um fragmento da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I foi escolhido para a técnica DNA Barcoding, a qual propõe a padronização de um único trecho do DNA para diferenciar todas, ou pelo menos a maioria, das espécies animais (Hebert et al., 2003). A técnica tem como fundamento central o fato de que a variação genética observada entre os indivíduos de uma mesma espécie (variação intraespecífica) é menor do que a variação genética encontrada entre diferentes espécies (variação interespecífica) (Hebert et al., 2003, 2004ab). Essa diferença entre as variações intra e interespecíficas, chamada de Barcoding gap, fornece o meio para a diferenciação entre espécies (Hebert et al., 2004b; Waugh, 2007).

O gene mitocondrial 16S rDNA, consiste em um gene estrutural bastante utilizado para a determinação das relações evolutivas entre os animais, tanto antigas quanto recentes (Kim & Abele, 1990; Schubart et al., 2000). O transcrito deste gene, em associação com proteínas, forma uma estrutura que corresponde à subunidade maior dos ribossomos mitocondriais (Schubart et al., 2000). O uso desse gene em estudos sobre decápodes é frequente, uma vez que, esse tem se mostrado um importante marcador interespecífico (Mantelatto et al., 2007; Rossi & Mantelatto, 2013; Magalhães

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

et al., 2016) e também devido a grande disponibilidade de primers desenvolvidos (Schubart et al., 2000).

Ademais, o gene COI tem sido usado com sucesso na detecção de estruturação populacional em crustáceos decápodes marinhos (Aoki et al., 2012; Titus & Daly, 2015; Rodríguez-Rey et al., 2016). A estruturação genética populacional, ou seja, a forma como a variabilidade genética está distribuída entre e dentro de populações de uma determinada espécie, é o resultado direto da interação entre as forças evolutivas (seleção, deriva, mutação e migração). Os níveis de diversidade genética intra e interpopulacional de uma espécie estão relacionados a qual dessas forças evolutivas tem efeito predominante em um determinado contexto ecológico (Turchetto-Zolet et al., 2013).

O entendimento da estruturação genética das populações é um componente importante para o sucesso e a sustentabilidade do manejo, em longo prazo, dos recursos pesqueiros (Hillis et al., 1996). Estratégias de manejo são geralmente designadas visando à manutenção dos níveis máximos de diversidade genética dentro das populações, baseando-se na premissa que com altos níveis de variação genética as populações teriam maiores chances de resistir a mudanças ambientais (Schubart & Huber, 2006).

*Xiphopenaeus kroyeri* já teve sua estruturação populacional estudada em parte da costa brasileira por Voloch & Sole-Cava (2005) em que os autores utilizaram as aloenzimas, por Martinelli-Lemos et al. (2014) utilizando a região VNTR do DNA em populações do Norte e Nordeste do Brasil e Marques (2015) utilizou os genes mitocondriais no intuito de comparar as populações do sul e sudeste brasileiro e da Venezuela. Contudo, tais estudos foram restritos a um baixo número de localidades, compreendendo apenas pequenas porções da distribuição de *Xiphopenaeus kroyeri*.

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

O estudo de Gusmão et al. (2006), foi o único a investigar a estruturação populacional das duas possíveis espécies crípticas de *Xiphopenaeus kroyeri* do Atlântico, sendo o trabalho que cobriu a maior extensão dentro de sua distribuição geográfica, embora não tenham sido incluídas localidades da América do Norte. Até o momento não há estudos genéticos em que tenham sido incluídos indivíduos provenientes de mais de uma localidade do Pacífico, ou seja, estruturação genética entre as populações de *Xiphopenaeus riveti* ainda é totalmente desconhecida.

Assim, um estudo abrangendo uma maior extensão geográfica dentro da distribuição do gênero (incluindo Oceano Pacífico) e que considere a presença de possíveis espécies crípticas, ainda se faz necessário. Ademais o uso de diferentes marcadores moleculares dificulta a comparação entre os resultados dos estudos realizados até o momento.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Devido ao conflito de informações existentes na literatura sobre o status taxonômico de *Xiphopenaeus kroyeri*, e a possibilidade dos estudos realizados sobre a espécie estarem incorrendo em erros, por considerarem como uma, o que na verdade pode se tratar de um complexo de espécies, o presente estudo é tem como objetivo geral utilizar ferramentas moleculares e morfológicas para responder as seguintes perguntas:

O gênero *Xiphopenaeus* é mesmo monotípico como proposto por Perez-Farfante & Kensley (1997), ou pode ser constituído por duas ou mais espécies, como apontado por estudos mais recentes? E no caso do gênero ser composto por mais de uma espécie, existe algum carácter capaz de diferencia-las?

## **2.2 Objetivos específicos**

Para alcançar os objetivos gerais os seguintes objetivos específicos foram:

- Verificar a identidade taxonômica de cada um dos indivíduos analisados de *Xiphopenaeus*, coletados tanto Atlântico como no Pacífico, por meio da análise dos genes COI e 16S rDNA.

- Comparar a morfologia dos indivíduos de *Xiphopenaeus* utilizados nas análises moleculares, tanto por meio de caracteres tradicionalmente utilizados na taxonomia do grupo, como também da ultraestrutura dos caracteres sexuais secundários, em busca de diferenças que possam servir para diferenciação das espécies do gênero.

- Uma vez detectadas diferenças entre as espécies crípticas do gênero no Atlântico, realizar a comparação com o holótipo de *Xiphopenaeus kroyeri*, a fim de checar qual delas realmente se trata da espécie descrita por Heller (1862).

- Uma vez detectadas duas ou mais espécies para o gênero, investigar a distribuição de cada uma delas, bem como descrever a distribuição da diversidade genética e sua estruturação populacional utilizando o gene COI como marcador.

## **3. Material e Métodos**

### **3.1 Obtenção dos espécimes**

Foram obtidos espécimes de 16 localidades, sendo 14 do Atlântico e duas do Pacífico (Tabela 1, Figura 1). Grande parte dos espécimes analisados estava depositada na Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CCDB/FFCLRP/USP).

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Outros exemplares foram adquiridos por meio de coletas de arrasto realizadas pelos membros do Laboratório de Biologia de Camarões Marinhos e de Água Doce (LABCAM), em Baía Formosa (Rio Grande do Norte, Brasil), Macaé (Rio de Janeiro, Brasil), Ubatuba e Cananéia (São Paulo, Brasil) e Penha (Santa Catarina, Brasil) e do Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC) em Maragogi (Alagoas, Brasil). Esses animais foram então armazenados em álcool etílico 80%, e, posteriormente, depositados na CCDB/FFCLRP/USP. Adicionalmente foram incluídos nas análises espécimes provenientes de empréstimos de coleções científicas: Museu da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP); Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA), Colección Nacional de Crustaceos, Universidad Autonoma de Mexico (CNCR) e doações de tecidos e exemplares de instituições científicas: Zoological Collection of the University of Louisiana, Lafayette, EUA (ULLZ).

## Carvalho-Batista, A. 2017

Tabela 1 - Relação de espécimes do gênero *Xiphopenaeus* utilizados nas análises moleculares. CCDB: Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil; CCLC: Coleção de Crustáceos do Laboratório de Biologia de Camarões Marinhos e de Água Doce, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, Brasil; CNCR: Colección Nacional de Crustaceos, Universidad Autonoma de México; IEPA: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá, Brasil; MCP: Museu de Ciência e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; ULLZ: Zoological Collection of the University of Louisiana, Lafayette, EUA

Oceano	Localidade	Coleção	Genbank Accession number	
			COI	16S
Atlântico	Galveston, Texas, EUA,	ULLZ 9900	KY449152-154	KY449075
	Tabasco, México	CCDB 5461	KY449141-149	-
	Carmen, Campeche, México,	CNCR 2830	KY449150-051	-
	Oiapóque, Amapá, Brasil	IEPA 1617 – 1618	KY449136-137	KY449072, KY449076
	Vigia, Pará, Brasil	MCP 2024	KY449138-140	KY449073
	Baía Formosa, Rio Grande do Norte, Brasil	CCDB 5337	KY449091-099	KY449066
	Maragogi, Alagoas, Brasil	CCDB 5338 – 5847	KY449112-129	KY449074
	Aracaju, Sergipe, Brasil	CCDB 5246	KY449086	KY449068
	Marataizes, Espírito Santo, Brasil	CCDB 3985	KY449103-106	-
	Macaé, Rio de Janeiro, Brasil	CCDB 5339	KY449100-102	KY449069
	Ubatuba, São Paulo, Brasil	CCDB 5018-5019	KY449078-085	KY449065
	Santos, São Paulo, Brasil	CCDB 3663	KY449107-111	-
	Cananéia, São Paulo, Brasil	CCLC 0418	KY449130-135	-
Penha, Santa Catarina, Brasil	CCDB 5292	KY449087-090	KY449067	
Pacífico	Tehuantepec, Oaxaca, México	CCDB 0171	KY449160	KY449070
	Sierpe, Puntareñas, Costa Rica	CCDB 5247	KY449155-159	KY449071





Figura 1 – Mapa com as localidades de procedência dos indivíduos do gênero *Xiphopenaeus* utilizados nas análises. 1 – Galveston, Texas, Estados Unidos; 2 – Tabasco, México; 3 – Carmen, Campeche, México; 4 – Oiapoque, Amapá, Brasil; 5 – Vigia, Pará, Brasil; 6 – Baía Formosa, Rio Grande do Norte, Brasil; 7 – Maragogi, Alagoas, Brasil; 8 – Aracaju, Sergipe, Brasil; 9 – Marataízes, Espírito Santo, Brasil; 10 – Macaé, Rio de Janeiro, Brasil; 11 – Ubatuba, São Paulo, Brasil; 12 – Santos, São Paulo, Brazil; 13 – Cananéia, São Paulo, Brasil; 14 – Penha, Santa Catarina, Brasil; 15 – Tehuantepec, Oaxaca, México; 16 – Sierpe, Puntarenas, Costa Rica.

## **3.2 Obtenção dos dados moleculares**

### **3.2.1 Extração de DNA**

Em cada lote foram selecionados, quando possível, dez indivíduos para extração de DNA. O DNA genômico foi extraído do tecido muscular do abdome dos exemplares selecionados. Dois métodos distintos para obtenção do material genômico foram empregados, a extração salina e a extração utilizando Chelex® 100 – *Molecular Biology Grade Resin*.

Para o primeiro tipo, o tecido retirado foi inicialmente incubado por 48 h em 600 µl de tampão de lise a 65°C adicionado de 200 µl de proteinase K (500 µg/ml). Em seguida, o tecido remanescente foi macerado quando necessário e as proteínas foram separadas e removidas pela adição de 200 µl acetato de amônio (7,5 M) seguida por centrifugação (14000 rpm a 18°C) por 10 minutos. Posteriormente, o DNA foi precipitado pela adição de 600 µl isopropanol resfriado (-20°C) seguido de centrifugação (14000 rpm a 18°C) por 10 minutos e armazenado em baixa temperatura (-20°C). Por fim, após no mínimo 24 horas de descanso, o resíduo (*pellet* de DNA) resultante foi lavado com etanol 70%, liofilizado e ressuspendido em 20 µl tampão TE. Para o segundo tipo, uma suspensão de 5% de Chelex® foi adicionada ao tecido, assim como 10 µl de proteinase K (20mM). Em seguida, a extração foi incubada por 12 horas a 55°C. Terminado este período e a fim de cessar a atividade da proteinase K, a temperatura foi elevada a 95°C por 3 minutos. Posteriormente, depois de uma centrifugação por 3 minutos a 14000 rpm, todo o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo. Finalizados ambos os métodos de extração, a concentração e a qualidade do DNA extraído foram analisados por espectrofotometria no NanoDrop 1000®. Esse procedimento permitiu adequar a concentração do DNA

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

extraído à concentração necessária para a realização da amplificação dos genes de interesse pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Sambrook et al., 1989).

### **3.2.2 Amplificação dos genes**

As amplificações de aproximadamente 700 pares de bases do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e aproximadamente 550 pares bases do gene 16S rDNA foram realizadas pela reação de PCR em termocicladores AB (Applied Biosystem Life Technologies) e PxE 0.2 Thermal Cycler (Thermo® Scientific). Para cada gene foram utilizados conjuntos de primers específicos (Tabela 2).

Cada produto de PCR foi obtido por meio de uma reação de 25 µL, sendo 6,5 µL de H<sub>2</sub>O Mili-Q, 5 µL de betaína (5M), 4 µL de dNTPs (10mM), 3 µL de PCR Buffer (10x), 3 µL MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de primers (10-20 µM), 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (Thermo Fisher) (5U/ µL) e 1 µL de DNA (50 ng/µL).

A reação de amplificação do fragmento do gene COI, foi caracterizada por uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento dos primers a 40 - 46 °C por 30s e extensão a 72°C por 1 min (após as amostras foram submetidas a uma extensão final por 10 min a 72°C). Enquanto para 16S rDNA, foi caracterizada por desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento dos primers a 48 °C por 30s e extensão a 72°C por 1 min (após as amostras foram submetidas a uma extensão final por 10 min a 72°C). Os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e fotografados com câmera digital C-7070 da Olympus® em um transiluminador UV Transilluminator M20 da UVP®.

## Carvalho-Batista, A. 2017

Tabela 2 - Primers utilizados na amplificação dos genes de interesse (COI: Citocromo Oxidase Subunidade I e 16S rDNA) por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Gene	Primer	Sequência	Referência
COI	HCO1	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Folmer et al., 1994
	LCO1	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3'	
	COH6	5'-TADACTTCDGGRTGDCCAAARAAYCA-3'	Schubart & Huber, 2006
	COL6b	5'-ACAAATCATAAAGATATYGG-3'	
	COIAH2o	5'-GACCAAAAAATCAGAATAAATGTTG-3'	Mantelatto et al., 2016
	COIAL2o	5'-ACGCAACGATGATTATTTTCTAC-3'	
16S	16H9	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAC-3'	Palumbi & Benzie, 1991
	16L9	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	

### 3.2.3 Purificação do produto de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi feita com o kit SureClean Plus® (Bioline). A adição ao produto de PCR ao mesmo volume de SureClean, homogeneização e incubação a temperatura ambiente por 10 min. Após centrifugação por 15 minutos a 14000 rfc e descarte do sobrenadante, foi adicionado etanol 70% duas vezes o volume da amostra e, posteriormente, misturado no vórtex. Foi realizada a centrifugação por 15 minutos a 14000 ref, sendo o sobrenadante descartado e as amostras secas em um *Concentrator Eppendorf* e resuspendidas em 15 µL de tampão TE. A concentração e a qualidade do DNA amplificado e purificado foram analisados por espectrofotometria no NanoDrop 1000®.

### 3.2.4 Sequenciamento do DNA

Após purificação e precipitação, os produtos das reações de PCR foram sequenciados em sequenciador automático ABI 3100 Genetic Analyzer® (Applied

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Biosystems Life Technologies), do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

### **3.2.5 Edição das sequências**

Todas as sequências foram analisadas pelo sequenciamento de ambas as fitas do DNA e comparadas com sequências depositadas no GenBank. A edição das sequências e obtenção das sequências consenso foram realizados no programa computacional BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999). Para identificação de possíveis similaridades entre as sequências isoladas e sequências previamente descritas para outros organismos, as sequências obtidas foram submetidas a buscas online, utilizando o programa BLASTn (Altschul et al., 1990) através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), “website” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Posteriormente, foram determinadas as sequências de aminoácidos deduzidos para o gene COI, utilizando-se a plataforma on-line EMBOSS Sixpack ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_sixpack/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_sixpack/)), para verificar a presença de códons de parada.

### **3.3 Análises de distância genética**

As sequências obtidas de ambos os genes de *Xiphopenaeus* foram previamente editadas e alinhadas com auxílio dos programas Clustal W (Thompson et al., 1994) com interface no Bioedit. Também foram incluídas no alinhamento as sequências de quatro espécies de Dendrobranchiata, *Farfantepeneaus paulensis* (Pérez Farfante, 1967) (Genbank Accession number KF783861, KY449062), *Farfantepeneaus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Genbank Accession number KF783862, KY449063) e *Rimapeneaus constrictus* (Stimpson, 1874) (Genbank Accession number KF783863, KT959496),

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

*Belzebub faxoni* (Borradaile, 1915) (Genbank Accession number KY449077, KY449064) as quais foram utilizadas como grupo externo nas análises de distância e filogenética.

O modelo de substituição Kimura 2 parâmetro (Kimura, 1980) foi empregado nos cálculos das matrizes de distância por ser o que apresenta melhor desempenho quando as distâncias genética são baixas (Nei & Kumar, 2000; Hebert et al., 2003). Os dados das matrizes foram agrupados pelo método de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), com auxílio do programa MEGA versão 5 (Tamura et al., 2011).

### **3.4 Análises filogenéticas**

A análise filogenética de Máxima Verossimilhança entre os indivíduos de *Xiphopenaeus* foi realizada utilizando o programa RAxML X-SEDE (Stamatakis, 2006) na plataforma on-line CIPRES (Miller et al., 2010).

O método de Máxima Verossimilhança tenta inferir a árvore evolutiva por meio da busca da árvore que maximiza a probabilidade de observação dos dados, ou seja, calcula a árvore com maior probabilidade de ocorrência, podendo levar em consideração parâmetros como a taxa de substituição e frequência de bases, a partir de um modelo evolutivo escolhido (Russo et al., 2010; Hall, 2011).

Todas as sequências de ambos os genes foram previamente testadas quanto a saturação por meio do teste de saturação de Xia et al. (2003) implementado no software DAMBE e, os alinhamentos foram submetidos à análise no software Gblocks (Castresana, 2000; Talavera & Castresana, 2007) implementado online pelo *Castresana Lab, Animal Biodiversity and Evolution Program* (<http://molevol.cmima.csic.es/castresana/index.html>) para a remoção de regiões muito variáveis.

