

**ANA LETÍCIA GUERRA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ESTRUTURA  
GENÉTICA DE POPULAÇÕES E ESPÉCIES DE  
CAMARÕES PALEMONÍDEOS DO GÊNERO  
*Macrobrachium***

**Dissertação apresentada para  
obtenção do Título de Mestre  
em Genética.**

ANA LETÍCIA GUERRA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ESTRUTURA GENÉTICA DE  
POPULAÇÕES E ESPÉCIES CAMARÕES PALEMONÍDEOS DO GÊNERO  
*Macrobrachium*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, área de concentração em Genética Animal e Evolução, junto ao programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, SP.

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Castiglioni

São José do Rio Preto, SP  
2011

Guerra, Ana Letícia.

Caracterização molecular da estrutura genética de populações e espécies de camarões palemonídeos do Gênero *Macrobrachium*/ Ana Letícia Guerra. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

53 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: LÍlian Castiglioni-Ruiz

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética animal. 2. *Macrobrachium*. 3. Variabilidade genética. 4. Palemonídeo – Estrutura molecular. 5. Camarão. I. Castiglioni-Ruiz, LÍlian. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 595.384

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

**Ana Letícia Guerra**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ESTRUTURA GENÉTICA DE  
POPULAÇÕES E ESPÉCIES DE CAMARÕES PALEMONÍDEOS DO GÊNERO  
*Macrobrachium***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Titulares:

Profa. Dra. Lílian Castiglioni

(Presidente e Orientadora)

Prof. Dr. Fabiano Gazzi Taddei

Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Suplentes:

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Prof. Dr. Irlan Leite de Abreu

São José do Rio Preto, 05/08/2011.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, junto ao Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) e no Laboratório de Biologia Celular, junto ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE), com auxílio financeiro da CAPES e FAPESP.

Dedico esta minha conquista...

À Deus que sempre me orientou e me iluminou para que pudesse, com todas as dificuldades atingir o meu objetivo. E a todos que amo, pelo carinho, amor e compreensão.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de  
água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota!"

Madre Tereza de Calcutá.

## *Agradecimentos*

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lílian Castiglioni, pela orientação durante quase cinco anos em que fui sua aluna, e principalmente, por ter me confiado à execução desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da minha bolsa de mestrado.

À Direção do IBILCE/UNESP e ao Departamento de Biologia, que forneceram as condições necessárias que permitiram a conclusão deste trabalho, e aos funcionários, que sempre me auxiliaram quando necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE), em especial a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lílian Madi Ravazzi atual coordenadora do programa, por todo seu incentivo.

Aos Professores da Pós-Graduação em Genética pelo conhecimento transmitido.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia M. A. Carareto pelo espaço cedido em seu laboratório e pelas sugestões e colaborações valiosas.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira por ter me acolhido em seu laboratório com muita paciência e compreensão, além de todo apoio durante todo trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mary Massumi Itoyama pela colaboração de sempre.

Ao Prof. Dr. Fabiano Gazzi Taddei, que contribuiu com as coletas dos exemplares utilizados neste trabalho, ajuda sem a qual esse trabalho não poderia ter sido realizado.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia de Freitas (UFSCAR) pela disponibilidade de seu laboratório, pela ajuda e sugestões que permitiram a conclusão deste estudo.

Ao pós-doutorando Márcio César Chiachio pelo incentivo e colaboração com as análises estatísticas do presente trabalho.



A todos os amigos do Curso de Pós-Graduação, pela convivência e apoio tanto nos momentos mais difíceis quanto nas horas de alegria.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Celular.

À companheira e amiga Leliane Silva Commar, agradeço pela dedicação ao trabalho, por te me permitido evoluir juntamente com você no mundo acadêmico e pessoal, por meio de nossas trocas de experiências e sugestões. Obrigada pela cumplicidade por tudo que passamos juntas e pela valiosa amizade conquistada e por todo apoio que concedeu a realização deste trabalho.

A amiga Priscila Pasquetto Mendonça agradece pelo agradável convívio, por ter se tornado uma amiga inigualável e que sempre me acalmava nos momentos de stress , e também, por estar sempre presente.

As amigas Lucilene Regina Maschio, Rosana Silistino de Souza, Paula de Freitas Curi, pelo apoio em todos os momentos, aconselhando indicando o melhor caminho a ser seguido.

Ao Laboratório de Evolução Molecular de Insetos. E as alunas: Adriana e Elaine agradeço a paciência, a disposição de sempre em me auxiliar, os ensinamentos e a amizade.

Aos Estagiários do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Veterinário (UNIRP), e a colega Natália Padovan, bióloga responsável pelo biotério, agradeço por sua disponibilidade de sempre, pelo apoio e compreensão.

A todas as minhas amigas que participaram ativamente de todos os momentos desta etapa de minha vida, sempre colaborando e me incentivando.

Agradeço a toda minha família, principalmente meus pais e meu irmão pela paciência e apoio incondicional.

Ao meu namorado, Guilherme Nogueira Barbosa, pelo amor, carinho e incentivo, por estar sempre ao meu lado, acreditar em mim e por estar presente em todos os momentos da minha vida. Obrigada por tudo!

A todos que, esquecidos aqui, contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração desta dissertação.

## SUMÁRIO

### LISTA DE ABREVIACES

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>I. INTRODUO</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>III. MATERIAL E MTOD</b> .....	12
1. Obteno das amostras .....	12
2. Extrao de DNA.....	12
3. Reaes em cadeia da polomerase (PCR) .....	17
3.1. Sequncias COI .....	17
3.2. Sequncias 16S rRNA .....	17
4. Purificao dos fragmentos amplificados.....	19
5. Sequnciamento das regies COI e rRNA 16S .....	19
6. Anlise dos resultados .....	19
6.1. Anlise dos dados e clculo das distncias genticas.....	19
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	21
1. Sequncias COI .....	21
2. Sequncias rRNA 16S .....	27
3. Anlise conjunta das sequncias COI e rRNA 16S.....	27
<b>V. DISCUSSO</b> .....	30
<b>VI. CONCLUSES</b> .....	37
<b>VII. REFERNCIAS BIBLIOGRFICAS</b> .....	40
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	49
<b>IX. APNDICE</b> .....	53

## LISTA DE ABREVIACOES

**MaADO** – *Macrobrachium amazonicum* - Adolfo

**MjADO** – *Macrobrachium jelskii* – Adolfo

**MaCA** – *Macrobrachium amazonicum* – Caunesp (Jaboticabal)

**MaBU** – *Macrobrachium amazonicum* - Buritama

**MjBU** – *Macrobrachium jelskii* – Buritama

**MaME** – *Macrobrachium amazonicum* – Mendonça

**MjME** – *Macrobrachium jelskii* – Mendonça

**COI** – citocromo oxidase I

**rRNA 16S** – subunidade menor do RNA ribossmico

**ADO**- Adolfo

**BU**- Buritama

**ME**- Mendonça

**CA**- CAUNESP (Jaboticabal)

## RESUMO

Os camarões do gênero *Macrobrachium* pertencem à família Palaemonidae. Habitam as proximidades do litoral e, também, ambientes de água doce. Com mais de cem espécies amplamente distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, os palemonídeos possuem hábitos crípticos e noturnos. Particularmente na região noroeste do Estado de São Paulo, podemos encontrar várias espécies com importância econômica e ecológica consideráveis. Entretanto, existem poucos estudos na literatura relacionados ao conhecimento da biologia desses crustáceos. Assim, o presente trabalho objetivou analisar a variabilidade genética intra e interpopulacional, de amostras de duas espécies de camarões palemonídeos do gênero *Macrobrachium* (*M. amazonicum* e *M. jelskii*), coletadas em diferentes localidades, utilizando-se a análise das seqüências dos genes mitocondriais COI e rRNA 16S e, ainda, devido à problemática taxonômica existente entre essas duas espécies, também foi analisada a variabilidade genética interespecífica, utilizando-se os mesmos genes.. O cálculo dos índices de divergência genética intrapopulacionais apresentou valores baixos, refletindo uma provável estruturação genética destas populações. Apenas as populações de MjME e do CAUNESP apresentaram valores de divergência genética mais elevados, sugerindo um desequilíbrio na estruturação genética das mesmas, provavelmente causado por interferência antrópica e situação de cativeiro, respectivamente. Nas comparações interpopulacionais, envolvendo *M. amazonicum*, as taxas de divergência genética apresentaram uma ampla variação, também com média elevada. Os valores elevados nas comparações envolvendo a população do CAUNESP, permitiram descartar a hipótese da provável origem comum das populações de *Macrobrachium*, a partir de espécimes trazidos do Pará. Da mesma forma, as comparações interpopulacionais envolvendo *M. jelskii* também apresentaram valores de divergência elevados, principalmente para a população coletada na Represa de Mendonça, cujo desequilíbrio genético na sua estruturação populacional, foi atribuído à introdução freqüente de espécimes exóticos à esta região. Os valores de divergência genética interespecíficos nas amostras coletadas na mesma localidade geográfica foram baixos para as populações de Adolfo (0,3%), e de Buritama (0,5%), condizente com a presença de uma única espécie, híbridos interespecíficos ou metapopulações. Para as amostras coletadas em Mendonça a taxa de divergência interespecífica foi elevada (5,5%), o que já seria esperado em um ambiente que tem sofrido muita interferência antrópica, alterando da variabilidade e a estrutura genética dessas espécies. A análise dos dendogramas não evidenciou a formação de *clusters*, o que confirmou a existência de perturbações na estrutura genética das amostras analisadas. Os

dados genéticos obtidos a partir das amostras em Mendonça, principalmente para *M. jelskii*, mostram claramente que se trata de um ambiente severamente perturbado, por interferência antrópica, que tem alterado a variabilidade e a estrutura genética dessas populações e espécies. Esses resultados indicam a necessidade de maiores cuidados com relação à genética da conservação não apenas das espécies em estudo, mas das demais espécies que habitam essa região.

**Palavras-Chave:** *Macrobrachium*; palemonídeos; polimorfismo genético; variabilidade genética; marcadores moleculares COI, marcadores moleculares rRNA 16S.

## ABSTRACT

The genus *Macrobrachium* (Bate, 1868) belongs to the Palaemonidae family. Their species are widely distributed in lakes, floodplains and rivers in tropical and subtropical regions of South America, having cryptic and nights habits. This genus presents nearly 210 known species with ecological and economic importance. Particular in the northwestern state of São Paulo, we can find several species with considerable importance. However, there are few studies related to knowledge of the biology of these crustaceans. The aim this work was to analyze the genetic variability interpopulation, and interspecific of two *Macrobrachium* species (*M. amazonicum* and *M. jelskii*), using the mitochondrial gene sequence COI and 16S rRNA. Also, due to taxonomic problems between these two species we analyzed interspecific genetic variability, using the same genes. The intrapopulation rates of genetic divergence values were low, reflecting a probable genetic structure of these populations. Only populations MjME and CAUNESP showed higher divergence values, suggesting changes in their genetic structure of the same, probably caused by human interference and situation of captivity, respectively. In comparisons inferences involving *M. amazonicum*, rates of genetic divergence showed a wide range, also with high average. High values in comparisons involving the population of CAUNESP, allowed to reject the hypothesis of a probable common origin of populations the *Macrobrachium* specimens brought from State of Para. Interpopulation comparisons involving *M. jelskii* also showed high values of divergence, especially for the population collected from the Mendonça dam, whose genetic alteration in population structure was attributed to the frequent introduction of exotic specimens. The values of interspecific genetic divergence in the samples collected in the same geographic location were low for populations Adolfo (0.3%), and Buritama (0.5%), consistent with the presence of a single species, interspecific hybrids or metapopulation. For samples collected from the Mendonça dam interspecific divergence rate was high (5.5%), as could be expected in an environment that has suffered a intensive human interference, altering the genetic structure and variability of these species. Dendrogram analyses did not reveal the formation of *clusters*, confirming the existence of disturbances in the genetic structure of the samples. Genetic data obtained in the samples from the Mendonca dam, especially for *M. jelskii*, clearly showed that this is an environment severely disturbed by human interference, which has altered the genetic structure and variability of these populations and species. These results indicate the need for greater care with regard to genetics and conservation selected not only to the species studied, but also to other species that inhabit this region.

**Keywords:** *Macrobrachium*; crustacean; genetic polymorphism, genetic variability, molecular markers COI, 16S rRNA markers.