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

### **3.4.1 Datação molecular**

Utilizando-se os dados obtidos para o gene COI, foi realizada uma análise de datação molecular por meio de Inferência Bayesiana, utilizando um relógio molecular estrito no programa Mr. Bayes (Ronquist et al., 2012) on X-SEDE na plataforma on-line CIPRES (Miller et al., 2010). O modelo de substituição de nucleotídeos foi HKY+G+I (Hasegawa et al. 1985) selecionado pelo Bayesian Information Criterion, no software jModelTest 2.1.4 (Darriba et al., 2012) A calibração do relógio foi realizada com base na taxa de substituição do gene COI (0,007 por milhão de anos) baseada na taxa de divergência de 1,4% por milhão de anos estimada por Knowlton & Weigt (1998). As análises foram realizadas com 50.000.000 gerações com frequência de amostra a cada 1.000 gerações, foram descontados o primeiro quarto de árvores (burn-in: 25%). A qualidade da análise foi avaliada no software Tracer (Rambaut et al., 2014). As topologias finais foram visualizadas e editadas no programa FigTree 1.4.3 (Rambaut, 2016).

### **3.5 Análises morfológicas comparativas**

Foram realizadas análises comparativas da morfologia externa dos indivíduos utilizados nas análises moleculares. Essas análises tiveram o intuito de buscar caracteres que pudessem separar possíveis linhagens detectadas nas análises moleculares, bem como as duas espécies anteriormente reconhecidas para o gênero, *X. riveti* e *X. kroyeri*. Dessa forma, todos os indivíduos cuja identidade molecular pôde ser atestada foram minuciosamente analisados quanto à sua morfologia, utilizando uma Estereomicroscópio Olympus SZX7. A busca de novos caracteres foi direcionada através dos trabalhos de descrição das espécies do gênero e outros voltados para sua a

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

taxonomia (Heller, 1862; Smith, 1869; Bouvier, 1907; Burkenroad, 1934; Perez-Farfante & Kensley, 1997).

### **3.6 Microscopia eletrônica de Varredura**

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), os caracteres sexuais secundários petasmas, apêndices masculinos (no caso dos machos) e tético (para as fêmeas), de indivíduos utilizados nas análises moleculares, foram selecionados. As amostras foram desidratadas em álcool (100%) e submetidas ao ponto crítico EMS 850, por 30 minutos. Uma vez completamente secas, as amostras foram fixadas à suportes metálicos e recobertas com ouro (5nm) no sputtering Danton Vacuum Desk II. Todas as amostras foram analisadas e fotografadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol SEM JSM 5410 em 15KV electron beam.

### **3.7 Análise morfológica comparativa do holótipo de *Xiphopenaeus kroyeri***

O espécime holótipo, depositado no museu de Viena, coletado no Rio de Janeiro, utilizado para a descrição de *Xiphopenaeus kroyeri* por Heller em 1862 teve a morfologia do petasma examinada por meio de fotografias retiradas pelo curador da coleção zoológica Dr. Peter Dworschak.

### **3.8 Análises populacionais**

#### **3.8.1 Rede de haplótipos**

As redes de haplótipos foram construídas pelo método de Median-Joining no programa Network 5.0.0.0 (Bandelt et al., 1999). Como resultado é gerada uma rede, na qual os haplótipos são conectados por um ao outro por um passo mutacional, representado por um traço, e os haplótipos não amostrados são representados por



## **Carvalho-Batista, A. 2017**

pequenas circunferências pretas. Os haplótipos são representados por circunferências, cujos tamanhos são proporcionais à sua frequência.

### **3.8.2 Análise de estrutura populacional: Análise de Variância Molecular (AMOVA)**

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) foi realizada com o intuito de estimar o grau de estruturação populacional genética, considerando a variação em cada sítio nucleotídico separadamente entre os haplótipos e utilizando o programa Arlequin v.3.5 (Excoffier et al., 2005). O  $st$  se refere à covariância entre indivíduos dentro das localidades; o  $sc$ , à covariância entre localidades dentro de um grupo e  $ct$ , à covariância entre grupos. Com o objetivo de obter um refinamento maior do nível de estruturação genética, o  $Fst$  foi calculado comparando pares de localidades (com amostragem superior a um indivíduo) dentro de cada agrupamento identificado nas demais análises (Análise de distância, ou filogenética, rede de haplótipos e AMOVA).

### **3.8.3 Estatística descritiva**

O número de haplótipos ( $h$ ), sítios polimórficos ( $S$ ), diversidade haplotípica ( $Hd$ ), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e número médio de diferenças nucleotídicas ( $K$ ) foram calculados no software DnaSP v.4.10.9 (Rozas & Rozas, 1999). Tais valores foram obtidos tanto para cada localidade amostrada, como para os grupos identificados pelos métodos descritos anteriormente.

### **3.8.4 Testes de neutralidade**

Desvios da neutralidade foram verificados por meio dos testes de neutralidade  $D$  de Tajima e  $Fs$  de Fu conduzidos no programa Arlequin v.3.5 (Excoffier et al., 2005).

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

O primeiro teste leva em consideração a diferença entre as estimativas do parâmetro  $\theta$  ( $\theta = 4Ne\mu$ , onde  $Ne$  é o tamanho populacional efetivo e  $\mu$  é a taxa de mutação de uma sequência), que pode ser utilizado para medir a quantidade de variação acumulada em uma sequência (Tajima, 1989; Clark & Hartl, 2010). O parâmetro  $\theta$  pode ser calculado com base no número de sítios segregantes em uma amostra (os sítios nucleotídicos na amostra que são ocupados por dois ou mais nucleotídeos, representado por  $S$ ) ou no número de diferenças de nucleotídeos (os sítios nucleotídicos na amostra que diferem entre pares de sequências individuais, representado por  $\pi$ ) (Tajima, 1989).

### **3.8.5 Mismatch distribution**

A Mismatch distribution foi implementada no programa DnaSP 4.10.9 (Rozas & Rozas, 1999). Mismatch distribution é uma avaliação do número médio de diferenças par a par entre as sequências de DNA em uma amostra, a qual pode gerar padrões distintos em função da história demográfica da população. Espera-se que a distribuição seja bi ou multimodal em amostras extraídas de populações em equilíbrio demográfico ou subdivisão populacional enquanto a distribuição unimodal mostra populações que passaram por recente expansão ou contração demográfica (Rogers & Harpending, 1992).

## **4. Resultados**

Foi obtido um total de 83 sequências para o gene COI, resultando em um alinhamento final de 596 pares de bases. O número de sítios variáveis foi de 109, dos quais 11 ocorreram na primeira base do códon, dois na segunda e 96 na terceira, sendo que 93 dos sítios variáveis foram filogeneticamente informativos. A composição nucleotídica média foi: T=33,2%, C=21%, A=27,4%, G=18,3%. Adicionadas as

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

sequências das quatro espécies do grupo externo o número de sítios variáveis foi de 218, sendo 157 filogeneticamente informativos.

Para o gene 16S foram obtidas 13 sequências, resultando num alinhamento final de 529 pares de bases. Foram detectados 25 sítios variáveis, dos quais 16 foram filogeneticamente informativos. A composição nucleotídica média foi: T= 31%, C=21,6%, A=34,7%, G= 12,8%. Adicionando as sequências das quatro espécies do grupo externo, foram obtidos 179 sítios variáveis, dos quais 81 foram filogeneticamente informativos.

### **4.1 Análises de distância genética**

A distância genética para o gene COI dentro de *Xiphopenaeus* variou de 0 a 13,5%. Com relação aos grupos externos, as distâncias variaram de 15,7 a 18,7% para *R. constrictus*, de 20,8 a 25,9% para os camarões do gênero *Farfantepenaeus* e de 25,2 a 27,8% para *B. faxoni*. A distância para o gene 16S dentro de *Xiphopenaeus* variou de 0 a 2,9%, a distância para os grupos externos variou de 7,3 a 8,9% para *R. constrictus*, de 18,4 a 22,8% para *Farfantepenaeus* spp. e de 35,4 a 38,1% para *B. faxoni*.

Baseando-se nas análises de divergência genética e nas de Neighbor-Joining (Figuras 2 e 3) para ambos os genes, as sequências foram divididas em cinco grupos, a saber: três no Atlântico (A1, A2 e A3) e dois no Pacífico (P1 e P2). A distribuição geográfica dos cinco grupos pode ser visualizada na tabela 3.

## Carvalho-Batista, A. 2017

Tabela 3 – Grupos genéticos obtidos nas análises de distância com a sigla correspondente a cada um deles e a distribuição geográfica encontrada no presente estudo.

<b>Grupos genéticos (sigla)</b>	<b>Distribuição encontrada</b>
Atlântico 1 (A1)	De Baía Formosa (Rio Grande do Norte) até Penha (Santa Catarina)
Atlântico 2 (A2)	Oiapoque (Amapá), Vigia (Pará) Maragogi (Alagoas) e Cananéia, São Paulo
Atlântico 3 (A3)	Galveston (Texas, EUA) Tabasco e Carmen (México), Oiapóque (Amapá) e Vigia (Pará)
Pacífico 1 (P1)	Sierpe, Costa Rica
Pacífico 2 (P2)	Tehuantepec, México

A análise de distância do gene COI mostrou clara separação entre os grupos definidos, com baixas distâncias entre os espécimes pertencentes ao mesmo grupo (variando de 0 a 1%), enquanto os altos valores foram observados entre indivíduos pertencentes a diferentes grupos. As menores distâncias entre grupos ocorreram entre A2 e A3, variando de 2,7 a 3,3%, enquanto as maiores foram entre A1 e P2, de 12,9 a 13,5% (Figura 4).

O gene 16S também evidenciou a separação entre os grupos, sendo que as distâncias entre os indivíduos pertencentes ao mesmo grupo ficaram entre 0 e 0,4%. As menores distâncias entre indivíduos de diferentes grupos ocorreram entre A1 e P1, variando de 1 a 1,2%, enquanto as maiores ocorreram entre A3 e P2, de 3,2 a 3,6% (Figura 5).

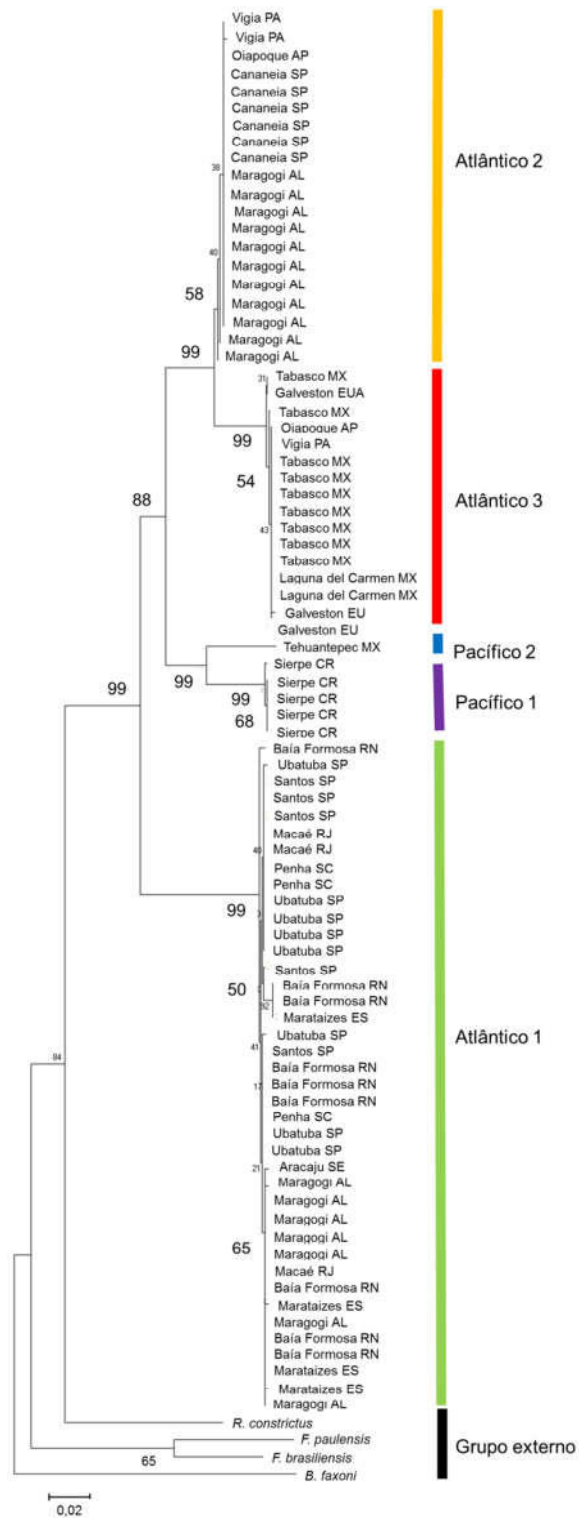


Figura 2 - Dendrograma de análise de cluster baseado em método de distância por meio do algoritmo de Neighbor-Joining das sequências do gene COI dos indivíduos do gênero *Xiphopenaeus*, localidades representam os espécimes e os números são os valores suporte de Bootstrap; valores abaixo de 50% não foram mostrados.

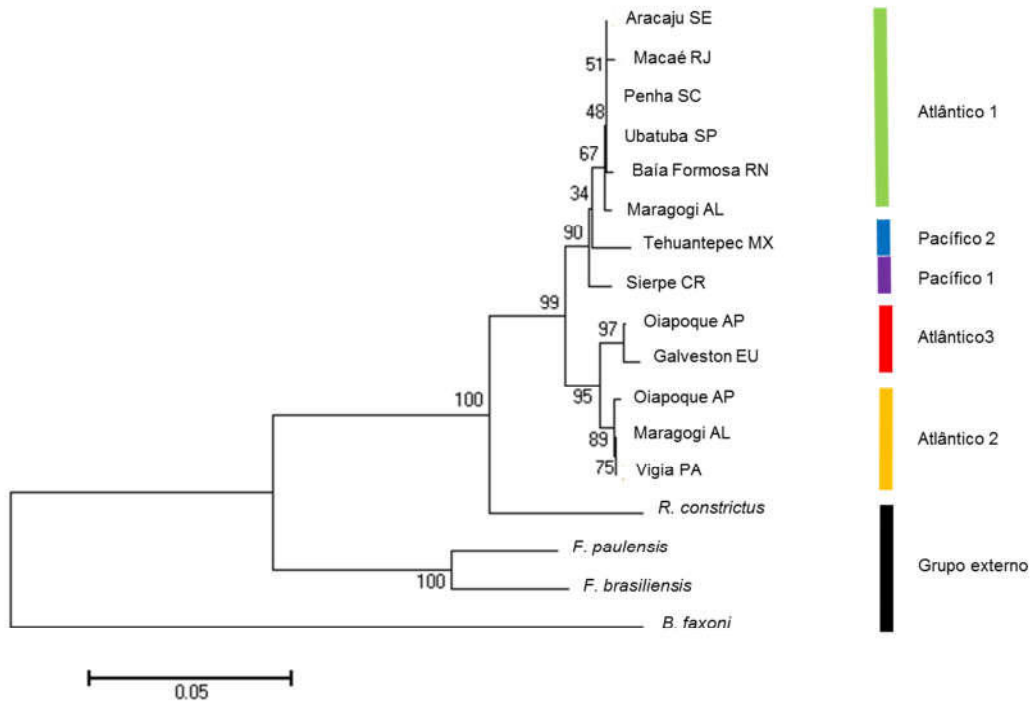


Figura 3 - Dendrograma de análise de cluster baseado em método de distância por meio do algoritmo de Neighbor-Joining das sequências do gene 16S dos indivíduos do gênero *Xiphopenaeus*, localidades representam os espécimes e os números são os valores suporte de Bootstrap; valores abaixo de 50% não foram mostrados.

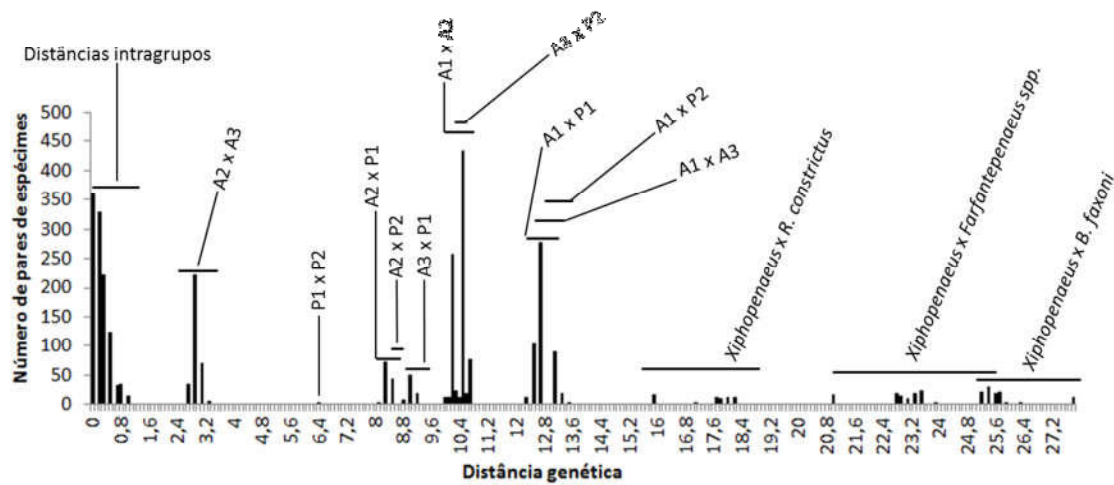


Figura 4 - Histograma de divergência genética Kimura-2-Parâmetros, para o gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), par a par entre os indivíduos do gênero *Xiphopenaeus* e as espécies utilizadas como grupo externo. As linhas acima das barras indicam o intervalo em de distância entre os diferentes grupos predefinidos nas análises anteriores. A1 - Atlântico 1, A2 – Atlântico 2, A3 – Atlântico 3, P1 – Pacífico 1, P2 – Pacífico 2.

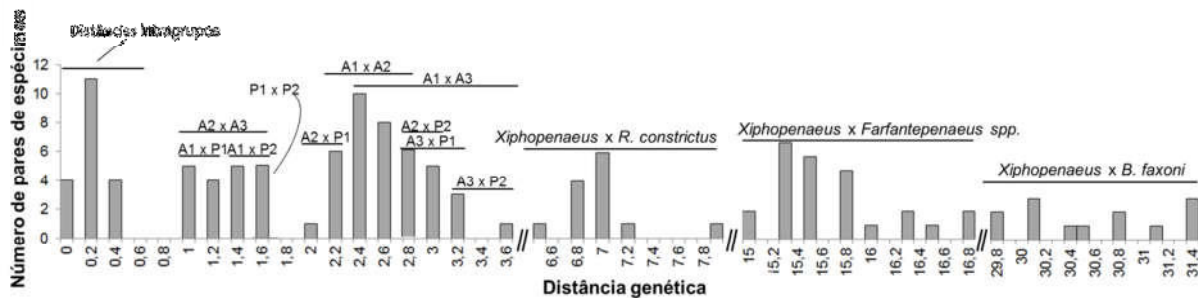


Figura 5 - Histograma de divergência genética Kimura-2-Parâmetros, para o gene 16S, par a par entre os indivíduos do gênero *Xiphopenaeus* e as espécies utilizadas como grupo externo. As linhas acima das barras indicam o intervalo em de distância entre os diferentes grupos predefinidos nas análises anteriores. A1 - Atlântico 1, A2 – Atlântico 2, A3 – Atlântico 3, P1 – Pacífico 1, P2 – Pacífico 2.

## **4.2 Análises filogenéticas**

As análises conduzidas pelo critério de Máxima Verossimilhança, para ambos o genes COI e 16S; suportaram a monofilia do gênero e corroboram a divisão em cinco grupos distintos obtida pelas análises de distância.

Os dois filogramas obtidos (Figuras 6 e 7), indicam A2 e A3 como grupos irmãos suportados com altos valores de bootstrap, contudo divergem quanto às relações entre os demais grupos. A análise do gene COI mostrou P1 e P2 formando um clado apoiado por altos valores de bootstrap, o qual forma um grupo irmão do clado formado por A2 e A3, enquanto A1 forma um clado mais externo a estes (Figura 6). A análise do gene 16S mostra A2 e A3 em um clado separado dos demais grupos, sendo P2 grupo irmão de A1 (Figura 7).



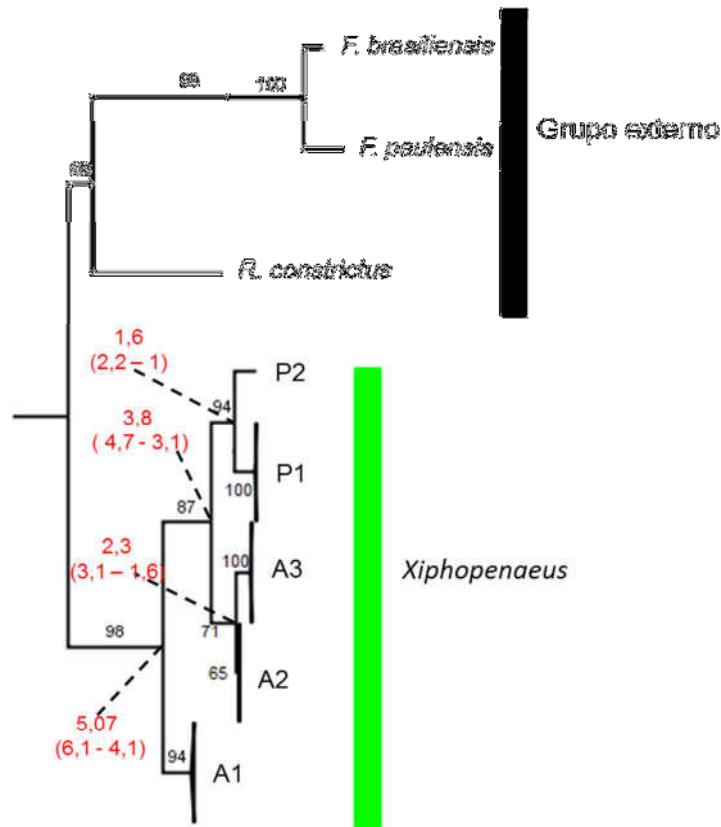


Figura 6 – Filograma de Máxima Verossimilhança construído com base nas sequências do gene COI, de 83 espécimes do gênero *Xiphopenaeus*, agrupados de acordo com os grupos obtidos nas análises de distância. Os valores próximos aos nós indicam o valor de bootstrap (valores menores do que 50 não foram mostrados). Os números vermelhos indicam a idade de separação entre os nós, média (mínimo, máximo), calculada a partir de Inferência Bayesiana.

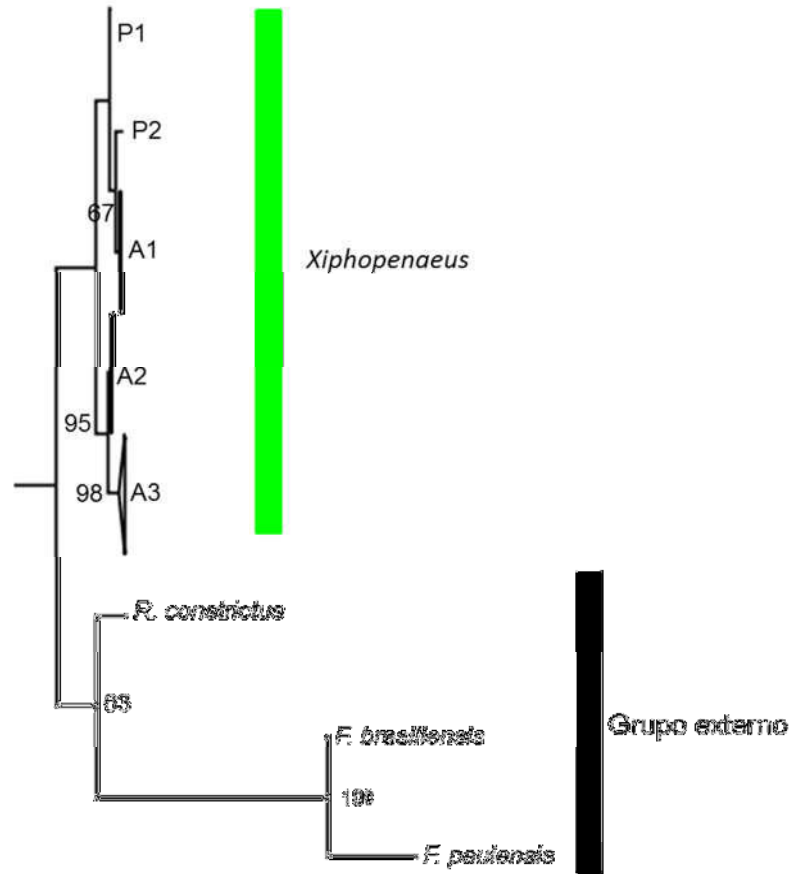


Figura 7 – Filograma de Máxima Verossimilhança construído com base nas sequências do gene 16S, de 14 espécimes do *Xiphopenaeus*, agrupados de acordo com os grupos obtidos nas análises de distância. Os valores próximos aos nós indicam o valor de bootstrap (valores menores do que 50 não foram mostrados).

### **4.3 Análises morfológicas comparativas**

Foram utilizados 70 indivíduos, os quais tiveram pelo menos um dos genes sequenciados, provenientes de 16 localidades.

#### Material examinado

##### Atlântico 1:

Brasil: Rio Grande do Norte, Baía Formosa, 6°21'23,3"S - 35°00'24,7"W, 25/IV/2014, col. M. Lopes & A. Carvalho-Batista, 6♂, 3♀ (CCDB 5337) – Alagoas, Maragogi, Praia de Maragogi, 09°0'48,59"S - 35°13'14,46"W, 05/X/2013, col. F.L. Mantelatto & F.B. Mantelatto, 1♂, 3♀ (CCDB 5338) - Sergipe, Aracajú, Praia do Atalaia, coordenadas não informadas, 26/VII/2013, col. G.L. Hirose, 1♀ (CCDB 5246) – Espírito Santo, Marataízes, 20°59'S -40°47'W, 20/VI/2012, Col. F.L. Carvalho, D. Peiro & R. Robles, 3♂, 1♀ (CCDB 3985) – Rio de Janeiro, Macaé, 22°23,44'S - 41°44,57"W, 21/VII/2014, R.C. Costa RC et al., 3♂ (CCDB 5339) – São Paulo, Ubatuba, Praia do Cedro, 23°32'38,4"S - 45°09'54"W, 22/VII/2013, R.C. Costa et al., 4♂ (CCDB 5019) – Santos, 24°04'55,"S - 46°16'56,8"W, 24/X/2011, R.C. Costa et al., 2♂, 2♀ (CCDB 3663) – Santa Catarina, Penha, coordenadas não informadas, V/2014, R.C. Costa et al., 3♂, 1♀ (CCDB 5292).

##### Atlântico 2:

Brasil: Amapá, Oiapoque, Estuário do Rio Oiapoque, Parna Cabo Orange, 04°22'17,6"N – 51°24'26,4"W, 22/VIII/2013, col. I.M. Vieira, A.G. Santiago & E.G. Oliveira, 1♂ (IEPA 1618) – Pará, Vigia, Ponta Seca, 0°51'45,00"S – 48°7'50,00"W, 19/XI/1994, col. M.P. Barros, 2♂ (MCP 2024) – Alagoas, Maragogi, Praia de

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Maragogi, 09°0'48,59''S - 35°13'14,46''W, 05/X/2013 , col. F.L. Mantelatto & F.B. Mantelatto, 6♂, 2♀ (CCDB 5338) - São Paulo, Cananeia, coordenadas não informadas, X/2014, R.C. Costa, 2♂, 5♀ (CCLC 418).

### Atlântico 3:

México: Tabasco, 18°31'40,25''N - 93°19'43,95'', 05/XI/2014, col. não informado, 6♂, 3♀ (CCDB 5461) -

Brasil: Amapá, Oiapoque, Estuário do Rio Oiapoque, Parna Cabo Orange, 04°22'17,6''N - 51°24'26,4''W, 22/VIII/2013, col. I.M. Vieira, A.G. Santiago & E.G. Oliveira, 1♀ (IEPA 1617) - Pará, Vigia, Ponta Seca, 0°51'45,00''S - 48°7'50,00''W, 19/XI/1994, col. M.P. Barros, 1♀ (MCP 2024).

### Pacífico 1:

Costa Rica: Puntareñas, Sierpe, Terraba, coordenadas não informadas, VI/2013, J.S. Vargas, 4♂, 1♀ (CCDB 5247).

### Pacífico 2:

México: Oaxaca, Tehuantepec, Golfo de Tehuantepec, coordenadas não informadas, XI/2006, E. Ramos, 1♀ (CCDB 171).

A análise comparativa da morfologia da carapaça, apêndices locomotores e peças bucais não revelou variação capaz de separar os indivíduos dos diferentes grupos genéticos. O número de dentes rostrais variou de quatro a seis, sendo que a maioria dos indivíduos independentemente do grupo apresentou cinco. Espécimes com quatro foram observados apenas nos grupos P1 e A3 e com seis, somente nos grupos A1 e A2. Ademais, foi observada variação no formato dos dentes e no comprimento do rostro em

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

relação à carapaça, na profundidade dos sulcos e carenas também sem mostrar nenhuma separação entre os grupos. Houve variação quanto a presença e o tamanho dos dentes da carena dorso-medial no quarto, quinto e sexto segmentos abdominais e, embora no grupo A1 eles tenham sido menores e sua ocorrência menos frequentes, tal carácter também não se mostrou suficiente para separar os grupos.

### **4.4 Microscopia eletrônica de varredura**

A ultraestrutura dos caracteres sexuais secundários, tético, para as fêmeas, petasma e apêndice masculino, para os machos foi analisada por meio da MEV. A morfologia do tético não apresentou variações suficientes para separar os cinco grupos obtidos geneticamente (Figura 8). Sendo descrito de forma geral como sendo fechado, formado por uma placa larga única no esternito XIV, que se estende até a margem posterior do tórax; e uma protuberância mediana do esternito XIII, também larga (da largura do esternito), porém mais curta do que a do que a placa do esternito XIV.

De forma geral, os petasmas dos indivíduos de quatro, dos cinco grupos geneticamente diferenciados (uma vez que o grupo P2 foi representado por apenas uma fêmea), possuem forma descrita para o gênero, sendo semifechados, simétricos e com largos lobos laterais e projeções disto-laterais em forma de chifre (Figuras 9 e 10). Os principais caracteres que separaram as espécies por meio do petasma encontram-se nas projeções disto-laterais (Figuras 9 e 10). Estas projeções podem ser divididas em duas regiões: corpo principal mais largo e a região apical mais estreita em forma de pá (Figuras 9 e 10).

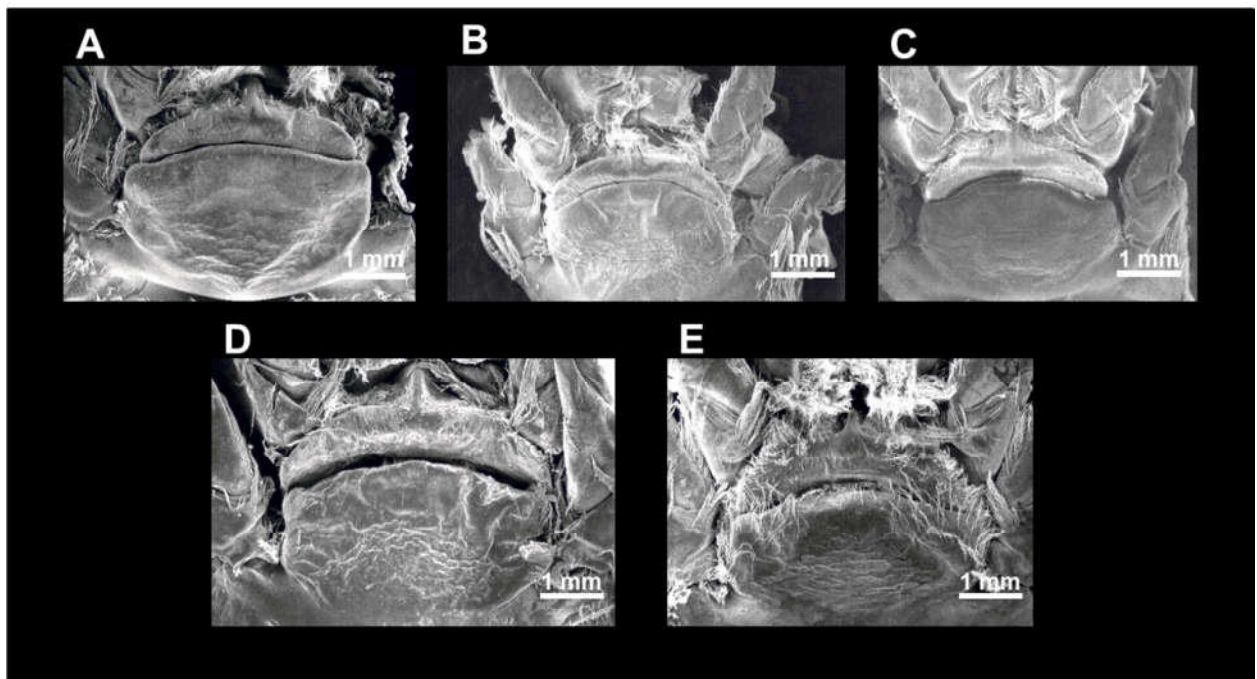


Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura dos télcos de indivíduos dos cinco grupos genéticos obtidos nas análises para o gênero *Xiphopenaeus*. A: grupo A1; B: grupo A2; C: grupo A3; D: grupo P1; E: grupo P2.

A ultraestrutura dos petasmas evidenciou diferenças capazes de separar os grupos obtidos, com exceção de A2 e A3. Em vista dorsal a projeção disto-lateral de A1 mostra a região do corpo menos larga do que nos outros grupos e a margem posterior é plana (Figura 9A). A região apical é longa, estendendo-se por um terço do comprimento da projeção disto-lateral, e com ângulo obtuso voltado para o centro-posterior do corpo principal (Figuras 9A-B). A abertura é estreita e alongada, em forma de fenda, e mostra uma fileira de dentes disto-laterais eretos na margem posterior. A extremidade distal da margem posterior, onde estão os dentes disto-laterais é plana (Figura 9B).

Nos grupos A2 e A3 a região do corpo é mais larga com a margem posterior arredonda (Figuras 9C e E). A região apical é mais curta estendendo-se por cerca de um quarto do comprimento da projeção disto-lateral, unindo-se ao corpo principal por uma estreita ligação. A abertura é larga e arredondada, e mostra uma fileira de dentes disto-laterais eretos na margem posterior. A margem posterior, onde estão os dentes disto-laterais é convexa (Figuras 9D-F).

Em P1, a região do corpo é extremamente larga próxima à junção com o lobo medial do petasma, sofrendo um afinamento por volta da metade de seu comprimento (Figura 9G). A região apical é alongada estendendo-se por aproximadamente um terço do comprimento da projeção disto-lateral, e com um ângulo obtuso voltado para o centro-posterior do corpo (Figura 9G-H). A abertura é estreita e alongada, em forma de fenda, e mostra uma fileira de dentes disto-laterais eretos na margem posterior, a qual é plana (Figura 9H).

O petasma do grupo A1 em vista ventral mostra mais claramente o corpo principal menos largo, com a face posterior mais plana, e o ápice mais alongado que o

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

observado nas outras espécies (Figuras 10A-B). A margem posterior da região apical termina em uma carena portando dentes, a qual penetra na região do corpo do petasma. Esta carena termina em um sulco delicado o qual prolonga-se em direção a base posterior do petasma (Figura 10B).

O petasma dos grupos A2 e A3, em vista ventral, mostra o corpo principal mais largo e com a face posterior curva, o ápice é curto, estendendo-se por um quarto da projeção disto-lateral (Figuras 10C-F). A margem posterior da região apical termina em uma carena portando dentes, a qual penetra a região do corpo principal em direção ao lobo medial do petasma, porém termina abruptamente antes de chegar a região mais larga do projeção disto-lateral (Figuras 10D e F).

Em vista ventral o petasma de P1 possui o corpo principal mais largo do que as demais espécies, o ápice é alongado e levemente curvado, correspondendo a um terço da extensão projeção disto-lateral (Figuras 10G-H). A margem posterior da região apical termina em uma carena portando dentes, que se prolonga por um sulco em direção ao corpo do petasma, acompanhando quase toda projeção disto-lateral.