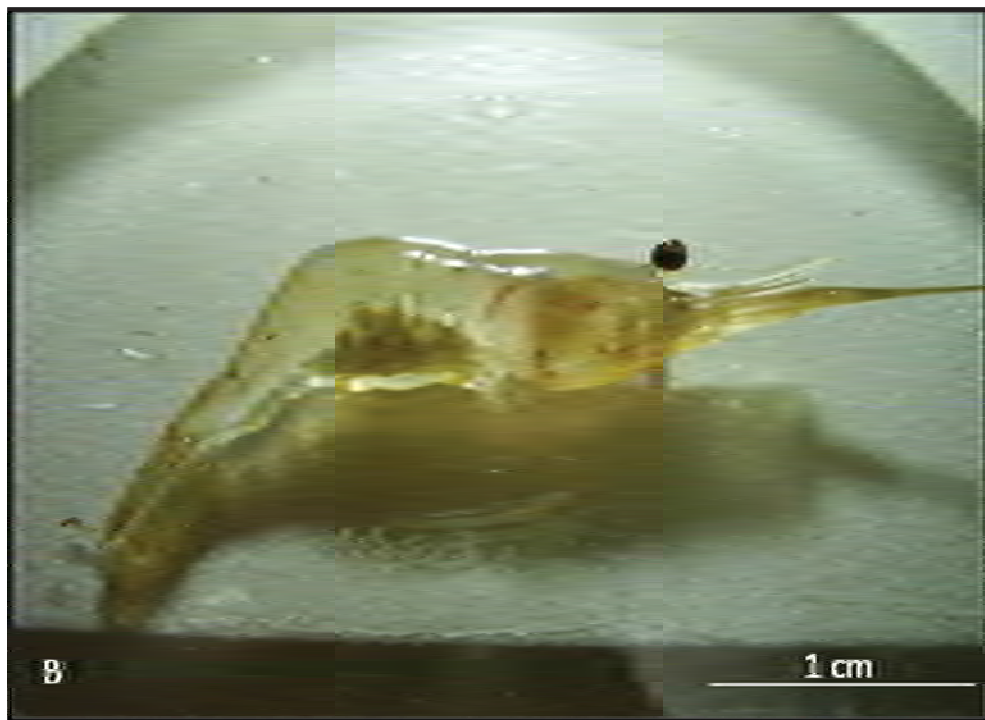
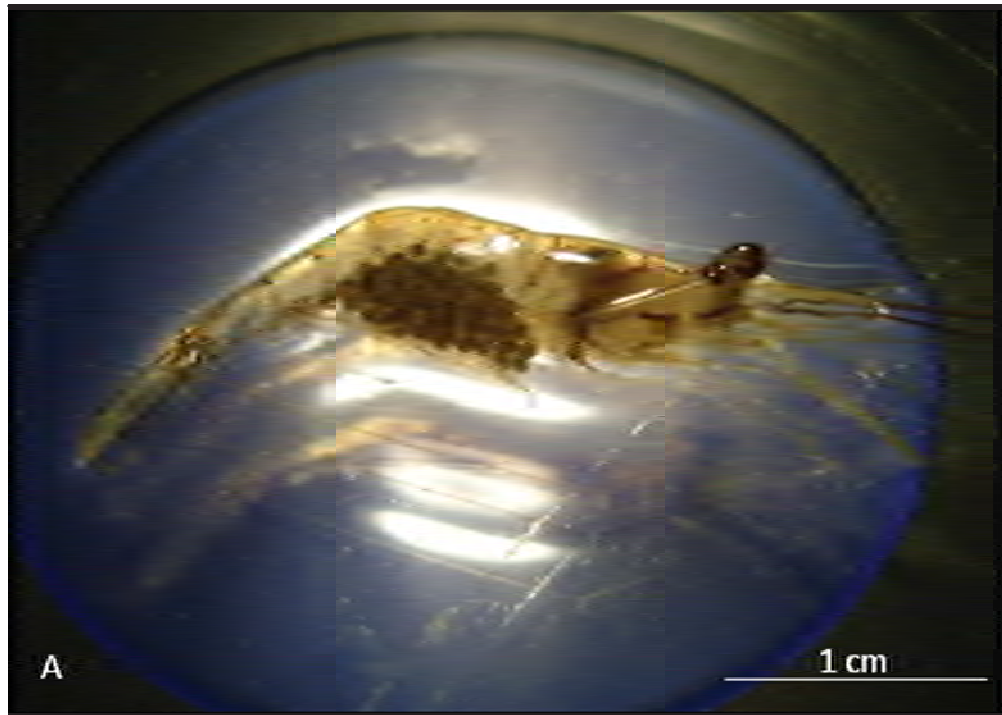
## I. INTRODUÇÃO

Os camarões de água doce do gênero *Macrobrachium*, Bate, 1868, pertencem à Família Palaemonidae, considerada atualmente a maior família da Ordem Decapoda (MAGALHÃES, 2000). Os representantes desse gênero são importantes componentes de ecossistemas de água doce e estuarinos, com ampla distribuição geográfica nas áreas tropicais e subtropicais do mundo (PEREIRA et al., 2002; SHORT, 2004). Apresentam hábitos crípticos, com maior atividade no final da tarde e à noite, permanecendo no período diurno em abrigos formados por fendas, buracos ou raízes e folhas submersas (MOSSOLIN; BUENO, 2003).

Muitas espécies deste gênero completam todo o ciclo de vida em água doce. Nestes organismos, o desenvolvimento larval é do tipo abreviado, com supressão dos estádios livres-nadante (náuplio e zoea). Como os ovos já eclodem em fase de pós-larva, são menos numerosos e possuem um volume maior em função da dimensão do embrião e da presença de substâncias nutritivas em quantidade suplementar (VALENTI, 1998).

As espécies desse gênero possuem um valor econômico considerável, pois constituem fontes de proteína animal para a dieta humana e, também, são muito utilizados como iscas vivas na prática de pesca esportiva (REIS et al., 2004). Entre elas, podemos destacar *M. jelskii* e *M. amazonicum*, objetos de presente estudo (Figura 1).

Além dos fatores econômicos, podemos destacar a importância dos mesmos nos ecossistemas aquáticos, onde atuam como predadores de peixes e de outros invertebrados, ou como presas de alguns insetos, peixes, aves, répteis e mamíferos (PORTO, 1998; MAGALHÃES, 2000; MAGALHÃES et al., 2005; GUERRA et al., 2010).



**FIGURA 1.** Espécies de camarões palemonídeos analisadas no presente estudo. **A.** *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) **B.** *M. jelskii*. (Fonte: Arquivo Pessoal).

Segundo Magalhães (2000) espécies que habitam diferentes ambientes, como as do gênero *Macrobrachium*, apresentam particularidades adaptativas quanto aos seus aspectos morfológicos, fisiológicos e de padrões comportamentais que podem torná-los objetos de muitos estudos. Entretanto, pouco se sabe a respeito da biologia desses organismos, uma vez que os trabalhos encontrados na literatura abordam, principalmente, aspectos ecológicos e do manejo de espécies com potencial comercial.

Ainda segundo Magalhães, o esforço de coleta da fauna de decápodes dulcícolas, ao contrário dos marinhos, é esporádico e o conhecimento nesta área ainda depende, em grande parte, das informações de trabalhos antigos. As coletas e pesquisas concentraram-se na região leste do Estado de São Paulo, entretanto pouco se conhece a respeito das bacias das regiões sul, central e oeste. É imprescindível a realização de estudos nestas áreas geográficas, tendo em vista as modificações ambientais já verificadas em várias bacias e sub-bacias, os problemas de poluição e deterioração de ecossistemas aquáticos, eventuais impactos causados pela presença de espécies exóticas e potencial de aproveitamento comercial de algumas espécies.

Assim, podemos afirmar que os organismos objetos do presente estudo, embora comercialmente importantes, ainda são muito pouco conhecidos quanto às suas características biológicas e genéticas, em particular, sendo fundamental esse tipo de abordagem, inclusive, para o sucesso do seu cultivo e também para o conhecimento do impacto ecológico causado pela presença do mesmo, conseqüência da intervenção humana.

Em uma revisão sobre a fauna de decápodes de água doce no Brasil, Melo (2003) afirma que o conhecimento destes organismos encontra-se em estágio inicial e ainda incompleto, destacando as prováveis causas para esta situação como sendo a grande extensão territorial do país e o pequeno número de trabalhos relacionados a estes invertebrados de água doce.

Vários autores reforçam a necessidade do conhecimento da biologia desses crustáceos e afirmam que estudos dessa natureza poderiam auxiliar na elucidação da rota de migração desses organismos e monitorar a introdução de espécies novas em populações naturais, prevendo, inclusive, desequilíbrios ecológicos e ambientais como conseqüência direta desses fatores (LORENZON; FRANCESE; FERRERO, 2000; LORENZON; GIULIANINI; FERRERO, 2002; MAGALHÃES et al., 2005).

Taddei (2006) estudou a biologia populacional, reprodutiva e de crescimento em duas espécies de camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* (*M. jelskii* e *M. brasiliense*),

coletados na região noroeste de São Paulo, na tentativa de elucidar estes aspectos e contribuir para o entendimento da biologia desses organismos. Um fato importante, observado por Taddei e reforçado por Magalhães et al. (2005), é a dificuldade na classificação taxonômica de algumas espécies de *Macrobrachium*, com base apenas em características morfológicas, pois, inclusive, os dados da literatura que abordam essa problemática são inexistentes até o momento.