O apêndice masculino nos quatro grupos analisados apresentou formato subcircular, sendo o de A1 e P1 os mais arredondados, enquanto A2 possui a margem posterior menos arredondada e A3 um formato mais alongado (Figuras 11 e 12). A face dorsal do apêndice masculino é quase inteira glabra nos quatro grupos, sendo observada a ocorrência de espinhos mais finos e curtos do que os da face ventral, que no grupo P1, formam uma fileira próxima à margem interna. Nos três grupos do Atlântico são observados apenas dois espinhos finos, os quais variam apenas em sua posição. No grupo A3 é possível observar que o lóbulo anterior da margem esquerda é mais



## **Carvalho-Batista, A. 2017**

acentuado e que os espinhos que recobrem a margem e a face ventral, formam uma pequena fileira que invade parte da face dorsal (Figuras 11E-F).

Na face ventral é possível observar, nos quatro grupos uma fileira de espinhos recobrimdo toda a margem do apêndice, sendo essa fileira mais fina composta de espinhos curtos e esparsos no grupo A1 (Figuras 12A-B). Em A2 a fileira de espinhos é mais grossa (Figuras 12C-D) do que em A1 (Figuras 12A-B) sendo a parte apical onde os espinhos se concentram em maior abundância e alcançam maiores tamanhos. No grupo A3 espinhos recobrem toda a face ventral do apêndice masculino, sendo também mais longos do que os observados em A1 com maiores tamanhos próximos ao ápice (Figuras 12E-F). Em P1 é possível observar uma fileira de longos espinhos voltados para o centro do apêndice (Figuras 12G-H).

### **4.5 Análises comparativas com o holótipo de *Xiphopenaeus kroyeri***

A análise comparativa entre o petasma do holótipo de *Xiphopenaeus kroyeri* e os dos indivíduos utilizados nas demais análises permitiu a confirmação do grupo A1 como *X. kroyeri* sensu stricto, pelo formato da porção apical da projeção disto-lateral (Figuras 13B-C) e pela margem posterior do corpo principal da projeção disto-lateral plana.

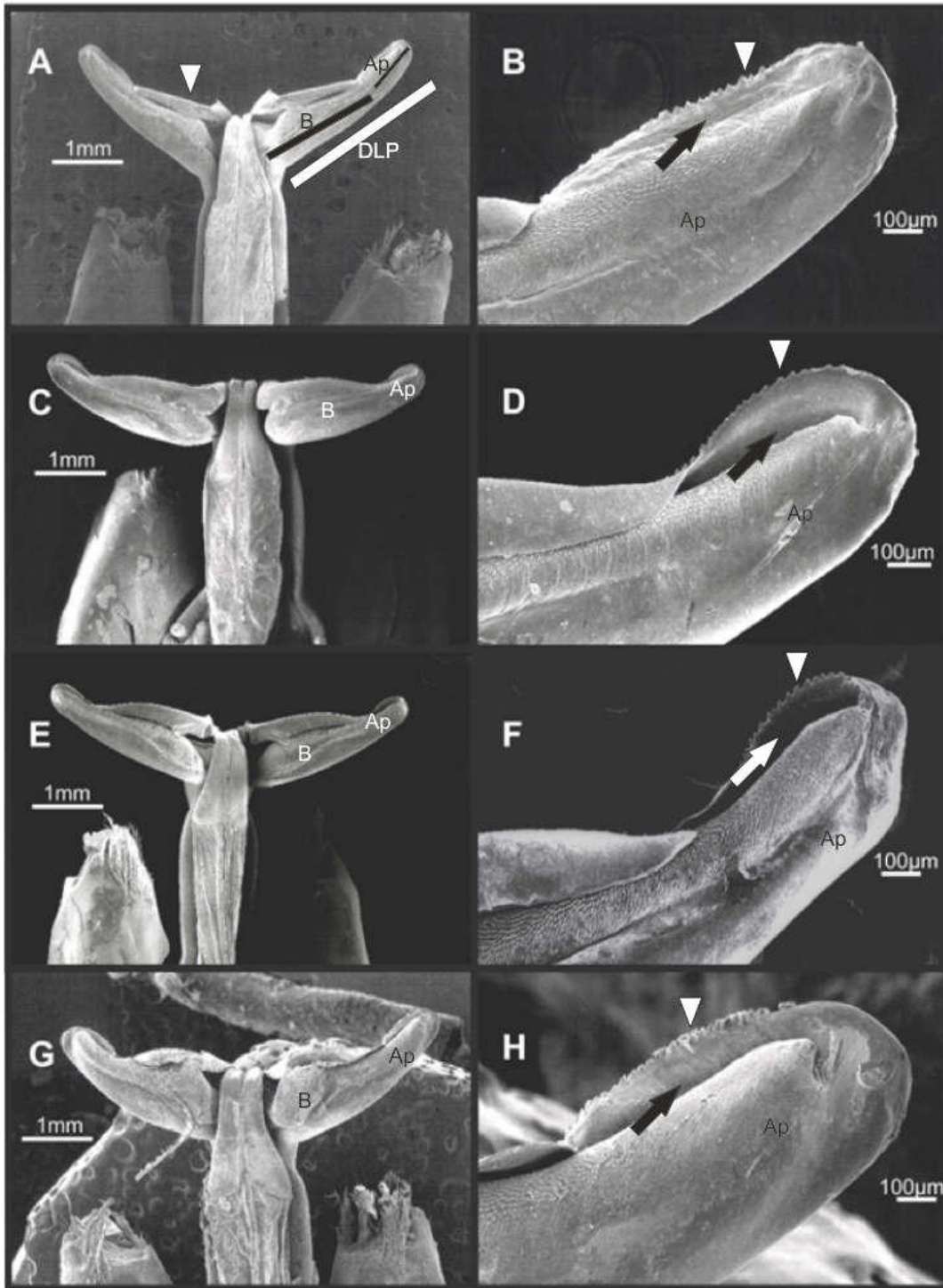


Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura da parte dorsal dos petasmas de indivíduos de quatro dos cinco grupos genético obtidos nas análises para o gênero *Xiphopenaeus*. A-B: grupo A1; C-D: grupo A2; E-F: grupo A3; G-H: grupo P1. DLP: projeção disto-latera; AP: porção apical; B: corpo. Setas evidenciam os dentes disto-laterais da porção apical da projeção disto-lateral e a abertura do petasma.

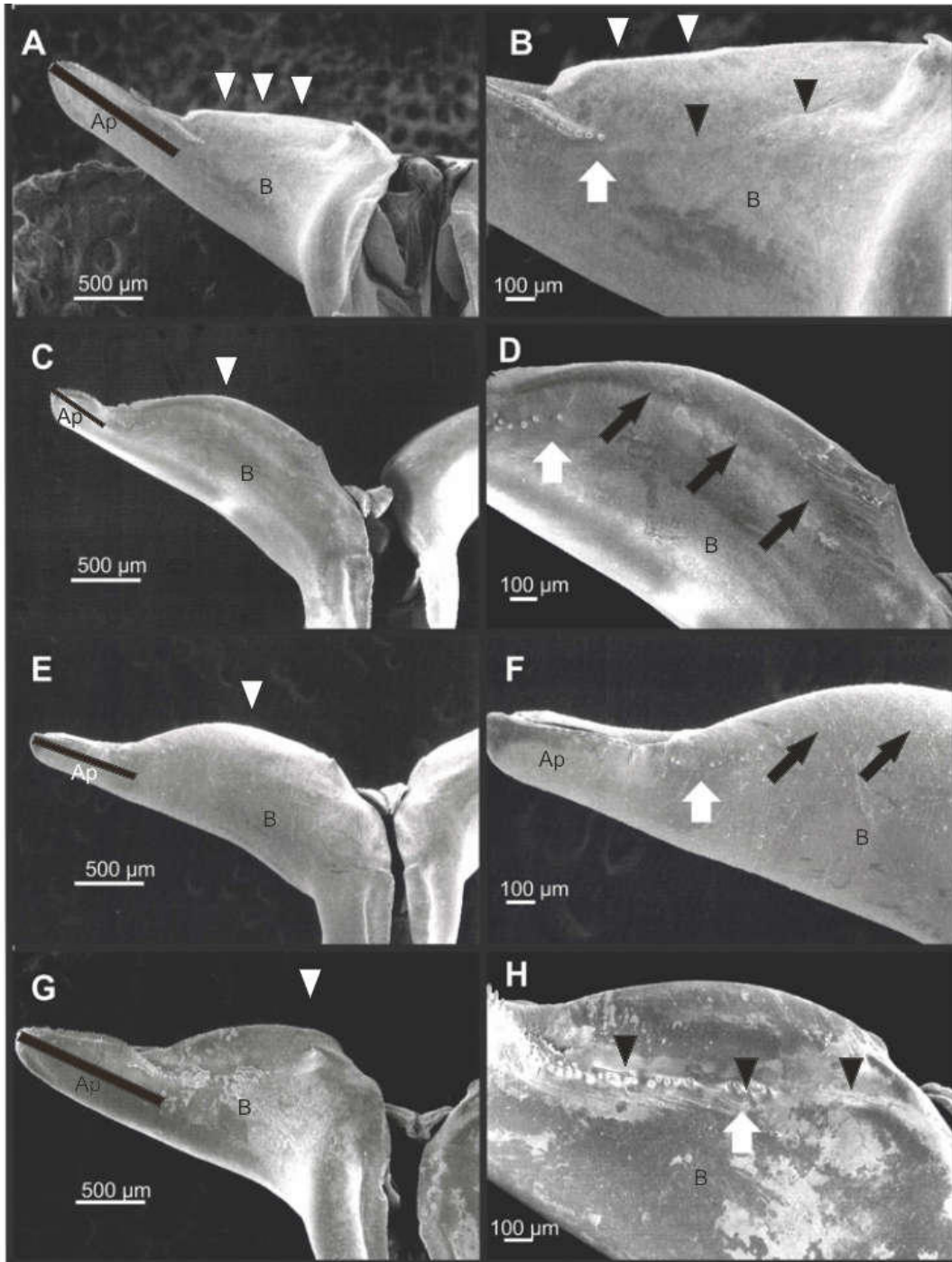


Figura 10 – Microscopia eletrônica de varredura da parte ventral dos petasmas de indivíduos de quatro dos cinco grupos genético obtidos nas análises para o gênero *Xiphopenaeus*. A-B: grupo A1; C-D: grupo A2; E-F: grupo A3; G-H: grupo P1. DLP: projeção disto-latera; AP: porção apical; B: corpo principal. Setas indicam a margem posterior do corpo principal, a carena com dentes e o sulco que se estendem pelo corpo principal da projeção disto-lateral

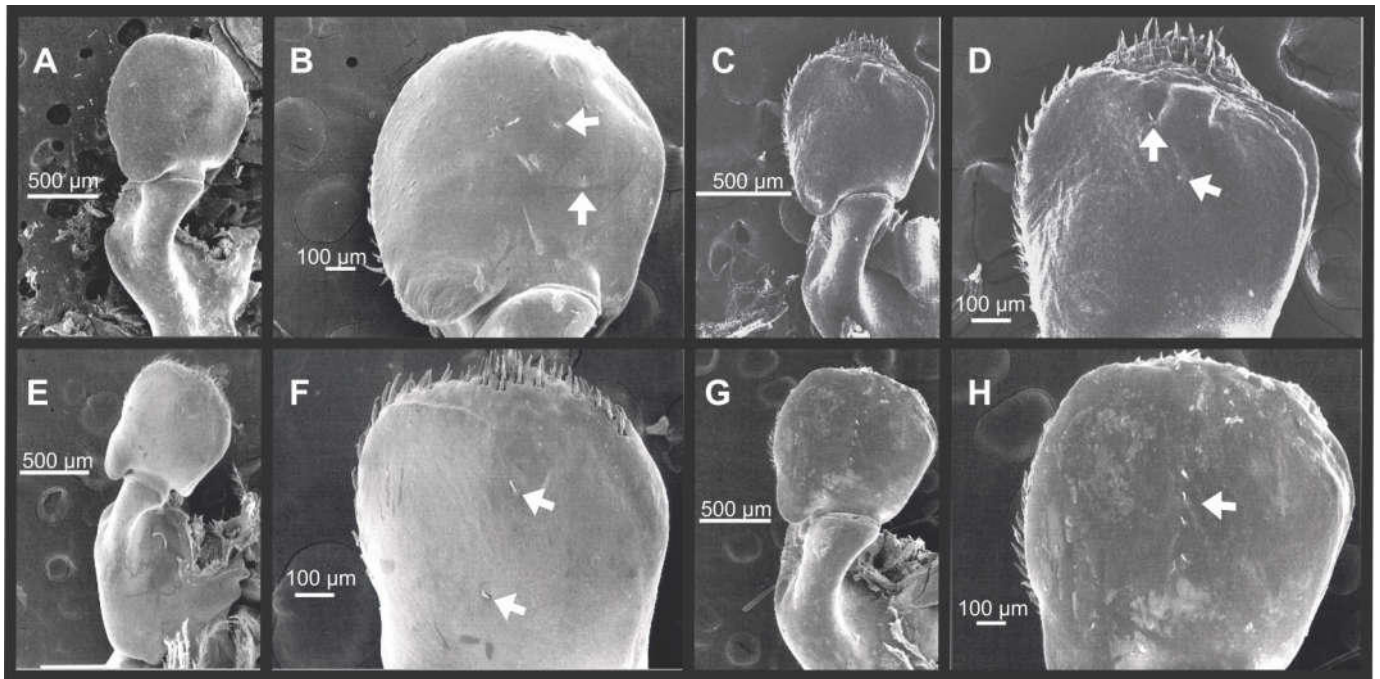


Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura da parte dorsal dos apêndices masculinos de indivíduos de quatro dos cinco grupos genético obtidos nas análises para o gênero *Xiphopenaeus*. A-B: grupo A1; C-D: grupo A2; E-F: grupo A3; G-H: grupo P1. Setas indicam a posição dos espinhos finos.

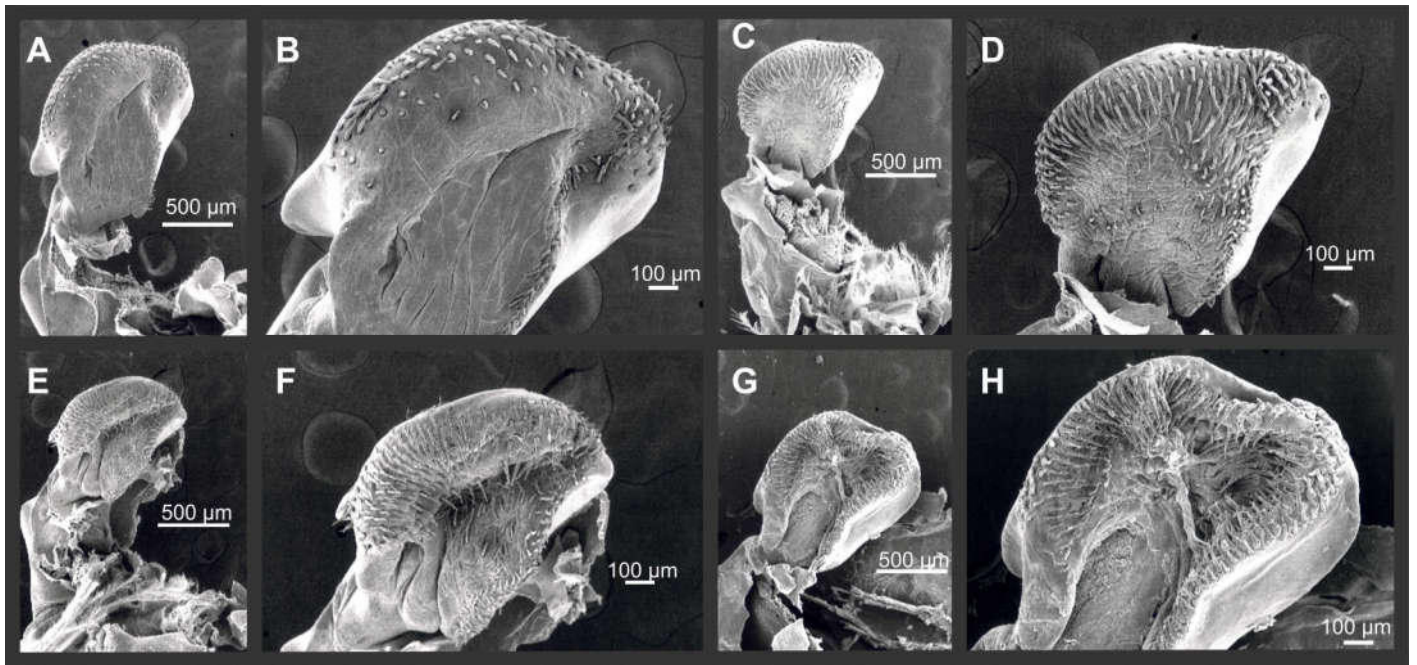


Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura da parte ventral dos apêndices masculinos de indivíduos de quatro dos cinco grupos genético obtidos nas análises para o gênero *Xiphopenaeus*, evidenciando a fileira de espinhos que recobre sua margem. A-B: grupo A1; C-D: grupo A2; E-F: grupo A3; G-H: grupo P1.

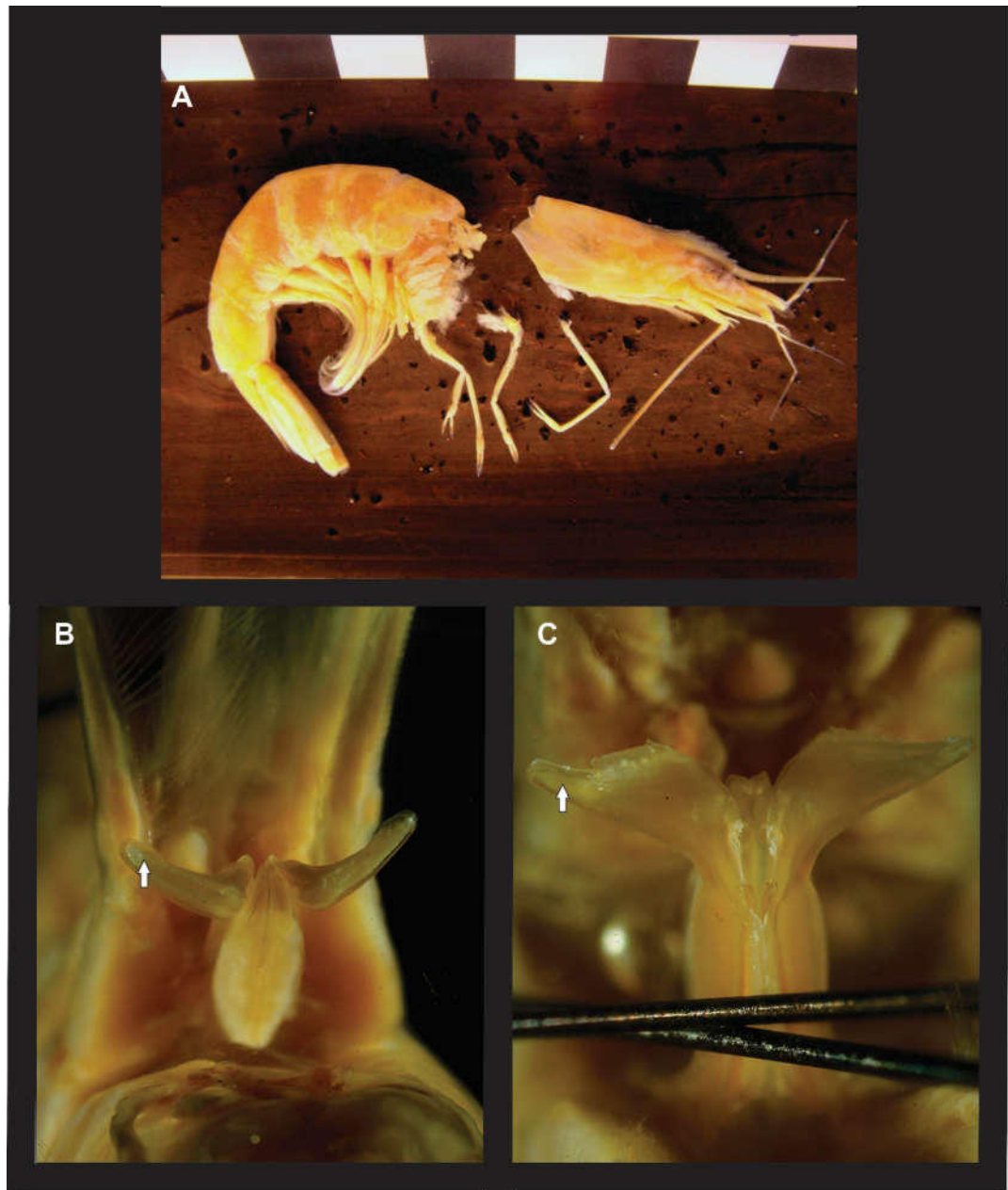


Figura 13 – Espécime holótipo de *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862): NHMW 342, Rio de Janeiro, coletado por Kroyer, macho. A: vista lateral do indivíduo; B: petasma em vista dorsal; C: petasma em vista ventral. Fotos: Dr. Peter Dworschak.

## **4.6 Análises populacionais**

### **4.6.1 Rede de haplótipos**

Com base no alinhamento de 596 pares de base das sequências de COI obtidas de 83 exemplares de *Xiphopenaeus*, foram detectados 22 haplótipos, nas 16 localidades estudadas (Figura 14). Destes, 15 (68,18%) foram haplótipos individuais, ou seja, encontrados em apenas um indivíduo.

A rede de haplótipos confirmou a separação em cinco grupos (Figura 14), os mesmos obtidos nas análises de distância e filogenéticas. A distância entre cada haplótipo e seu par mais próximo dentro de cada grupo foi de no máximo duas mutações, sendo 6 mutações a maior diferença entre indivíduos do mesmo grupo, enquanto a distância entre os diferentes grupos variou de 16 a 53 mutações.

O grupo A1 foi representado pelo maior número de indivíduos (41) e apresentou maior número de haplótipos em um total de 12, dois quais, quatro foram compartilhados por mais de um indivíduo e oito foram individuais. Enquanto o grupo P2 foi representado por apenas um indivíduo. Dentre os haplótipos compartilhados o mais frequente foi o número 6 (H6), pertencente ao grupo A2 o qual foi compartilhado por 17 indivíduos de 4 localidades (Figura 14).

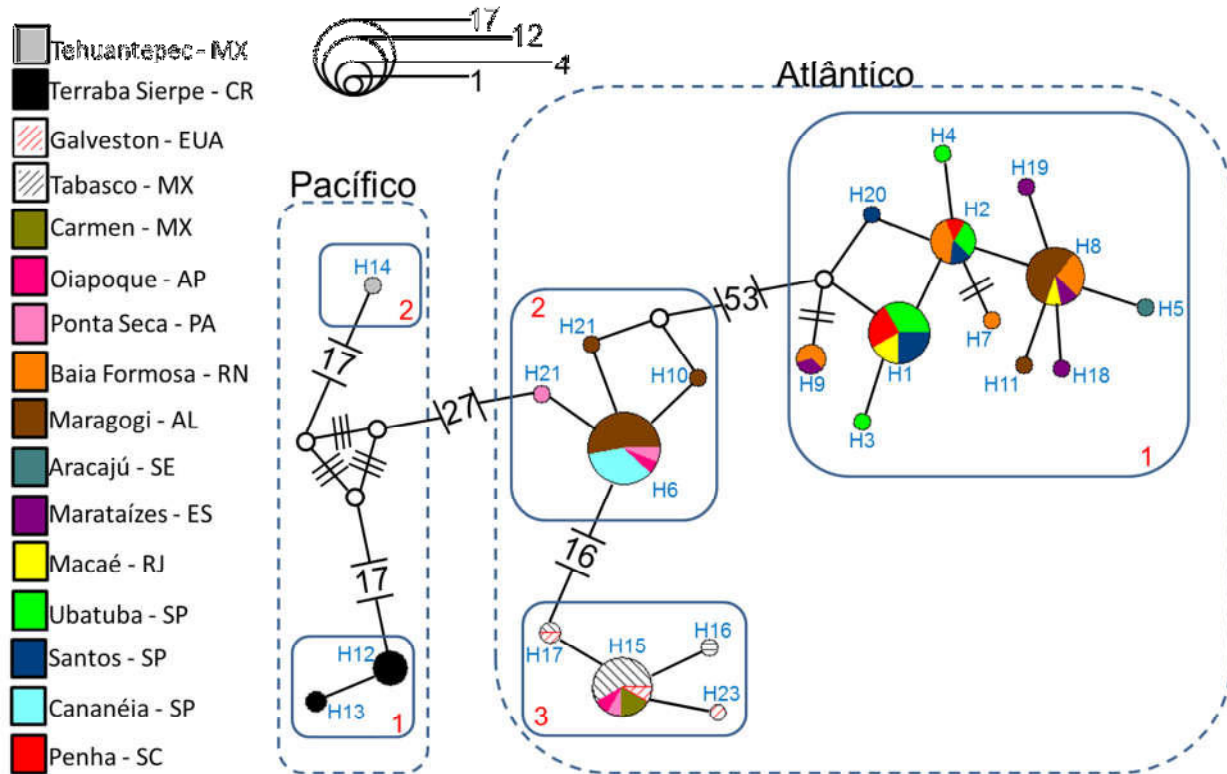


Figura 14 - Rede de haplótipos gerada pelo método de Median-Joining a partir de 83 sequências parciais do gene mitocondrial COI de exemplares do gênero *Xiphopenaeus* provenientes das localidades amostradas. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos portando os haplótipos. Cada linha da rede representa um passo mutacional, os números entre as linhas representam elevado número de passos mutacionais, as linhas tracejadas delimitam os oceanos Atlântico e Pacífico e as linhas contínuas delimitam os grupos identificados A1, A2, A3, P1 e P2.



**4.6.2 Análise de variância molecular (AMOVA)**

A análise de variância molecular, quando realizada sem nenhuma estruturação, mostrou que a maior parte da variação foi encontrada entre as localidades (78,14%) (Tabela 4). Dividindo-se os indivíduos nos grupos definidos nas análises anteriores, a maior parte da variação tem origem entre os grupos (97,85%). Os índices  $\Phi_{st}$ ,  $\Phi_{ct}$  e  $\Phi_{sc}$  foram todos significativos, indicando estruturação entre as localidades amostradas e os grupos. O terceiro tipo de estruturação testado foi entre as localidades dentro de cada um dos três grupos do Atlântico (os quais ocorreram em mais de uma localidade), neste caso a maior parte da variação ocorreu dentro das localidades, para os três grupos, e apenas para o grupo A1  $\Phi_{st}$  foi significativo, indicando estruturação entre as localidades (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) realizadas com as sequências de COI de espécimes do gênero *Xiphopenaeus* provenientes de diversas localidades do Atlântico e Pacífico. A estrutura testada foi estabelecida *a priori*, com base nos resultados obtidos nas demais análises.

Estruturação	Fonte de variação	Porcentagem de variação	Índice de fixação
Ausente	Entre localidades	78,14	$\Phi_{st}=0,78141$
	Dentro das localidades	21,86	( $p<0,0001$ )
AMOVA hierárquico (5 grupos: A1,A2,A3,P1,P2)	Entre grupos	97,86	$\Phi_{ct}=0,9785$
	Entre localidades dentro dos grupos	0,38	( $p<0,0001$ )
	Dentro das localidades	1,76	$\Phi_{sc}=0,1781$
Atlântico 1	Entre localidades	22,78	( $p<0,0001$ )
	Dentro das localidades	77,21	$\Phi_{st}=0,2278$
Atlântico 2	Entre localidades	17,78	( $p=0,2786$ )
	Dentro das localidades	82,21	$\Phi_{st}=0,1778$
Atlântico 3	Entre localidades	-27,92	( $p=0,7889$ )
	Dentro das localidades	127,92	$\Phi_{st}=-0,2793$

O grupo A1 foi o único a apresentar valores significativos de  $F_{st}$  na comparação par a par entre as localidades. Em Maragogi os valores observados foram significativos em relação à Baía Formosa, Ubatuba, Santos e Penha. Também foi observada

## Carvalho-Batista, A. 2017

estruturação entre Ubatuba e Marataízes (Tabela 5). Para os A2 e a A3 nenhum dos valores de Fst par a par foi significativo (Tabelas 6 e 7).

Tabela 5 - Valores de Fst calculados entre pares de localidades do grupo A1 para seqüências parciais do gene COI. \* Valores significativos,  $p < 0,05$ ; \*\* Valores significativos,  $p < 0,01$ .

Localidades	1	2	3	4	5	6
1 Baía Formosa	-	-	-	-	-	-
2 Maragogi	0,2401**	-	-	-	-	-
3 Marataízes	-0,0671	0,1236	-	-	-	-
4 Macaé	-0,0625	0,5872	-0,0429	-	-	-
5 Ubatuba	0,01264	0,6619**	0,2868*	-0,1091	-	-
6 Santos	0,0323	0,6983**	0,1854	-0,1450	-0,1016	-
7 Penha	0,0968	0,8090**	0,2381	-0,1702	-0,1546	-0,1702

Tabela 6 - Valores de Fst calculados entre pares de localidades do grupo A2 para seqüências parciais do gene COI.

Localidades	1	2
1 Vigia	-	-
2 Maragogi	0,4161	-
3 Cananeia	0,5385	0,06445

Tabela 7 - Valores de Fst calculados entre pares de localidades do grupo A3 para seqüências parciais do gene COI.

Localidades	1	2
1 Galveston	-	-
2 Tabasco	0,05	-
3 Carmen	-0,02	-0,321

### 4.6.3 Estatística descritiva

Com base nos 41 indivíduos provenientes do grupo A1 foram encontrados 12 (h) haplótipos, com um total de 13 sítios polimórficos (S), a diversidade haplotípica (Hd) do grupo foi de 0,823, variando entre as localidades estudadas de 0,2857 (Maragogi) a 1 (Marataízes) (Tabela 8). A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foi de 0,00304 variando entre 0,00048 (Maragogi) e 0,00419 (Baía Formosa). O número médio de diferenças nucleotídicas (K) foi 1,8120, variando de 0,2857 (Maragogi) a 3,5 (Marataízes).

## Carvalho-Batista, A. 2017

Tabela 8 - Resultados obtidos da estatística descritiva a partir de sequências parciais do gene mitocondrial COI, do grupo A1, provenientes de cada localidade amostrada. Símbolos: N, indivíduos amostrados; S, sítios polimórficos; H, haplótipos; Hd, diversidade haplotípica;  $\pi$ , diversidade nucleotídica; K, número médio de diferenças nucleotídicas.

Localidade	N	S	H	Hd	$\pi$	K
Baía Formosa	9	7	4	0,8056	0,00419	2,5000
Maragogi	7	1	2	0,2857	0,00048	0,2857
Aracaju	1	-	1	-	-	-
Marataízes	4	7	4	1,0000	0,00059	3,5000
Macaé	3	2	2	0,6667	0,00224	1,3333
Ubatuba	8	3	4	0,7500	0,00174	1,0357
Santos	5	2	3	0,7000	0,00168	1,0000
Penha	4	1	2	0,5000	0,00084	0,5000
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>0,823</b>	<b>0,00304</b>	<b>1,8120</b>

O grupo A2 foi formado por um total de 20 indivíduos, para os quais foram encontrados 4 haplótipos, a diversidade haplotípica (Hd) total do grupo foi de 0,284, variando de 0 em Cananéia, onde todos os 6 indivíduos coletados apresentaram o mesmo haplótipo, a 1 em Ponta Seca (Tabela 9). A diversidade nucleotídica total do grupo foi de 0,0005, variando de 0 (Cananéia) a 0,000610 (Maragogi). O número médio de diferenças nucleotídicas (K) foi 0,300, variando de 0 (Cananéia) a 1 (Vigia).

Tabela 9 - Resultados obtidos da estatística descritiva a partir de sequências parciais do gene mitocondrial COI, do grupo A2, provenientes de cada localidade amostrada. Símbolos: N, indivíduos amostrados; S, sítios polimórficos; H, haplótipos; Hd, diversidade haplotípica;  $\pi$ , diversidade nucleotídica; K, número médio de diferenças nucleotídicas.

Localidade	N	S	H	Hd	$\pi$	K
Oiapoque	1	-	1	-	-	-
Vigia	2	1	2	1,0000	0,000168	1,0000
Maragogi	11	2	3	0,34545	0,000610	0,3636
Cananéia	6	0	1	0	0	0
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>0,284</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,3000</b>

O grupo A3 foi formado por um total de 16 indivíduos, para os quais foram encontrados 4 haplótipos, a diversidade haplotípica (Hd) total do grupo foi de 0,442, variando de 0 em Carmen, onde os dois indivíduos analisados apresentaram o mesmo haplótipo, a 1 em Galveston (Tabela 10). A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) total do grupo

## Carvalho-Batista, A. 2017

foi de 0,00081, variando de 0 (Carmen) a 0,00224 (Galveston). O número médio de diferenças nucleotídicas (K) foi 0,483, variando de 0 (Carmen) a 1,333 (Galveston).

Tabela 10 - Resultados obtidos da estatística descritiva a partir de sequências parciais do gene mitocondrial COI, do grupo A3, provenientes de cada localidade amostrada. Símbolos: N, indivíduos amostrados; S, sítios polimórficos; H, haplótipos; Hd, diversidade haplotípica;  $\pi$ , diversidade nucleotídica; K, número médio de diferenças nucleotídicas.

Localidade	N	S	h	Hd	$\pi$	K
Galveston	3	2	3	1	0,00224	1,3333
Tabasco	9	2	3	0,4167	0,00075	0,4444
Carmen	2	0	1	0	0	0
Oiapoque	1	-	1	-	-	-
Vigia	1	-	1	-	-	-
Total	16	3	4	0,442	0,00081	0,483

O grupo P1 foi formado por 5 indivíduos divididos em 2 haplótipos, a diversidade haplotípica (Hd) foi de 0,400, a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) 0,00067 e K 0,4. E o grupo P2 foi formado por apenas um indivíduo.

### 4.6.4 Testes de Neutralidade

O teste de neutralidade D de Tajima, realizado separadamente para cada um dos grupos do Atlântico, apresentou valores significativos para A2 e A3. O teste Fs de Fu, também foi utilizado em cada um dos agrupamentos obtidos no Atlântico, apresentou valores negativos e significativos nos três grupos (Tabela 11). Os resultados obtidos indicam desvios da neutralidade.

Tabela 11 - Testes de neutralidade a partir de sequências parciais do gene mt COI de indivíduos do gênero *Xiphopenaeus* provenientes das localidades amostradas no Atlântico divididas de acordo com os agrupamentos identificados nas análises de distância, filogenética, rede de hapótipos e AMOVA.

Agrupamento genético	D de Tajima	Fs de Fu
Atlântico 1	-1,253 (p=0,079)	-4,910 (p= 0,008)
Atlântico 2	-1,723 (p=0,007)	-2,749(p<0,001)
Atlântico 3	-1,349 (p=0,048)	-1,867(p=0,013)

4.6.5 Mismatch distribution

A análise de Mismatch distribution mostrou distribuição unimodal para as diferenças par a par, nos três grupos analisados (Figura 15). Além disso, valores não significativos de SSD e do índice de Raggedness foram obtidos (Tabela 12). Tais resultados mostram que os três grupos não se desviam do modelo esperado para expansão demográfica.

Tabela 12 – Valores dos testes de SSD e Raggedness e de p calculados para os três agrupamentos genéticos do Atlântico.