Estudos taxonômicos com o gênero *Macrobrachium* são dificultados pelo restrito número de caracteres disponíveis para a identificação das espécies, uma vez que estas são bastante similares quanto à forma geral do corpo (QING-YI; QI-QUN; WEI-BING, 2009). Tais dificuldades são mais evidentes entre *M. amazonicum* e *M. jelskii*, os quais apresentam muitas semelhanças morfológicas conservadas, que dificultam a identificação dos mesmos e, ainda, este fato pode ser agravado por tratarem-se de espécies sintópicas, ou seja, são coletadas juntas, no mesmo instrumento de coleta.

Atualmente, a classificação taxonômica mais utilizada para essas espécies é a descrita por Melo (2003):

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea

Classe Malacostraca

Subclasse Eumalacostraca

Superordem Eucaridea

Ordem Decapoda

Subordem Pleocyemata

Infraordem Caridea

Família Palaemonidae

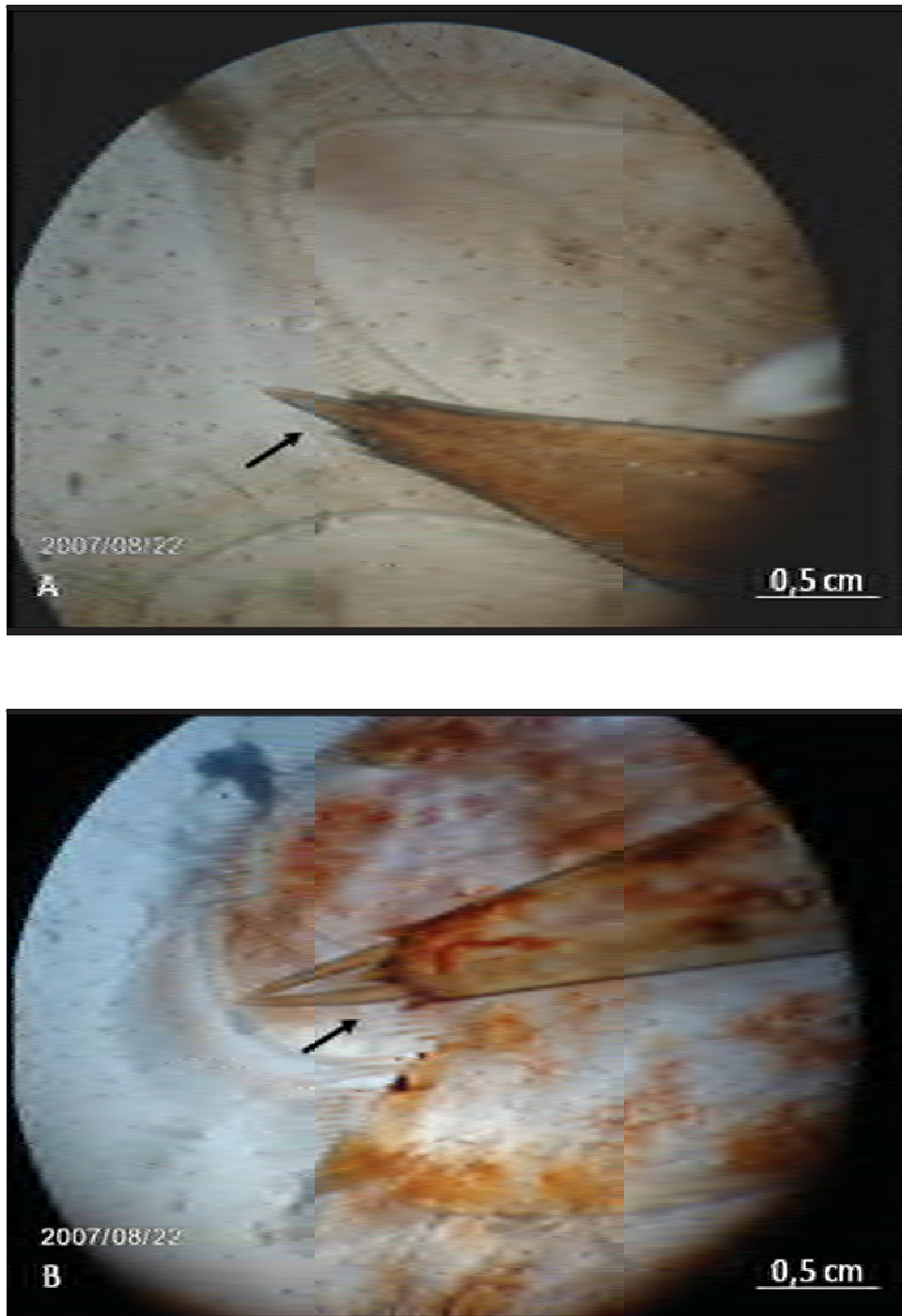
Subfamília Palaemoninae

Gênero *Macrobrachium*

Espécies: *Macrobrachium jelski* e *M. amazonicum*.

De acordo com MELO (2003) a identificação dessas espécies é baseada na observação dos seguintes aspectos morfológicos (Figura 2): a) *M. amazonicum*: na parte final do telson, o cerdo central é maior e os cerdas laterais geralmente são menores; b) *M. jelskii*: na parte final do telson, o cerdo central é menor e os laterais são um pouco maiores. Contudo, tais características são difíceis de serem visualizadas, devido ao pequeno tamanho dos indivíduos e das estruturas anatômicas consideradas, e, ainda, essa situação agrava-se pelo fato de serem

espécies sintópicas, e nas formas jovens e imaturas tais características serem ainda mais diminutas. Esses fatores, inclusive, levantam algumas hipóteses quanto ao fato de tratarem-se de apenas uma espécie, metapopulações ou, ainda, híbridos interespecíficos (TADDEI, 2006).



**FIGURA 2.** Aspectos morfológicos utilizados na identificação taxonômica das espécies estudadas no presente trabalho. **A.** *Macrobrachium amazonicum*: a seta indica o cerdo central maior na porção final do télson. **B.** *M. jelskii*: a seta indica os

cerdos laterais maiores do que o central, na porção final do telson. (Fonte: Arquivo Pessoal).

Mas como já mencionado, dados bibliográficos que esclareçam essas dúvidas, infelizmente, ainda são escassos.

Segundo Magalhães et al. (2005), *M. amazonicum* e *M. jelskii* apresentam distribuição geográfica semelhante ao longo da América do Sul (da Venezuela até o Norte do Brasil), incluindo, também, as bacias dos rios Orinoco, Amazonas, baixo Paraná, no Nordeste e Sudeste do Brasil, incluindo o Estado de São Paulo. Particularmente neste Estado, a introdução dessas duas espécies pode ter sido causada acidentalmente, por interferência humana, provavelmente na década de 70.

Este fato, juntamente com as severas intervenções antropogênicas, as quais têm atingido as bacias hidrográficas do Estado de São Paulo, estão modificando rapidamente a biota aquática, trazendo sérias conseqüências ecológicas e genéticas para estas espécies (MACHADO, 1966; TORLONI et al., 1993; GUERRA et al., 2010).