Teste	Agrupamentos genéticos		
	A1	A2	A3
SSD	0,0018 (p = 0,8)	0,00584 (p=0,5)	0,00834 (p=0,4)
Raggedness	0,04 (p = 0,6)	0,2642 (p = 0,5)	0,1552 (p=0,5)

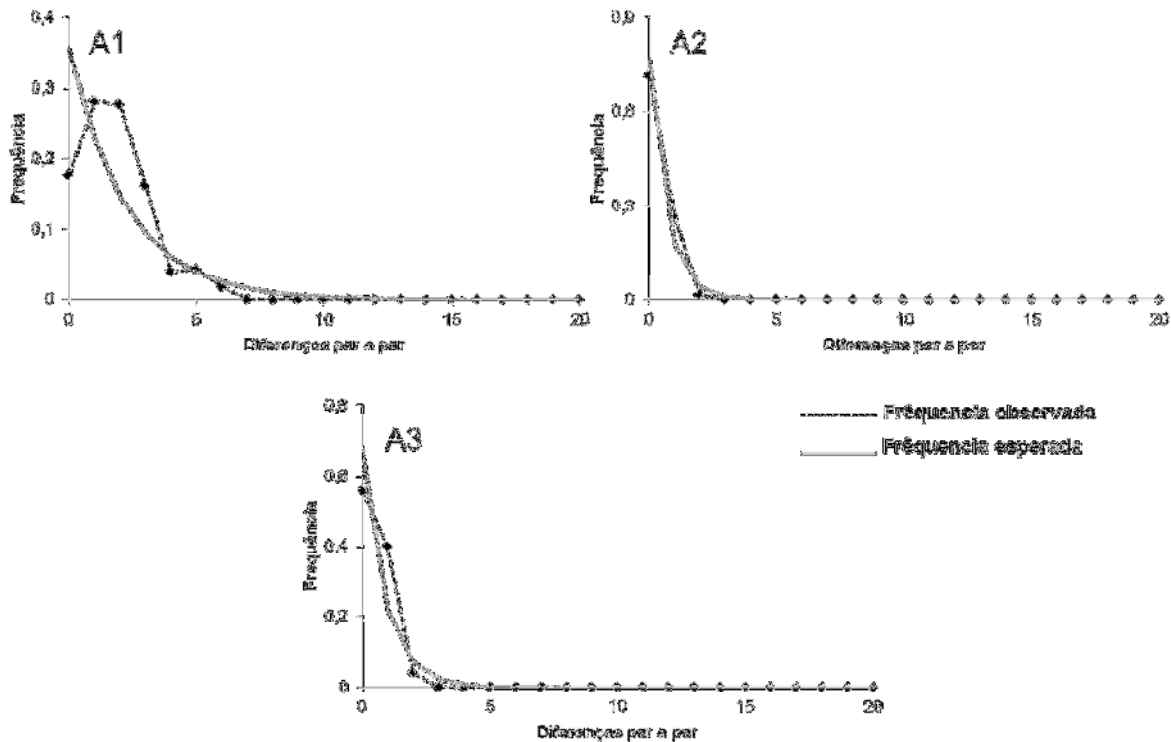


Figura 15 – “Mismatch distribution” frequências observada (linha pontilhada) e esperada (linha sólida) de diferenças par-a-par para os haplótipos do gene COI dos três grupos genéticos do Atlântico.

## **5. Discussão**

Este estudo mostrou que o gênero *Xiphopenaeus* é composto de pelo menos cinco espécies distribuídas ao longo da costa do continente americano. A divisão do gênero em três espécies, com a revalidação de *X. riveti* e a existência de uma nova espécie no Atlântico, já havia sido proposta anteriormente por Gusmão et al. (2006), e suportada pelos resultados de Pierjorge et al. (2014). Contudo, tais estudos haviam restringido suas amostragens à costa sul-americana e no máximo apenas a uma localidade do Pacífico. O presente estudo suporta, não só a revalidação de *X. riveti* e a existência de uma segunda espécie do gênero no Atlântico, mas também a existência de pelo menos mais uma espécie no Pacífico e de uma terceira espécie no Atlântico. Tal divisão foi suportada por todas as análises empregadas.

As análises dos genes COI e 16S mostraram valores de distância entre os grupos genéticos obtidos consistentes com o intervalo interespecífico, sendo apoiadas por diferenças morfológicas em caracteres sexuais secundários dos machos. A utilização de técnicas moleculares em acréscimo aos dados morfológicos é bastante útil na tentativa de resolver problemas taxonômicos e filogenéticos (Mantelatto et al., 2007; Bracken-Grissom et al., 2012; Negri et al., 2012; Pileggi & Mantelatto, 2012; Magalhães et al., 2016), como demonstrado no presente estudo.

Dentro da ordem Decapoda, a maior parte das distâncias intraespecíficas para o gene barcoding COI fica em até 2%, enquanto as distâncias interespecíficas para espécies cogenéricas são normalmente superiores a 5% e chegando a mais de 10% em muitos casos (Costa et al., 2007a). Entre as espécies de Penaeidae da costa Egípcia e entre as espécies do gênero *Metapeneaeopsis*, tal distância pode chegar a mais de 20% (Cheng et al., 2015; Sharawy et al., 2017). Assim, a maior parte das distâncias obtidas

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

entre os grupos detectados no presente estudo enquadra-se claramente no intervalo interespecífico para tal marcador.

As distâncias entre A2 e A3 para o gene COI encontram-se no limiar entre os valores intra e interespecíficos encontrados em Decapoda. Distâncias intraespecíficas de até 2,7% foram observadas para o camarão peneideo *Artemesia longinaris* Spence Bate 1888 e para o caranguejo *Cancer paguros* Linnaeus 1758, e de 2,75% para o carídeo *Crangon crangon* Linnaeus 1758 (Keskin & Atar, 2013; Carvalho-Batista et al., 2014; Bilgin et al., 2015). Contudo, as distâncias entre os indivíduos dentro de cada grupo (0 - 0,2 em A2 e 0 - 0,3 em A3) são inferiores quando comparadas às distâncias entre os grupos (2,7 - 3,3), formando um gap interspecífico. A técnica DNA Barcoding baseia-se exatamente nesse gap para identificação de espécies (Hebert et al., 2004ab; Waugh 2007; Frézal & Leblois 2008; Ward, 2009).

Ademais, a utilização do gene 16S suporta a divisão dos grupos genéticos observados em cinco espécies distintas. O gene 16S é comparativamente mais conservado do que o COI, apresentando baixa ou, em alguns casos, nenhuma variação intraespecífica em crustáceos decápodes. Em camarões peneideos, valores em torno de 1% são observados entre espécies cogenéricas (Quan et al., 2004; Francisco & Galetti Junior, 2005).

A divisão de *X. riveti* em pelo menos mais uma espécie, é um interessante resultado encontrado pelo presente estudo. Infelizmente foram obtidas sequências provenientes de apenas uma fêmea oriunda de Tehuantepec, México. Contudo, as divergências entre essas sequências (de ambos os marcadores) e as obtidas para os demais indivíduos do Pacífico, coletados em Sierpe, Costa Rica, deixam claro que os dois grupos tratam-se de fato de espécies distintas. Futuros estudos, com a amostragem

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

de um maior número de indivíduos e a inclusão de mais localidades, são necessários para delimitar a distribuição geográfica de cada uma das espécies do Pacífico e averiguar se não existe sobreposição entre elas. Embora não tenha sido possível a comparação com o holótipo de *X. riveti*, pela proximidade com a localidade tipo (Peru) é bem provável essa espécie se trate do grupo P1 obtido no presente estudo.

Nos estudos anteriores em que a presença de pelo menos duas espécies de *Xiphopenaeus* havia sido detectada no Atlântico, diferenças notáveis na distribuição geográfica e na abundância, entre as espécies haviam sido reportadas (Gusmão et al., 2006; Pierjorge et al., 2014). Embora tenha sido utilizado outro trecho do gene COI e não seja possível a comparação com as sequências do presente estudo, o padrão de distribuição e abundância da denominada espécie 1, detectada nos estudos anteriores, parece bastante semelhante ao observado para grupo A1 (*Xiphopenaeus kroyeri* sensu stricto), sendo a espécie capturada em maior abundância e com distribuição contínua ao longo da costa brasileira. Por outro lado, a distribuição da espécie 2, detectada nesses estudos, é bastante similar ao grupo A2, sendo encontrado em menores quantidades em poucas localidades.

A sobreposição na distribuição entre pelo menos duas espécies do gênero havia sido reportada inicialmente para Natal, Rio Grande do Norte e Ubatuba, São Paulo (Gusmão et al., 2006) e registada posteriormente em Cananéia, São Paulo (Francisco, 2009) e em Caravelas, Bahia (Pierjorge et al., 2014). Os resultados do presente estudo mostram a presença de pelo menos duas espécies em simpatria em mais três localidades (Maragogi, Vigia e Oiapoque) (Figura 16), indicando que A1 e A2 tenham distribuição contínua pela costa do Brasil, embora a segunda pareça apresentar menor abundância e, que a A2 e A3 também ocorrem em simpatria.



## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Uma vez que *Xiphopenaeus* sp.1, denominada por Gusmão et al. (2006), a qual parece corresponder ao grupo A1 do presente estudo tenha sido detectada em Caracas na Venezuela e em São Luís do Maranhão (Gusmão et al., 2013), parece haver a sobreposição das três espécies do Atlântico no norte da América do Sul, já que no presente estudo A2 e A3 foram coletadas na região norte do Brasil, em localidades situadas entre Caracas e São Luís.

Diferentes topologias foram obtidas nas análises filogenéticas realizadas para cada um dos genes utilizados, a única relação que parece bem resolvida é entre A2 e A3 que aparecem como grupo irmão em ambos os filogramas. Ambas as análises também apontam que A1 não seja grupo irmão das outras espécies do Atlântico. Futuros estudos filogenéticos envolvendo mais genes são necessários para o melhor entendimento das relações entre as espécies do gênero.

A datação molecular realizada para o gene COI, indica que a separação entre o clado formado por A1 e o clado formado pelas demais espécies do gênero ocorreu a aproximadamente cinco milhões de anos. Já a separação entre as espécies do Pacífico (P1 e P2) e as demais Atlântico ocorreu por volta de 3,9 milhões de anos. Considerando o intervalo de confiança da análise, os resultados são concordantes com os obtidos por Gusmão et al. (2006) para a separação entre *Xiphopenaeus* sp1 e o ancestral comum de *X. riveti* e *Xiphopenaeus* sp2 (4,5 milhões de anos) e a separação entre *X. riveti* e *Xiphopenaeus* sp2 (4 milhões de anos).



Figura 16 – Mapa com a distribuição das espécies detectadas de *Xiphopenaeus* na costa do continente americano – 1 – Galveston, Texas, Estados Unidos; 2 – Tabasco, México; 3 – Carmen, Campeche, México; 4 – Oiapoque, Amapá, Brasil; 5 – Vigia, Pará, Brasil; 6 – Baía Formosa, Rio Grande do Norte, Brasil; 7 – Maragogi, Alagoas, Brasil; 8 – Aracaju, Sergipe, Brasil; 9 – Marataízes, Espírito Santo, Brasil; 10 – Macaé, Rio de Janeiro, Brasil, 11 – Ubatuba, São Paulo, Brasil; 12 – Santos, São Paulo, Brazil; 13 – Cananeia, São Paulo, Brasil; 14 – Penha, Santa Catarina, Brasil; 15 – Tehuantepec, Oaxaca, México; 16 – Sierpe, Puntareñas, Costa Rica.

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Os resultados obtidos indicam que o ancestral de A1 já se encontrava separado do ancestral comum das demais espécies do gênero, antes do fechamento final do Istmo do Panamá, o qual é estimado em 2,8 milhões de anos (O’Dea et al., 2016). Tal estimativa faz com que mesmo a separação entre as demais espécies do Atlântico (A2 e A3) e as espécies do Pacífico (P1 e P2), também tenha ocorrido antes do fechamento total do istmo. Contudo, o fechamento foi um processo gradual, ao longo do qual diferença nas condições ambientais entre o mar do Caribe e o Oceano Pacífico, foram se tornando cada vez mais acentuadas (O’Dea et al., 2016), o que pode ter levado a separação entre as espécies do Atlântico e do Pacífico, por volta de quatro milhões de anos atrás.

No Atlântico Ocidental as principais barreiras ao fluxo gênico de espécies marinhas são as grandes plumas de água doce formadas pelas descargas dos rios Amazonas e Orinoco, no norte da América do Sul (Froelich et al. 1978; Muller-Karger et al. 1988), as quais marcam a divisão entre as províncias biogeográficas brasileira e caribenha (Boschi, 2000; Briggs & Bowen, 2012). Tal divisão representa uma barreira ao fluxo gênico e, é a causa de especiação, em diferentes táxons, como nos ouriços do mar dos gêneros *Echinometra* Gray, 1825 (McCartney et al. 2000) e *Diadema* Gray, 1825 (Lessios et al., 2001) e como em peixes cirurgiões habitantes de recifes de corais (Rocha et al., 2002).

A atual localização da foz dos Rios Amazonas e Orinoco, data do período Mioceno, e coincide com o final do soerguimento dos Andes (Hoorn et al. 1995, Campbell Jr et al. 2006). Ou seja, bem anterior à separação entre A2 e A3. Porém, essa barreira parece pouco efetiva para separar estas espécies, dada a sobreposição entre elas no norte da América do Sul. Diversos estudos têm proposto que *X. kroyeri* completa seu ciclo de vida inteiramente no ambiente marinho, não necessitando do estuário para

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

reprodução (Branco, 2005; Costa et al., 2011; Castilho et al., 2015). Contudo, em algumas das localidades, amostradas no presente estudo (Oiapoque, Vigia e Cananea), indivíduos dos grupos A2 e A3 foram coletados dentro de regiões estuarinas, indicando que essa possa ser uma diferença no ciclo de vida entre essas espécies e *X. kroyeri* sensu stricto.

Para alguns táxons a principal barreira ao fluxo gênico ocorre entre o Golfo do México e o Caribe, como os ermitões *Clibanarius vittatus* (Bosc, 1802) e *C. simetricus* (Randall, 1840), com a primeira restrita ao Golfo do México e a segunda distribuída no Caribe e América do Sul (Negri et al., 2014). Em *Atya scabra* (Leach, 1816), foi detectado o compartilhamento de haplótipos entre indivíduos de localidades do Brasil e do Caribe, enquanto as localidades do Golfo do México se mostraram isoladas, embora as divergências entre as duas linhagens ainda mantenham-se dentro do nível intraespecífico (Oliveira, 2014).

A dinâmica de correntes do Golfo do México, incluindo a “loop current”, uma corrente que flui pela borda do golfo desde o sul, no Canal de Yucatan, em direção à Flórida, pode impedir a entrada de larvas vindas do mar do Caribe, representando uma barreira à dispersão e conseqüentemente ao fluxo gênico entre Caribe e Golfo do México (Oey et al., 2005). Nas três localidades amostradas, situadas dentro do Golfo do México, apenas o grupo A3 foi coletado, apoiando que Loop Current possa ser uma barreira à entrada de espécies de fora do Golfo. Por outro lado, a ocorrência de A2 e A3 em simpatria, no norte do Brasil, é um indicativo de que pode haver o transporte de larvas de A3 para fora do Golfo do México, acompanhando o trajeto da Loop Current.

Finalmente, a transposição das barreiras geográficas citadas pode ter sido conseqüência da ação antrópica, com o transporte de larvas na água de lastro de navios.

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Atualmente a água de lastro tem sido responsável pela introdução de muitas espécies em localidades não nativas (Carlton & Geller, 1993). Baeza e Fuentes (2013) atribuíram ao transporte na água de lastro a semelhança genética encontrada entre indivíduos de *Palaemon floridanus* Chace, 1942 do Panamá (Caribe) e da costa da Flórida (Golfo do México).

A análise filogenética do gênero de gastrópodes *Echinolittorina* Habe, 1952 mostrou um padrão similar na separação de várias espécies irmãs ao observado para P1 e P2, sendo sempre uma espécie coletada no sul da América Central e outra no México (Williams & Reid, 2004). A ocorrência do Domo Termal da Costa Rica entre as duas localidades amostradas no presente estudo também parece ser favorável à separação das duas espécies, uma vez que, as correntes superficiais são impulsionadas fortemente pelos ventos para a região off shore (Fiedler & Talley, 2006), transportando as larvas pelágicas para regiões não favoráveis ao assentamento.

A despeito das distâncias genéticas as espécies do gênero *Xiphopenaeus* são extremamente similares, mostrando ocorrência de estase morfológica. Plasticidade comportamental, fisiológica e no desenvolvimento, permitem aos organismos compensar mudanças ambientais e mesmo genéticas, sem alterações morfológicas (Wake, 1983).

Na descrição de *X. riveti*, Bouvier (1907) relata que a espécie apresentaria apenas quatro dentes rostrais bem desenvolvidos e um quinto dente posterior rudimentar, e teria o rostro não tão longo quanto o de *X. kroyeri*. Burkenroad (1934) comparando indivíduos *X. riveti* provenientes do Panamá e de *X. kroyeri* da Louisiana, EUA e da Bahia, Brasil, concluiu que tais características não se mantinham em todos espécimes e que a diagnose por meio desses caracteres não seria possível. Nesse mesmo

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

estudo também foram encontradas pequenas diferenças entre os indivíduos do Brasil e do Golfo do México, as quais não foram suportadas pelas análises do presente estudo.

Diferenças morfométricas, tanto lineares quanto geométricas foram observadas entre populações de *Xiphopenaeus kroyeri* da costa brasileira (Bissaro et al., 2012; Davanso, 2015). Contudo, os agrupamentos entre localidades detectadas nas análises morfométricas não coincidem com os resultados obtidos pelas ferramentas moleculares aplicadas no presente estudo. Diferenças morfométricas podem ocorrer sem que ocorra diferenciação genética, podendo ser resultado de plasticidade fenotípica em reflexo às condições ambientais distintas (Wieman et al., 2013).

As diferenças capazes de separar os grupos obtidos geneticamente foram encontradas nos caracteres sexuais secundários dos machos, petasma e apêndice masculino. A genitália externa dos Dendrobranchiata tem se mostrado portadora de caracteres importantes para a taxonomia do grupo, sendo útil para a separação de espécies cogenéricas que apresentam grande similaridade morfológica, como por exemplo, os camarões do gênero *Farfantepenaeus* (Perez-Farfante, 1967; Perez-Farfante & Kensley, 1997; Tavares & Gusmão, 2016).

Em estudos anteriores, o petasma de *Xiphopenaeus* é descrito sem maior detalhamento na parte final das projeções disto-laterais (Heller, 1862; Smith, 1869; Perez-Farfante & Kensley, 1997). Fransozo et al. (2011) estudaram o desenvolvimento do petasma de *Xiphopenaeus kroyeri* da região de Ubatuba, e não relataram diferenças em sua morfologia entre os indivíduos, a foto reportada por tais autores é similar ao formato aqui descrito para os grupos A2 e A3. Burkenroad (1934) notou uma diferença no “pequeno dente” da projeção disto-lateral, entre os indivíduos da Bahia e da

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Louisiana, considerando a distribuição encontrada para as espécies do gênero, provavelmente ele estava analisando *Xiphopenaeus kroyeri* sensu stricto e A3.