Contudo, mesmo conhecendo essa problemática, ainda não existem trabalhos na literatura que relatem os impactos ambientais, os problemas econômicos ou mesmo as possíveis alterações na estrutura genética desses organismos, relacionadas à introdução dos mesmos em um ambiente diferente.

Neste contexto, estudos de polimorfismos genéticos que determinam a estrutura genética de populações e espécies, utilizados para auxiliar a compreensão de fenômenos evolutivos, demográficos ou ecológicos, são muito importantes para a conservação destes grupos e constituem um campo fundamental dentro da Genética de Populações e da Conservação (EIZIRIK, 1996).

Com os avanços metodológicos em biologia molecular, a obtenção de dados moleculares vem se tornando mais uma importante ferramenta na busca de resolução das relações filogenéticas complexas, em que apenas o uso de dados morfológicos não é suficiente. Além disso, tais metodologias podem ser bastante úteis para delinear efetivamente limites entre linhagens e/ou espécies, assim como no estudo de relações intra e interespecífica (MEYER, 1997; LIU et al., BAKER et al., 2008).

Particularmente no presente estudo, as espécies em questão são muito promissoras para o campo da genética da conservação, uma vez que são organismos introduzidos em nossa região. Em decorrência disso, análises genéticas moleculares que elucidem aspectos da biologia das mesmas são relevantes para o manejo e conservação desses organismos, pois



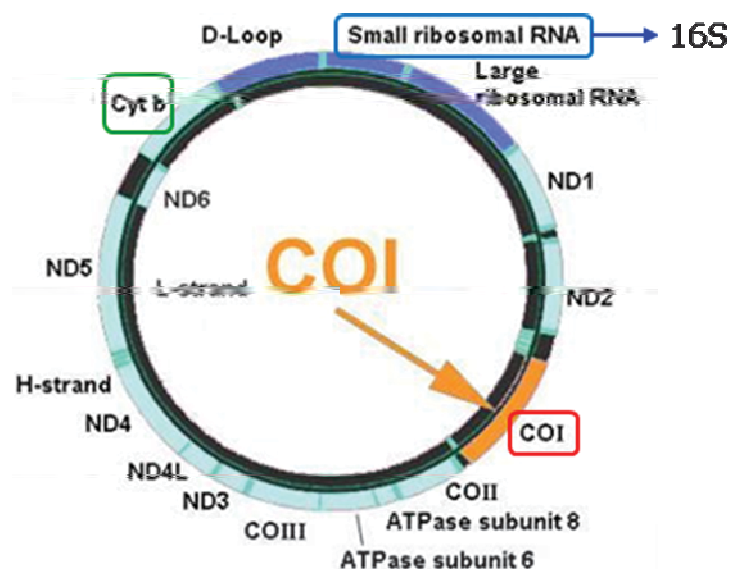
podem fornecer dados relacionados ao efeito do fundador na introdução das mesmas, a ocorrência da depressão endogâmica e suas conseqüências para a reprodução, sobrevivência e adaptações a novos ambientes, para avaliar o potencial evolutivo desses camarões e, inclusive, auxiliar na resolução de incertezas taxonômicas, como é o caso de *M. amazonicum* e *M. jelskii* (FRANKHAM et al., 2002; QING-YI; QI-QUN; WEI-BING, 2009; GUERRA et al., 2010).

Assim, com base na importância econômica e ecológica destas espécies, na ausência de trabalhos esclarecedores que abordem a biologia das mesmas, e no fato de se tratarem de espécies sintópicas e muito semelhantes morfológicamente, no presente estudo, foram utilizados os marcadores mitocondriais da subunidade I do citocromo oxidase (COI) e rRNA 16S, como ferramentas moleculares para ampliar o conhecimento biológico, genético e evolutivo dos camarões dulcícolas *M. amazonicum* e *M. jelskii*.

O genoma mitocondrial contém uma valiosa informação genética, amplamente utilizada em estudos que abordem as relações filogenéticas entre espécies, em genética de populações e caracterização da variabilidade genética intra e interespecíficas (AVISE, 1994; AVISE, 2000; CHANDRA et al., 2006; COOK et al., 2008; QING-YI; QI-QUN; WEI-BING, 2009; VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011).

O DNA mitocondrial animal é uma molécula de fita dupla circular que codifica, aproximadamente, 5% de toda maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria. O conteúdo em termos de genes é extremamente conservado. Contudo, algumas diferenças são relatadas quando são comparados organismos que divergiram há muito tempo (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001). Outras características particulares tornam essa molécula uma ferramenta molecular importante para estudos de caracterização de populações, subespécies e espécies, além de estudos de caráter evolutivo e filogenético, tais como: o fato de ser citoplasmática, não seguindo os padrões mendelianos de segregação e não sofrendo recombinação; apresenta herança materna; possui uma taxa de mutação relativamente rápida, o que pode ser resultado da ausência de mecanismos de reparo durante a replicação; conteúdo gênico conservado (apenas 37 genes); estrutura gênica simples (não possui DNA repetitivo, transposons, íntrons ou pseudogenes) e, ainda, apresenta alta taxa de evolução por mutação de cinco a dez vezes superior a um gene de cópia única nuclear (BROWN, 1985; MORITZ et al., 1987; HARRISON, 1989; CORNELI; WARD, 2000; WILSON et al., 2000; DINIZ, 2005; LIU et al., 2007; BAKER et al., 2008; QING-YI; QI-QUN; WEI-BING, 2009; VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011).

O DNAm (Figura 3) possui genes codificadores para duas subunidades ribossômicas (12S e 16S), vinte e dois RNAt, três subunidades da enzima citocromo c oxidase (COI, COII e COIII), citocromo B (cytB), subunidades 6 e 8 de ATP F0 sintase (ATP6 e ATP8) e sete subunidades da NADH desidrogenase (ND1-ND6 e ND4L). Além de todos esses genes, há uma região rica em AT (em vertebrados, é chamada D-loop), não-codificadora e que parece conter o controle da replicação e transcrição do DNAm (WOLSTENHOLME, 1992). O tamanho dessa região exibe grande variação entre os organismos, que ao contrário dos genes, se apresentam similares em tamanho em uma ampla gama de espécies, entre invertebrados e vertebrados, sendo, muitas vezes, detectado polimorfismos de tamanhos a nível interespecífico (BROWN,1985; MORITZ et al., 1987).



**FIGURA 3.** Genoma mitocondrial com aproximadamente 17 Kb. A seta indica a posição do gene da citocromo oxidase subunidade I (COI). (Barcodes of Life).

O gene mitocondrial da subunidade I do citocromo oxidase (COI) sintetiza uma enzima de mesmo nome. Esta seqüência do DNA mitocondrial é parte de um complexo gênico codificante de proteínas transmembranas, envolvidas no transporte elétrico e catálise da cadeia respiratória de organismos eucariotos. Este gene vem sendo alvo de estudos populacionais de variabilidade genética e de relações filogenéticas por apresentar regiões variáveis suficientes para análises de grupos taxonomicamente relacionados pela sua



universalidade e importância evolutiva (SIMON et al., 1994; AYALA et al., 1996; DOBLER; MULLER, 2000; SAHLS; NYBLOM, 2000; SCARPASSA et al., 2000; NELSON; COX, 2006).