Seria esperado, que o mesmo padrão de separação entre as espécies se repetisse com os télicos, uma vez que, a diferenciação na morfologia das estruturas sexuais contribui para o isolamento reprodutivo, contribuindo para a formação de espécies crípticas (Tavares & Gusmão, 2016). Contudo, a hipótese de que as genitálias masculinas e femininas evoluem num modelo “chave e fechadura” como mecanismo de isolamento reprodutivo (Eberhard, 1985), não se aplica a todos os organismos, como verificado para o gênero de camarões *Sicyonia* H. Milne Edwards, 1830 Bauer (1996). Assim é possível que os diferentes tipos de petasma observados nos machos das espécies do gênero *Xiphopenaeus* tenham evoluído independentemente de diferenciação entre os télicos das fêmeas dessas espécies.

Futuros estudos da ultraestrutura da parte interna do télico, envolvendo um número maior de espécimes, são necessários para a resolução do problema taxonômico para as fêmeas. Infelizmente no presente estudo um número baixo sequências dos genes analisados foi obtido de fêmeas das novas espécies, algumas delas ainda juvenis.

A descrição do apêndice masculino de *Xiphopenaeus*, em estudos anteriores, trazia poucos detalhes. Smith (1869) descreve como ovoide e achatado e Perez-Farfante & Kensley (1997) descrevem apenas como subcircular. De maneira geral, com a observação ao estéreo microscópio, o apêndice masculino de *Xiphopenaeus* é bastante semelhante ao de *Rimapenaeus fuscina* (Perez-Farfante, 1971), aparentemente refletindo a proximidade filogenética entre os dois gêneros (Tavares et al., 2009)

Detalhes micro anatômicos podem se revelar cruciais para a distinção entre espécies crípticas (Jörger & Schrödl, 2013). A microscopia eletrônica de varredura do

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

apêndice masculino revelou detalhes e ornamentações até então desconhecidos para o gênero. Mostrando que esta ferramenta pode ser de grande utilidade para a separação das espécies identificadas geneticamente, separando inclusive, A2 e A3. De acordo com Dall et al., (1990) a morfologia dessa estrutura é única entre cada espécie.

Futuros estudos procurando diferenças entre as fêmeas das espécies do gênero *Xiphopenaeus* ainda são necessários. No entanto, conhecendo as características diagnósticas para os machos, pelo menos, como as diferenças nas projeções distolaterais e no apêndice masculino, a detecção das espécies se torna mais fácil, trazendo a possibilidade da observação da coloração em vivo e o padrão de distribuição dos cromatóforos desses animais, os quais poderiam ser utilizados, tomados os devidos cuidados, como uma ferramenta taxonômica adicional. Ademais, a descrição detalhada das novas espécies do Atlântico (A2 e A3), bem como a re-descrição de *X. kroyeri* (A1), baseadas nos caracteres encontrados nos machos, encontram-se já em andamento e a obtenção de mais exemplares provenientes da costa pacífica mexicana, e a comparação com o holótipo de *X. riveti* estão sendo providenciados para a resolução futura da situação das espécies do gênero no oceano Pacífico.

No presente foram detectados valores de  $F_{st}$  significativos entre algumas populações de *Xiphopenaeus kroyeri* sensu stricto, embora tal separação não tenha seguido um padrão geográfico claro. Resultados similares aos obtidos por Gusmão et al. (2006), para a *Xiphopenaeus* sp.1, a qual apresentou valores significativos de  $F_{st}$ , entre algumas localidades, porém também sem seguir um padrão geográfico. Os resultados obtidos parecem condizentes com a diferenciação devido à adaptação a fatores locais. Diversos autores sugerem que os padrões de circulação, regimes de temperatura, topografia costeira, e diferenças na história de vida e resistência aos fatores ambientais



## **Carvalho-Batista, A. 2017**

das espécies podem afetar a estruturação genética entre as populações (Dawson *et al.* 2001; Hickerson & Ross 2001; Beheregaray *et al.* 2002; Rocha *et al.* 2005).

Gusmão *et al.* (2006) detectaram a estruturação entre as populações para as duas espécies de *Xiphopenaeus* encontradas por tais autores. No presente estudo, porém, A2 e A3 apresentaram homogeneidade entre as localidades, com haplótipos compartilhados entre indivíduos das localidades mais distantes entre si, em que tais espécies foram coletadas, como Cananéia e Oiapoque, no caso de A2 e, Galveston e Vigia no caso de A3.

E pelo menos para A2, que apesar de estar exposta às mesmas variações de ambientais discutidas para A1, os resultados são condizentes com o seu tipo de desenvolvimento larval. Espécies marinhas com fases larvais móveis durante seu ciclo de vida são capazes de ampla dispersão e, portanto, na ausência de uma barreira, apresentam homogeneidade genética ao longo de sua distribuição (Gopurenko & Hughes, 2002). Camarões peneídeos apresentam fase larval na qual estão sujeitos ao transporte passivo pelas correntes e massas de água, por cerca de um mês (Dall *et al.*, 1990). Este tempo é suficiente para que uma larva transportada passivamente pelas correntes a uma velocidade de  $0,1 \text{ m/s}^{-1}$  percorra centenas de Km (Palumbi, 2003).

No caso de A3, como discutido anteriormente, as correntes marinhas dentro do Golfo do México parecem favoráveis à dispersão dentro dele, como observado em espécies de corais da região (Schmitz Jr. *et al.*, 2005), embora possa impedir o fluxo vindo de localidade do Caribe por exemplo. Para o carídeo *Palaemon floridanus*, por exemplo, foi detectada separação entre algumas populações de localidades dentro e fora do Golfo do México (Baeza & Fuentes, 2013).

## **Carvalho-Batista, A. 2017**

Fatores históricos, como extinções locais recorrentes, seguidos de recolonização e expansão populacional, podem gerar homogeneidade genética (Cunningham & Collins, 1998; Marko & Hart, 2011). Os resultados das análises demográficas realizadas apontam que as três espécies do Atlântico passaram por expansão populacional recente. Os altos valores de diversidade haplotípica com baixos valores de diversidade nucleotídica observados em A1, também suportam a ideia de expansão populacional, assim como o a rede de haplótipos em forma de estrela, observada em A2 e A3.

O cenário histórico suporta fortemente a expansão populacional, uma vez que, sendo um gênero de camarões de regiões tropicais, *Xiphopenaeus* ficaria restrito as regiões de menores latitudes durante os períodos glaciais. Na costa brasileira, por exemplo, durante a última glaciação, a Corrente das Malvinas chegou a alcançar localidades mais ao norte, como o estado da Bahia (Ab'Saber, 2003). Assim, os sinais de expansão populacional observados podem ser fruto da recolonização das maiores latitudes dentro da distribuição geográfica das espécies do gênero, após esse período.

*Xiphopenaeus kroyeri* sensu lato (incluindo as três espécies) é um importante componente da pesca no litoral Brasileiro (IBAMA, 2009). E seus estoques ao longo da costa brasileira sofreram grandes declínios ao longo das últimas décadas, principalmente entre os anos 1980 e 1990 e, as capturas atuais representem apenas 40% do máximo já registrado (Boos et al., 2016). Assim, outra possibilidade, é que os desvios do equilíbrio demográfico observados possam ser devido a essa intensa exploração dos estoques pesqueiros.

Os resultados do presente estudo devem ser levados em conta na elaboração e implementação de medidas de manejo das espécies componentes do gênero *Xiphopenaeus*, atualmente, por exemplo, não é possível saber se o atual período de

defeso esteja protegendo todas elas, além de poderem ser utilizados em comparações com estudos futuros.

## **6. Conclusão**

O presente estudo mostrou que o gênero *Xiphopenaeus* é composto por pelo menos cinco espécies, sendo três delas encontradas no Atlântico e duas no Pacífico. Tal afirmação é suportada tanto por resultados moleculares quanto pela ultraestrutura dos caracteres sexuais secundários dos machos. Pela primeira vez, se propõe evidências morfológicas para a identificação das espécies do gênero, principalmente as do Atlântico. A distribuição geográfica das espécies encontradas no Atlântico se sobrepõe, sendo que a espécie encontrada em maior quantidade de indivíduos e em mais localidades corresponde a *X. kroyeri* sensu stricto, enquanto as outras duas, registradas em menores abundâncias, são novas espécies a serem descritas. As três espécies apresentaram sinais de desvios do equilíbrio demográfico, sendo que apenas em *Xiphopenaeus kroyeri* sensu stricto foram verificados valores significativos de  $F_{st}$  entre populações de diferentes localidades, embora sem apresentar um padrão geográfico claro. Mais estudos são necessários para delimitação correta da distribuição geográfica das espécies do Pacífico, bem como a verificação de qual delas corresponde realmente a *X. riveti*, embora pela proximidade com a localidade tipo (Peru) é bem provável que este se trate do grupo P1 obtido no presente estudo.

## **Referências**

- Ab'Saber, A.N. 2003. **Os domínios de natureza no Brasil**. Ateliê Editorial, São Paulo, 159pp.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.; Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215(3): 403 – 410.
- Aoki, M.; Nakagawa, Y.; Kawamoto, M.; Wada, K. 2012. Population divergence of the sentinel crab *Macrophthalmus banzai* is consistent with regional breeding season differences. **Zoological Science**, 29(12): 821–826.
- Avise, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36(1): 3-15.
- Baeza, J.A.; Fuentes, M.S. 2013. Phylogeography of the shrimp *Palaemon floridanus* (Crustacea: Caridea: Palaemonidae): a partial test of meta-population genetic structure in the wider Caribbean. **Marine Ecology**, 34: 381-393.
- Ballard, J.W.O.; Rand, D.M. 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. **Annual Reviews of Ecology, Evolution, and Systematics**, 36(1): 621-642.
- Ballard, J.W.O.; Whitlock, M.C. 2004. Incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, 13(4): 729:744.
- Bandelt, H.J.; Forster, P.; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16(1): 37–48.
- Bauer, R.T. 1996. Role of the petasma and appendices masculinae during copulation and insemination in the penaeoid shrimp, *Sicyonia dorsalis* (Crustacea: Decapoda: Dendrobranchiata). **Invertebrate Reproduction & Development**, 29(3): 173-184.
- Beheregaray, L.B.; Sunnucks, P.; Briscoe, D.A. 2002. A rapid fish radiation associated with the last sealevel changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 269: 65–73.
- Bickford, D.; Lohman, J.D.; Sohdi, N.S.; Ng, P.K.L.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K.; Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, 22: 148-155.
- Bilgin, R.; Utkan, M.A.; Kalkan, E.; Karhan, S.Ü.; Bekbolet, M. 2015. DNA barcoding of twelve shrimp species (Crustacea: Decapoda) from Turkish seas reveals cryptic diversity. **Mediterranean Marine Science**, 16(1): 36-45.
- Bissaro, F.G.; Gomes Jr, J.L.; Di Benedetto, A.P.M. 2012. Morphometric variation in the shape of the cephalothorax of shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* on the east coast of Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 93(3): 683-691.

## Carvalho-Batista, A. 2017

- Blair, C.P.; Abrahamson, W.G.; Jackman, J.A.; Tyrrel, L. 2005. Cryptic speciation and host-race formation in a purportedly generalist tumbling flower beetle. **Evolution**, 59: 304-316.
- Bortolus, A. 2008. Error cascades in the biological sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. **AMBIO: A Journal of Human Environment**, 37: 114-118.
- Boschi, E.E. 2000. Species of decapod crustaceans and their distribution in the American marine zoogeographic provinces. **Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero**, 13: 1-64.
- Boss, H.; Costa, R.C.; Santos, R.A.; Neto, J.D.; Rodrigues, E.S.; Rodrigues, L.F.; D’Incao, F.; Ivo, C.T.C.; Coelho, P.A. 2016. Avaliação dos camarões peneídeos (Decapoda: Penaeidae). In: Pinheiro, M.; Boos, H., (Orgs.) **Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014**. Sociedade Brasileira de Carcinologia - SBC, Porto Alegre, p. 300-317.
- Bouvier, E.L., 1907. Crustacés décapodes nouveaux recueillis à Païta (Pérou) par M. le Dr Rivet. **Bulletin du Muséum national d’Histoire naturelle**, 1: 113-116.
- Bracken-Grissom, H.D.; Felder, D.L.; Vollmer, N.L.; Martin, J.W.; Crandall, K.A. 2012. Phylogenetics links monster larva to deep-sea shrimp. **Ecology and Evolution**, 2 (10): 2367-2373.
- Branco, J.O. 2005. Biologia e pesca do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Crustacea, Penaeidae), na Armação do Itapocoroy, Penha, SC. **Revista Brasileira de Zoologia**, 22(4): 1050-1062.
- Briggs, J.C.; Bowen, B.W. 2012. A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. **Journal of Biogeography**, 39: 12-30.
- Brown, W.M.; George, M. Jr.; Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 76(4): 1967-1971.
- Burkenroad, M.D. 1934. The Penaeidea of Louisiana with a discussion of their world relationships. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 68: 61-143.
- Campbell Jr, K.E.; Frailey, C.D.; Romero-Pittman, L. 2006. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, 239: 166-219.
- Carlton, J.T.; Geller, J.B. 1993. Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms. **Science**, 261: 78-82.
- Carvalho-Batista, A.; Negri, M.; Pileggi, L.G.; Castilho, A.L.; Costa, R.C.; Mantelatto, F.L. 2014. Inferring population connectivity across the range of distribution of the stiletto

## Carvalho-Batista, A. 2017

- shrimp *Artemesia longinaris* Spence Bate, 1888 (Decapoda, Penaeidae) from DNA barcoding: implications for fishery management. **Zookeys**, 457: 271-288.
- Castilho, A.L.; Bauer, R.T.; Freire, F.A.M.; Fransozo, V.; Costa, R.C.; Grabowski, R.C.; Fransozo, A. 2015. Lifespan and reproductive dynamics of the commercially important sea bob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Penaeoidea): synthesis of a 5-year study. **Journal of Crustacean Biology**, 35(1): 30-40.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, 17(4): 540-552.
- Castro, R.H.; Costa, R.C.; Fransozo, A.; Mantelatto, F.L.M. 2005. Population structure of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea: Penaeoidea) in the littoral of São Paulo, Brazil. **Scientia Marina**, 69: 105 - 112.
- Cheng, J.; Sha, Z.; Liu, R. 2015. DNA barcoding of genus *Metapenaeopsis* (Decapoda: Penaeidae) and molecular phylogeny inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**, 61: 376-384.
- Clark, A.G.; Hartl, D.L. 2010. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª Edição. Artmed, Porto Alegre, 660pp.
- Colborn, J.; Crabtree, R.E.; Shaklee, J.B.; Pfeiler, E.; Bowen, B.W. 2001. The evolutionary enigma of bonefish (*Albula* spp.): cryptic species and ancient separation in a globally distributed shorefish. **Evolution**, 55: 807-820.
- Costa, F.O.; deWaard, J.R.; Boutillier, J.; Ratnasingham, S.; Dooh, R.T.; Hajibabaei, M.; Hebert, P.D.N. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 64(2): 272-295.
- Costa, R.C. 2002. **Biologia e Distribuição Ecológica das Espécies de Camarões Dendrobranchiata (Crustacea: Decapoda) na Região de Ubatuba (SP)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Botucatu, SP, UNESP. 186pp.
- Costa, R.C.; Carvalho-Batista, A.; Herrera, D.R.; Pantaleão, J.A.; Teodoro, S.S.A.; Davanso, T.M. 2016. Carcinofauna acompanhante da pesca do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* em Macaé, Rio de Janeiro, sudeste brasileiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, 42: 611-624.
- Costa, R.C.; Fransozo, A.; Freire, F.A.M.; Castilho, A.L. 2007. Abundance and ecological distribution of the “sete-barbas” shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Helle, 1862) (Decapoda: Penaeoidea) in three bays of the Ubatuba Region, South–Eastern Brazil. **Gulf and Caribbean Research**, 19: 33-41.
- Costa, R. C.; Heckler, G. S.; Simões, S. M.; Lopes, M.; Castilho, A. L. 2011. Seasonal variation and environmental influences on abundance of juveniles of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) in southeastern Brazil. In: Pessani, D.; Tirelli, T.; Frogliani, C. (Orgs.). **IX Colloquium Crustacea Mediterranea – Behaviour, Ecology, Fishery**. Torino, Italy: *Monografe del Museo Regionale di Scienze Naturali*, p. 47-58.

## Carvalho-Batista, A. 2017

- Cunningham, C.W.; Collins, T.M. 1998. Beyond area relationships: Extinction and recolonization in marine molecular biogeography. In: DeSalle, R.; Schierwater, B. (Eds.) **Molecular Approaches to Ecology and Evolution**. Birkhauser Verlag, Basel, p. 297-322.
- Dall, W., B.J. Hill, P.C. Rothlisberg, and D.J. Sharples. 1990. The biology of the Penaeidae. In: Blaxter, J.H.S.; Southward, A.J. (Eds.). **Advances in Marine Biology**. San Diego: Academic Press, San Diego, 27:1-489.
- Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, 9(8): 772.
- Davanso, T.M. 2015. **Comparação da dinâmica populacional e identificação dos estoques pesqueiros do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda, Penaeidae) no litoral brasileiro**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Botucatu, SP, UNESP. 84pp.
- Dawson, M.N.; Staton, J.L.; Jacobs, D.K. 2001. Phylogeography of the tidewater goby, *Eucyclogobius newberryi* (Teleostei, Gobiidae), in coastal California. **Evolution**, 55(6): 1167–1179.
- De Grave S.; Fransen, C.H.J.M. 2011. Carideorum catalogus: the recent species of the dendrobranchiate, stenopodidean, procarididean and caridean shrimps. **Zoologische Mededelingen**, 85: 196-585.
- D’Incao, F.; Valentini, H.; Rodrigues, L.F. 2002. Avaliação da pesca de camarões nas regiões sudeste e sul do Brasil. 1965-1999. **Atlântica**, 24: 103-116.
- Eberhard, W.G. 1985. **Sexual Selection and Animal Genitalia**. Harvard University Press, New York, 244pp.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1: 47-50.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131(2): 479–491.
- Fiedler, P.C.; Talley, L.D. 2006. Hydrography of the eastern tropical Pacific: A review. **Progress in Oceanography**, 69: 143-180.
- 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 Technology** 3(5): 294–299.
- Francisco, A.K. 2009. **Caracterização genética populacional do camarão marinho *Xiphopenaeus kroyeri* no litoral sudeste-sul do Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 100pp.