Em crustáceos decápodes, Qing-Yi e colaboradores (2009) utilizaram as seqüências do gene mitocondrial COI para compreender as diferenças genéticas moleculares em três espécies de camarões do gênero *Macrobrachium* (*M. rosenbergii*, *M. nipponense* e *M. qilianensis*), e obter a provável relação filogenética entre elas e entre outros camarões palemonídeos. A partir da amplificação, seqüenciamento e alinhamento das seqüências COI, foram encontrados sete haplótipos, os quais mostraram uma distância genética que variou de 19,87% a 23,84%. Esses resultados permitiram a separação desses camarões em três espécies distintas, conforme esperado. Entretanto, quando as mesmas seqüências foram alinhadas com outras espécies de camarões palemonídeos, a árvore filogenética obtida evidenciou que *M. nipponense* e *M. rosenbergii* constituem um grupo monofilético, juntamente com outras espécies de *Macrobrachium*, com exceção de *M. qilianensis*, que parece não pertencer a este gênero. Os autores sugerem que o *status* taxonômico de *M. qilianensis* deve ser revisto utilizando-se outras metodologias que possam elucidar essa questão.

De fato, o gênero *Macrobrachium* apresenta diversas dificuldades taxonômicas. Em um trabalho pioneiro para as espécies *M. amazonicum*, *M. brasiliense* e *M. jelskii*, Guerra et al. (2010), utilizaram dez *primers* decaméricos RAPD-PCR para obter marcadores moleculares que permitissem caracterizá-las geneticamente e identificá-las, uma vez que existem dificuldades de classificação das mesmas, com base apenas em caracteres morfológicos. Esta problemática é mais evidente entre *M. amazonicum* e *M. jelskii*, as quais são sintópicas e muito semelhantes morfológicamente. Dos 182 fragmentos obtidos, três permitiram a identificação destas espécies. Entretanto, a árvore filogenética evidenciou uma alta proximidade entre *M. amazonicum* e *M. jelskii*, o que pode indicar, ainda, a formação de híbridos interespecíficos ou metapopulações. A baixa diferenciação genética entre *M. amazonicum* e *M. jelskii* foi atribuída à recente introdução das mesmas nas regiões amostradas. Segundo estes autores, outros estudos devem ser realizados, a fim de esclarecer esta intrigante questão envolvendo estes crustáceos.

Outro marcador molecular utilizado no presente estudo, o gene rRNA 16S (*Small Subunit Ribosomal RNA*), é um gene estrutural não codificante, cuja combinação de regiões variáveis e conservadas tornou-o uma importante ferramenta para a reconstrução filogenética. Sua análise molecular tem permitido tanto o estudo de relações filogenéticas antigas, quanto

eventos recentes (SCHUBART et al., 2000; LIU et al., 2007; CHEN et al., 2009). A popularidade desse gene se deve também ao sucesso de seu uso em estudos filogenéticos em decápodes, em que sua porção conservada mostrou-se um marcador interespecífico eficaz (MANTELATTO; ROBLES; FELDER, 2007). Além disso, o grande número de *primers* disponíveis para as análises moleculares em invertebrados também são atrativos para o uso deste gene (SCHUBART et al., 2000). Entretanto, em diversos trabalhos com crustáceos decápodes, a taxa de divergência das seqüências COI mostrou-se relativamente maior que a 16S (DANIELS, 2003; HARRISON, 2004; FRANCISCO; GALETTI JUNIOR, 2005; LIU et al., 2007; VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011).

Mantellato e colaboradores (2007) utilizaram o gene rRNA 16S para estudar aspectos filogenéticos do gênero *Portunus*, um crustáceo marinho, que apresentam dificuldades de identificação taxonômicas, devido à alta semelhança morfológica dos adultos. Das 14 espécies analisadas, apenas 12 mostraram tratar-se de espécies distintas, com suas respectivas classificações taxonômicas reconhecidas como válidas. Os autores ressaltaram, ainda, que provavelmente este gênero não é monofilético e que é necessária a realização de uma revisão taxonômica detalhada, a fim de se esclarecerem as questões relacionadas à filogenia.

Assim, podemos afirmar que o organismo objeto do presente estudo, embora comercialmente importante, ainda é muito pouco conhecido quanto às suas características biológicas e genéticas, em particular, sendo fundamental esse tipo de abordagem, inclusive, para o sucesso do seu cultivo e também para o conhecimento do impacto ecológico causado pela presença do mesmo, conseqüência da intervenção humana.

## II. OBJETIVOS

Diante da problemática taxonômica existente no Gênero *Macrobrachium*, o presente trabalho pretende analisar a variabilidade genética destas espécies, devido à importância econômica e ecológica das mesmas, à pequena quantidade de estudos direcionados ao conhecimento biológico desses organismos e, ainda, ao fato de serem espécies introduzidas acidentalmente em nossa região, sintópicas e com dificuldades taxonômicas de identificação com base em caracteres morfológicos.

Assim, como Objetivos Geral e Específicos, pretende-se:

### 1. Objetivo Geral:

- Estudar a variabilidade genética de duas espécies de camarões de água doce, pertencentes ao gênero *Macrobrachium* (*M. amazonicum* e *M. jelskii*).

### 2. Objetivos Específicos:

- Analisar a variabilidade genética intra, interpopulacional e interespecífica das seqüências dos genes mitocondriais COI e rRNA 16S, amostradas em diferentes localidades;
- Analisar os aspectos filogenéticos entre *M. amazonicum* e *M. jelskii*, com base na análise destas seqüências e obter subsídios que permitam compreender melhor as questões taxonômicas existentes entre as mesmas.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Obtenção das amostras

As amostras de *M. amazonicum* (Ma) e *M. jelskii* (Mj), analisadas no presente estudo, foram coletadas em quatro localidades, conforme consta na Tabela 1. Todos os pontos de coleta pertencem à hidrografia do Rio Tietê (ANEXO 1). A amostra obtida no Centro de Aqüicultura da UNESP/Campus de Jaboticabal, SP, foi incluída no presente estudo, por tratar-se de uma população cultivada, sendo sua matriz estuarina situada na cidade de Belém do Pará (VALENTI, comunicação pessoal), constituindo, provavelmente, a população ancestral, a partir da qual as populações do Noroeste do Estado de São Paulo teriam sido derivadas.

Como *outgroup* foi utilizada a espécie *Potimirim glabra* (Pg), Holthuis, 1954, a qual foi coletada em Ubatuba, SP, (23°26'13"S; 45°04'08"W), e mostrou-se eficiente para esta finalidade, em estudos realizados anteriormente (Figura 4; GUERRA et al., 2010). As espécies pertencentes a este Gênero encontram-se distribuídas nas Américas do Norte, Central e do Sul (BARROS; FONTOURA, 1996). No Brasil, são registradas apenas *P. glabra*, nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina, e *P. potimirim*, nos Estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (PAIM et al., 1997; RAMOS-PORTO; COELHO, 1998; LIMA; OSHIRO, 1999; MELO, 2003).

Nas coletas foram utilizadas peneiras (2 mm de diâmetro), passadas sob a vegetação subaquática e marginal. Os animais coletados foram armazenados em caixas de isopor e, então transportados para o Laboratório de Biologia Molecular da UNIRP (Figura 5). Durante o traslado, a água das caixas foram permanentemente oxigenada com compressores de ar. No laboratório, os espécimes coletados foram identificados segundo Melo (2003). Após a identificação e a separação das espécies, as amostras foram dissecadas e congeladas, para posterior obtenção do DNA genômico.

#### 2. Extração do DNA

Para a extração do DNA e análise das seqüências COI, foram utilizados cinco adultos de cada espécie, de cada localidade, totalizando 40 espécimes. Já para o gene rRNA 16S foram utilizados três adultos de cada espécie, de cada localidade, totalizando 15 espécimes. Para este gene, não foi possível a obtenção de seqüências consistentes para análise das populações de Adolfo e do grupo externo *Potimirim glabra*. O DNA foi extraído a partir de fragmentos de músculos abdominais, os quais têm se mostrado mais eficientes para esta

finalidade, utilizando-se o *kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)*, de acordo com as instruções do fabricante (TASSANAKAJON et al., 1997; 1998; PRIOLI et al., 2002; GUERRA et al., 2010).



**FIGURA 4.** Aspectos morfológicos da espécie *Potimirim glabra*, utilizada como grupo externo, no presente estudo. (Fonte: Arquivo Pessoal).



**FIGURA 5.** Locais de coleta de *Macrobrachium jelskii* e *M. amazonicum*. **A.** Vista geral da Represa Barra Mansa, Mendonça, SP. **B.** Vista geral da Represa de Buritama, SP. **C.** Vista geral da Represa de Adolfo, SP. (Fonte: Arquivo Pessoal).

**Tabela 1.** Populações de *Macrobrachium* analisadas no presente estudo, indicando a localidade e os pontos de coleta.

<b>POPULAÇÕES</b>	<b>LOCALIDADE</b>	<b>COORDENADAS GEOGRÁFICAS</b>
ADO	Adolfo (SP)	21°14' 6" S; 49 38' 38" W
BU	Buritama (SP)	21 3' 57" S; 50 8' 49" W
ME	Mendonça (SP)	21°14'27" S; 49°56'28" W
CA	Jaboticabal(SP) CAUNESP	21° 15' 2" S; 48° 18'5" W



Após a extração, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro ND-1000 NanoDrop (*Uniscience*) para a determinação da concentração de DNA. Em seguida, 2 µl de cada amostra de DNA foram aplicados em um gel de agarose a 1% para verificar a integridade desse material.

### 3. Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

#### 3.1. Sequências COI

Os oligonucleotídeos iniciadores universais, utilizados para amplificação da região de interesse do gene mitocondrial COI, foram cedidos pelo Prof. Dr. Claudio de Oliveira, do Departamento de Ciências Biológicas (Genética), do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP, Campus de Botucatu, SP).

A sequência desejada foi amplificada utilizando-se os seguintes iniciadores universais:

- *Forward*: 5' - TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC - 3'
- *Reverse*: 5' - TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA - 3'

Para a amplificação das amostras foi preparada uma mistura de reagentes contendo: 2,5 U de Gotaq Master Mix 2X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10pmol dos *primers forward* e *reverse*, água MilleQ autoclavada e 25 ng de DNA, em uma reação final de 12,5 µl.

As reações da PCR para a amplificação do *primer* COI foram efetuadas em um termociclador *Eppendorf* e as condições para amplificação estão descritas na Tabela 2.

Após a amplificação, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a uma voltagem de 70V, por aproximadamente 2:30 h/min. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado em um transluminador UV e digitalizado. O marcador de peso molecular utilizado foi o *DNA Ladder* 1Kb (*GE Healthcare and Life Technology*).

#### 3.1. Sequências rRNA 16S

A região de interesse do gene mitocondrial 16S foi amplificado utilizando-se iniciadores universais (*primers*) descritos por KOCHER et al. (1989), com as seguintes sequências:

- *Forwrad*: 5' - ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT - 3'
- *Reverse*: 5' - CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T - 3'

Para a amplificação das amostras analisadas foi preparada uma mistura de reagentes contendo: 2,5 U de Gotaq Master Mix 2X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10pmol dos *primers forward* e *reverse*, água MilleQ autoclavada e 25 ng de DNA genômico, em uma reação final de 12,5 µl.

As reações da PCR para a amplificação do *primer* rRNA 16S foram efetuadas em um termociclador *Eppendor* e as condições para amplificação estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 2.** Condições para amplificação do marcador COI.

<b>Passo</b>	<b>Etapa do Processo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Duração</b>
1	Desnaturação inicial	95°C	2 minutos
2	Desnaturação	95°C	30 segundos
3	Anelamento	50 – 54°C	45 segundos
4	Extensão	72°C	1 minuto
5	Volta para o passo 2	-	25 vezes
6	Extensão Final	72°C	5 minutos

**Tabela 3.** Condições para amplificação do marcador 16S rRNA.

<b>Passo</b>	<b>Etapa do Processo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Duração</b>
1	Desnaturação inicial	95°C	2 minutos
2	Desnaturação	95°C	30 segundos
3	Anelamento	46 - 50°C	45 segundos
4	Extensão	72°C	1 minuto
5	Volta para o passo 2	-	25 vezes
6	Extensão Final	72°C	5 minutos

Após a amplificação, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a uma voltagem de 70V, por aproximadamente 2:30 horas. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado em um transluminador UV e digitalizado. O marcador de peso molecular utilizado foi o *DNA Ladder 1Kb (GE Healthcare and Life Technology)*.

#### **4. Purificação dos fragmentos amplificados**

Após a eletroforese, os fragmentos foram purificados utilizando-se o *kit GFX PCR DNA & Gel Band (GE Healthcare and Life Technology)*, de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da PCR foram submetidos ao seqüenciamento direto, sem a necessidade de clonagem.

#### **5. Seqüenciamento das regiões COI e rRNA 16S**

Os produtos gerados a partir da amplificação pela PCR, após a purificação, foram enviados para o seqüenciamento no Centro de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP (FCAV), Campus de Jaboticabal, SP.

A validade das seqüências obtidas foi verificada a partir dos seguintes critérios: a) Submetendo-as ao *Nucleotide-nucleotide Blast (NCBI)*; b) seqüenciando as fitas *forward* e *reverse*, para confirmação da região gênica; posteriormente, as respectivas seqüências de cada espécie foram depositadas no banco de dados NCBI.

#### **6. Análise dos Resultados**

##### **6.1. Análises dos dados e cálculo das distâncias genéticas**

As seqüências para cada indivíduo, de cada população, foram inicialmente analisadas com o software BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999). Uma seqüência consenso foi obtida para cada segmento de DNA, para cada um desses indivíduos. Para a verificação de contaminantes (DNA exógeno), quando necessário, as seqüências foram submetidas ao programa *BLAST* disponível no sítio do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Posteriormente, as seqüências de todos os indivíduos foram alinhadas utilizando-se o editor ClustalW (THOMPSON et al., 1997) acoplado ao software DAMBE (XIA; XIE, 2001). Em seguida, o alinhamento foi novamente checado no *software* BioEdit 5.0.9 (HALL, 1999) e corrigido manualmente quando necessário. A variação nucleotídica, padrões de substituição e

distâncias genéticas entre as populações foram estimadas usando o software MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

A taxa de proporção transição *versus* transversão (Ti/Tv) foi estimada usando MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), visando verificar o nível de saturação da matriz.