## Carvalho-Batista, A. 2017

- Francisco, A.K.; Galetti Junior, P.M. 2005. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. **Genetics and Molecular Biology**, 28(2): 258-261.
- Fransozo, A.; Costa, R.C.; Mantelatto, F.L.M.; Pinheiro M.A.A.; Santos, S. 2002. Composition and abundance of shrimp species (Penaeidea and Caridea) in Fortaleza Bay, Ubatuba, São Paulo, Brazil. In: Briones, E.E.; Alvarez, F. (eds). **Modern Approaches to the Study of Crustacea**. New York, NY, USA, p. 117–125.
- Fransozo, V.; Santos, D.C.; López-Greco, L.S.; Bolla Jr, E.A. Development of secondary sexual characters in the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae): a scanning electron microscope study. **Invertebrate Reproduction & Development**, 55(1): 6-15.
- Frézal, L.E.; Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, 8: 727–736.
- Froelich, P.N.; Atwood, D.K.; Giese, G.S. 1978. Influence of Amazon River discharge on surface salinity and dissolved silicate concentration in the Caribbean Sea. **Deep-Sea Research**, 25: 735–744.
- Gopurenko, D.; Hughes, J.M. 2002. Regional patterns of genetic structure among Australian populations of the mud crab, *Scylla serrata* (Crustacea: Decapoda): evidence from mitochondrial DNA. **Marine and Freshwater Research**, 53: 849–857.
- Gusmão, J.; Lazoski, C.; Monteiro, F. A.; Solé-Cava, A. M. 2006. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus rivetii*. **Marine Biology**, 149: 491 – 502.
- Gusmão, J.; Pierjorge, R.M.; Tavares, C. 2013. The contribution of genetics in the study of the sea-bob shrimp populations from the Brazilian coast. **Boletim do Instituto de Pesca**, 39(3): 323-338.
- Hall, B.G. 2011. **Phylogenetic trees made easy: A how-to manual**. 4rd. edition. Sinauer Associates Inc., Sunderlands, 233 pp.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41:95-98.
- Hasegawa, M.; Kishino, K.; Yano, T. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**. 22(2):160–174.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; de Waard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 270(1512): 313-321.
- Hebert, P.D.N.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Janzen, D.H.; Hallwachs. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes*



## Carvalho-Batista, A. 2017

*fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101: 14812-14817.

Hebert, P.D.N.; Stoeckle, M.Y.; Zemplak, T.S.; Francis, C.M. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, 2(10):e312.doi:10.1371/journal.pbio.0020312.

Heller, C., 1862. Beiträge zur näheren Kenntnis der Macrouren. **Sitzungsberichte der mathematisch-naturwissenschaftlichen Classe der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien**, 1862: 389- 426.

Hinckerson, M.J.; Carstens, B.C.; Cavender-Bares, J.; Crandall, K.A.; Grahan, C.H.; Johnson, J.B.; Rissler, L.; Victoriano, P.F.; Yoder, A.D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54: 291-301.

Hickerson, M.J.; Ross, J.R.P. 2001. Post-glacial population history and genetic structure of the northern clingfish (*Gobbiopsis meandricus*), revealed from mtDNA analysis. **Marine Biology**, 138: 407–419.

Hillis, D.M.; Mable, B.K.; Moritz, C. 1996. **Molecular Systematics**. Sinauer Associates, Sunderland, 655 pp.

Hoorn, C.; Guerrero, J.; Sarmiento, G.A.; Lorente M.A. 1995. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. **Geology**, 23(3): 237–340.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis - IBAMA, 2008. Instrução Normativa, 189, de 23 de setembro de 2008. Dispõe sobre o período de defeso do camarão sete barbas. (Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília).

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis - IBAMA, 2009. Estatísticas da pesca 2007: Brasil e grandes regiões e unidades da federação. Brasília, Ibama, 113pp.

Instituto de Pesca. 2013. Estatística pesqueira. Available at <http://www.pesca.sp.gov.br/estatistica/index.php>.

Jörger, K.M.; Schrödl, M. 2013. How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. **Frontiers in Zoology**, 10:59.

Keskin, E.; Atar, H.H. 2013. DNA barcoding commercially important aquatic invertebrates of Turkey. **Mitochondrial DNA**, 24(4): 440–450.

Kim, W.; Abele, L.G. 1990. Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18S rRNA nucleotide sequences. **Journal of Crustacean Biology**, 10: 1-13.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16(2): 111 – 120.

## Carvalho-Batista, A. 2017

- Knowlton, N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. **Hydrobiologia**, 420: 73–90.
- Knowlton, N.; Weigt, L.A. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 265: 2267-2263.
- Lefébure, T.; Douady, C.J.; Gouy, M.; Trontelj, P.; Briolay, J.; Gilbert, J. 2006. Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. **Molecular Ecology**, 15: 1797-1806.
- Lessios, H.A.; Kessing B.D.; Pearse, J.S. 2001. Population structure and speciation in tropical seas: global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. **Evolution**, 55(5): 955–975.
- Magalhães, T.; Robles, R.; Felder, D.L.; Mantelatto, F.L. 2016. Integrative taxonomic study of the purse crab genus *Persephona* Leach, 1817 (Brachyura: Leucosiidae): combining morphology and molecular data. **PLoS ONE**, 11: e0152627. doi: 10.1371/journal.pone.0152627.
- Mantelatto, F.L.; Carvalho, F.L.; Simões, S.M.; Negri, M.; Carvalho-Souza, E.A.; Terossi, M. 2016. New primers for amplification of cytochrome c oxidase subunit I barcode region designed for species of Decapoda (Crustacea). **Nauplius**, 24.
- Mantelatto, F.L.; Robles, R.; Felder, D.L. 2007. Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus *Portunus* (Crustacea: Brachyura, Portunidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 150(1): 211-220.
- Marko, P.B.; Hart, M.W. 2011. The complex analytical landscape of gene flow inference. **Trends in Ecology and Evolution**, 26(9): 448-456.
- Marques, C.G. 2015. **Filogeografia comparada e relações genéticas em espécies de camarões peneídeos (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) de ocorrência no litoral brasileiro**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 119 pp.
- Martinelli-Lemos, J.M.; Nahum, V.J.I.; Schneider, H. 2014. Genetic variability among populations of *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda, Penaeidae) from the Northern and Northeastern coast of Brazil using DNA fingerprint analysis. **International journal of Science Commerce and Humanities**, 2(3): 103-122.
- Mayr, E. 1963. **Animal Species and Evolution**. Harvard University Press, Cambridge, 797pp.
- McCartney, M.A.; Keller, G.; Lessios, H.A. 2000. Dispersal barriers in tropical oceans and speciation of Atlantic and eastern Pacific *Echinometra* sea urchins. **Molecular Ecology**, 9(9): 1391–1400.
- McLaughlin, P. A.; Taylor, G.T.; Tracey, M.L. 1982. Systematic methods in research. In: Abele, L.G. (Ed.). **The biology of Crustacea**. Academic Press, New York, p. 29-63.

## Carvalho-Batista, A. 2017

- Miller, M.A.; Pfeiffer, W.; Schwartz, T. 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, p. 1 - 8.
- Molbo, D.; Machado, C.A.; Sevenster, G.J.; Keller, L.; Cryptic species of fig-pollinating wasps: Implications for the evolution of the fig–wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100: 5867-5872.
- Muller-Karger, F.E.; McClain, C.R.; Richardson, P.L. 1988. The dispersal of the Amazon's water. **Nature**, 6168: 56–59.
- Negri, M.; Lemaitre, R.; Mantelatto, F.L. 2014. Molecular and morphological resurrection of *Clibanarius symmetricus* (Randall, 1840), a cryptic species hiding under the name for the “thinstripe” hermit crab *C. vittatus* (Bosc, 1802) (Decapoda: Anomura: Diogenidae). **Journal of Crustacean Biology**. 34(6): 848-861.
- Negri, M.; Pileggi, L.G.; Mantelatto, F.L. 2012. Molecular barcode and morphological analyses reveal the taxonomic and biogeographical status of the stripedlegged hermit crab species *Clibanarius sclopetarius* (Herbst, 1796) and *Clibanarius vittatus* (Bosc, 1802) (Decapoda: Diogenidae). **Invertebrate Systematics**, 26 (5/6): 561-571.
- Nei, M.; Kumar, S. 2000. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press, New York, 352pp.
- O’Dea, A.; Lessios, H.A.; Coates, A.G.; Eytan, R.I.; Restrepo-Moreno, S.A.; Cione, A.L.; Collins, L.S.; Quiroz, A.; Farris, D.W.; Norris, R.D.; Stallard, R.F.; Woodburne, M.O.; Aguilera, O.; Aubry, M.P.; Berggren, W.A.; Budd, A.F.; Cozzuol, M.A.; Coppard, S.E.; Duque-Caro, H.; Finnegan, S.; Gasparini, G.M.; Grossman, E.L.; Johnson, K.G.; Keigwin, L.D.; Knowlton, N.; Leigh, E.G.; Leonard-Pingel, J.S.; Marko, P.B.; Pyenson, N.D.; Rachello-Dolmen, P.G.; Soibelzon, E.; Soibelzon, L.; Todd, J.A.; Vermeij, G.J.; Jackson, J.B.C. 2016. Formation of the Isthmus of Panama. **Science Advances**, 2 : e1600883.
- Oey, L-Y.; Ezer, T.; Lee, H.C. 2005. Loop Current, rings and related circulation in the Gulf of Mexico: A review of numerical models and future challenges. In: Sturges, W.; Lugo-Fernandez, A. (Eds.). *Circulation in the Gulf of Mexico: Observations and Models*. Washington, DC, American Geophysical Union. **Geophysical Monography Series**, 161: 31-56.
- Oliveira, C.M.C.A. 2014. **Variabilidade genética do camarão de água doce *Atya scabra* (Leach, 1816) ao longo de sua distribuição geográfica (Decapoda, Caridea, Atyidae)**. Monografia de Bacharelado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. 88pp.
- Palumbi, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, 25: 547–572.

## Carvalho-Batista, A. 2017

- Palumbi, S.R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. **Ecological Applications**, 13(1): 146-158.
- Palumbi, S.R.; Benzie, J. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 1(1): 27-34.
- Pantaleão, J.A.F.; Carvalho-Batista, A.; Fransozo, A.; Costa, R.C. 2016. The influence of upwelling on the diversity and distribution of marine shrimp (Penaeoidea and Caridea) in two tropical coastal areas of southeastern Brazil. **Hydrobiologia**, 763: 381-395.
- Pérez-Farfante, I. 1967. A new species and two new subspecies of shrimp of the genus *Penaeus* from the Western Atlantic. **Proceedings of Biological Society of Washington**, 80: 83-100.
- Pérez-Farfante, I. 1971. A key to the American Pacific shrimps of the genus *Trachypenaeus* (Decapoda, Penaeidae), with the description of a new species. **Fishery Bulletin**, 69(3): 635-646.
- Pérez-Farfante, I. 1998. Illustrated key to Penaeoid shrimps of commerce in the Americas. **NOAA Technical Reports NMFS**, 64: 1 - 32.
- Pérez-Farfante, I. & B. Kensley, 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera.— **Mémoires du Muséum National d'Histoire naturelle**, 175: 1-233.
- Pfenninger, M.; Schwenk, K. 2007. Cryptic species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC Evolutionary Biology**. 7:121:ISI:000248497600001.
- Pierjorge, R.M.; Pontes, M.N.; Duarte, A.V.B.; Gusmão, J. 2014. Haplotype-specific single-locus multiplex PCR assay for molecular identification of sea-bob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), cryptic species from the Southwest Atlantic using a DNA pooling strategy for simultaneous identification of multiple samples. **Biochemical Systematics and Ecology**, 54: 348-353.
- Quan, J.; Zhuang, Z.; Deng, J.; Dai, J.; Zhang, Y. 2004. Phylogenetic relationships of 12 Penaeoidea shrimp species deduced from mitochondrial DNA sequences. **Biochemical Genetics** 42(9-10): 331– 345.
- Rambaut, A. 2009. **FigTree version 1.3.1**. <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- Rambaut, A.; Suchard, M.A.; Xie, D.; Drummond, A.J. 2014. **Tracer v1.6**. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rocha, L.A.; Bass, A.L.; Robertson, D.R.; Bowen, B.W. 2002. Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic surgeonfishes (Teleostei: Acanthuridae). **Molecular Ecology**, 11(2): 243–252.

## Carvalho-Batista, A. 2017

- Rocha, L.A.; Robertson, D.R.; Roman, J.; Bowen, B.W. 2005. Ecological speciation in tropical reef fishes. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 272: 573–579.
- Rocha-Olivares, A.; Fleeger, J.W.; Foltz, D.W. 2001. Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic harpacticoid copepod. **Molecular Biology and Evolution**, 18: 1088-1102.
- Rodríguez-Rey, G.T.; Hartnoll, R.G.; Solé-Cava, A.M. 2016. Genetic structure and diversity of the island-restricted endangered land crab, *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 474: 204-209.
- Rogers, A.R.; Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, 9(3): 552–569.
- Ronquist, F.; Teslenko, M.; Van Der Mark, P.; Ayres, D.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M.A.; Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, 61(3): 539-542.
- Rossi, N.; Mantelatto, F.L. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0054698.
- Rozas, J.; Rozas, R. 1999. DnaSP version 3.0: an integrated program for molecular population genetic and molecular evolution analysis. **Bioinformatics**, 15: 174–175.
- Russo, C.A.M.; Miyaki, C.Y.; Pereira, S.L. 2000. Reconstrução filogenética: Métodos Geométricos. In: Martioli, S.R. (Ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Holos Editora, Ribeirão Preto, p. 108-116.
- Saitou, N.; Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4(4): 406–425.
- Santos, H.; Juste, J.; Ibañez, C.; Palmeirin, J.M.; Godinho, R.; Amorim, F.; Alves, P.; Costa, H.; Paz, O.; Pérez-Suarez, G.; Martínez-Alos, S.; Jones, G.; Rebelo, H. 2014. Influences of ecology and biogeography on shaping the distributions of cryptic species: three bat tale in Iberia. **Biological Journal of the Linnean Society**, 112(1): 150-162.
- Sambrook, J; Fritschi; E.F.; Maniatis, T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1626pp.
- Schubart, C.D.; Huber, M.G.J. 2006. Genetic comparisons of german populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Astacidae). **Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture**, 380: 1019–1028.
- Schubart, C.D.; Neigel, J.E.; Felder, D.L. 2000. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. **Crustacean Issues**, 12: 817-830.

## Carvalho-Batista, A. 2017

- Schmitz Jr, W.J.; Biggs, D.C.; Lugo-Fernandez, A.; Oey, L.-Y.; Sturges, W. 2005. A synopsis of the circulation in the Gulf of Mexico and on its continental margins. In: Sturges, W.; Lugo-Fernandez, A. (Eds.). *Circulation in the Gulf of Mexico: Observations and Models*. Washington, DC, American Geophysical Union. **Geophysical Monography Series**, 161: 11-30.
- Sharawy, Z.Z.; Abbas, E.M.; Khafage, A.R.; Galal-Khallaf, A.; Ismail, R.F.; Ahmed, H.O.; Mohammed-Geba, K.; Kato, M. 2017. Descriptive analysis, DNA barcoding and condition index of Penaeids (Crustacea: Decapoda) from the Egyptian Mediterranean coast. **Fisheries Research**, 188: 6–16.
- Smith, S.I., 1869. Notice of the Crustacea collected by Prof. C.F. Hart on the coast of Brazil in 1867. **Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences**, 2: 1-41.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, 22(21): 2688 – 2690.
- Stanhope, M.J.; Connelly, M.M.; Hartwick, B. 1992. Evolution of a crustacean chemical communication channel: behavioral and ecological genetic evidence for a habitat-modified, race-specific pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, 18: 1871–1887.
- Stireman, J.O.; Nason, J.D.; Heard, S.B. 2005. Host-associated genetic differentiation in phytophagous insects: general phenomenon or isolated exceptions? Evidence from a goldenrod-insect community. **Evolution**, 59: 2573–2587.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123(3): 585-595.
- Talavera, G. & J. Castresana. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, 56(4): 564-577.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28(10): 2731 – 2739.
- Tavares, C.; Gusmão, J. 2016. Description of a new Penaeidae (Decapoda: Dendrobranchiata) species, *Farfantepenaeus isabelae* sp. Nov. **Zootaxa**, 4171(3): 505-516.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22(22): 4673 - 4680.
- Titus, B.M.; Daly, M. 2015. Fine-scale phylogeography reveals cryptic biodiversity in Pederson's cleaner shrimp, *Ancylomenes pedersoni* (Crustacea: Caridea: Palaemonidae), along the Florida Reef Tract. **Marine Ecology**, 36(4): 1379-1390.

## Carvalho-Batista, A. 2017

- Trontelj, P.; Fiser, C. 2009. Cryptic species should not be trivialized. **Systematics and Biodiversity**, 7: 1–23.
- Turchetto-Zolet, A.C.; Segatto, A.L.A.; Turchetto, C.; Palma-Silva, C.; Freita, L.B. 2013. **Guia Prático para estudos Filogeográficos**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 105pp.
- Voloch, C.; Solé-Cava, A.M. 2005. Genetic structure of the sea-bob shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller, 1862; Decapoda, Penaeidae) along the Brazilian southeastern coast. **Genetics and Molecular Biology**, 28(2): 254-257.
- Wake, D.B.; Roth, G.; Wake, M. 1983. On the problem of stasis in organismal evolution. **Journal of Theoretical Biology**, 101(2): 211-224.
- Ward, R.D. 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology Resources**, 9: 1077–1085.
- Waugh, J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays**, 29(2): 188–197.
- Wieman, A.C.; Berendzen, P.B.; Hampton, K.R.; Jang, J.; Hopkins, M.J.; Jurgenson, J.; McNamara, J.C.; Thurman, C.L. 2013. A panmictic fiddler crab from the coast of Brazil? Impact of divergent ocean currents and larval dispersal potential on genetic and morphological variation in *Uca maracoani*. **Marine Biology**, 161: 173–185.
- Williams, S.T.; Reid, D.G. Speciation and diversity on tropical rocky shores: a global phylogeny of snails of the genus *Echinolittorina*. **Evolution**, 58(10): 2227-2251.
- Xia, X.; Xie, Z.; Salemi, M.; Chen, L.; Wang, Y. 2003. An index of substitution saturation and its application. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 26(1): 1-7.