Para verificar se o número de transições e de transversões da matriz de dados atingiu o nível de saturação, isto é, se ocorreu mais do que uma substituição em determinados sítios, foram construídos gráficos, onde o eixo de X representa os valores das distâncias de cada par de táxons utilizados e, o eixo Y, o número de transição (TS) ou de transversão (TV) presentes em cada par. No caso de não saturação, a relação entre estes parâmetros é linear, isto é, com o aumento da distância, há o aumento do número de TS ou TV. Se houver substituições múltiplas, o gráfico atinge uma situação no qual, aumentando-se a distância, não há aumento no número de TS ou TV. Esta análise foi estimada pelo modelo Tamura-3-parâmetros, com o auxílio do programa DAMBE (XIA; XIE, 2001).

O cálculo das divergências intra e interpopulacionais das seqüências foram obtidos utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica Tamura-3-parameter (TAMURA, 2007) e uma distribuição gama (G) para modelar as variações nas taxas de substituição entre os sítios.

Estas mesmas ferramentas foram utilizadas na construção de um dendrograma baseado no método de *Neighbor-Joining* (NJ) para se obter uma representação gráfica do padrão de distribuição genética K2P com o auxílio do programa DAMBE 4.1.27 (Xia e Xie, 2001). A reamostragem por *Bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) foi aplicada para avaliar o suporte para os nós individuais (1000 repetições).

## IV. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo são baseados na análise de cinco indivíduos de cada espécie, para cada população amostrada, inclusive o grupo externo, totalizando 40 espécimes para as seqüências COI e 15 indivíduos para as seqüências do gene rRNA 16S. Para confirmar a confiabilidade das seqüências obtidas e, portanto, a inclusão das mesmas na análise, foram considerados alguns critérios de qualidade, tais como: ausência de seqüências de DNA contaminante, de inserções e/ou deleções, ou códons de parada (*stop códons*), condizentes com o fato de representarem uma seqüência codificante.

As taxas de transições/transversões (Ti/Tv) foram plotadas versus a distância genética, segundo o modelo de Kimura-2-parâmetros, para o conjunto de genes (COI e 16S rRNA), considerando como relações lineares, aquelas que possuíam o coeficiente de correlação (r) maior que 0,75. O gráfico da Figura 6 indica que não houve saturação dos nucleotídeos.

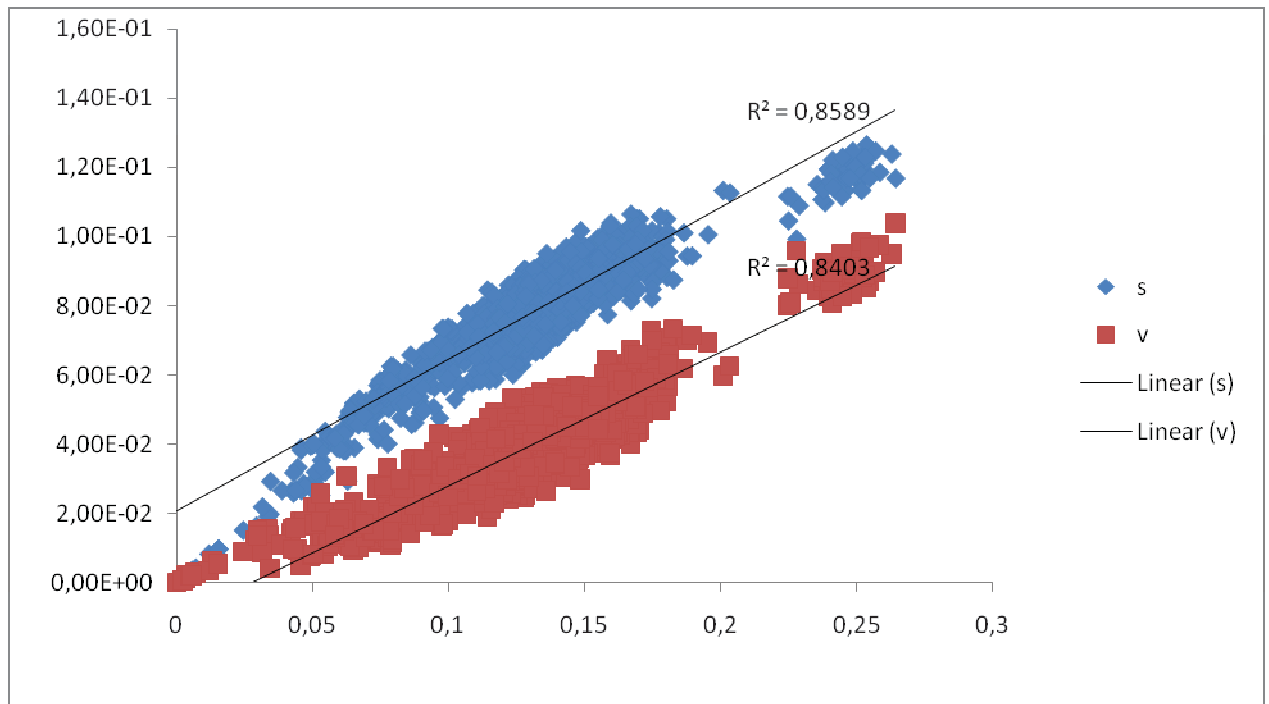
### 1. Seqüências COI

As seqüências obtidas do fragmento do gene da subunidade I citocromo oxidase (COI) apresentaram tamanhos que variaram de 590 a 715 pb, com valor médio de 680 pb. As freqüências nucleotídicas encontradas foram 0,293 (A); 0,252 (T); 0,259 (C), e 0,196 (G). A taxa total de transições/transversões obtida foi  $R = 6,58$ . Saturações correspondentes às taxas de transições/transversões não foram encontradas.

A média geral da distância genética entre todas as seqüências, de todos os indivíduos das diferentes populações foi de 6,8% (ANEXO 2).

Os cálculos de divergências genéticas intrapopulacionais variaram de 1,1 a 20%, com média de 3,5% (Tabela 4; ANEXO 3). O valor de divergência intrapopulacional não pode ser obtido para a população de MjADO, pois o seqüenciamento foi eficiente em apenas um indivíduo.

Para estes valores, as populações de MjME e Pg apresentaram altas taxas de divergência (9,3 e 11%, respectivamente). As populações de MaADO e MjBU apresentaram as menores taxas (ambas com 0,1%). Com taxas também baixas, podemos destacar, ainda, as populações de MaBU (0,9%) e MaME (1,5%). O grupo constituído pelas amostras cultivadas, oriundas do CAUNESP, também apresentou alta taxa de divergência (5,2%).



**Figura 6.** Gráfico mostrando a frequência observada de transições (s) e transversões (v) em relação à distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros. Análise combinada dos genes COI e 16S rRNA.

Com relação às taxas de divergência genética interpopulacionais, as mesmas variaram de 0,1 a 22%, com média de 7,07% (Tabela 4; ANEXO 4).

Para a espécie *M. amazonicum*, conforme observado na Tabela 4, a comparação envolvendo os grupos populacionais MaBU *versus* MaADO apresentou a menor taxa de divergência (0,6%), seguida por MaME *versus* MaADO (1,1%) e MaME *versus* MaBU (1,4%). As demais comparações envolvendo as amostras dessa espécie apresentaram altas taxas de divergência interpopulacionais: MaCA *versus* MaADO com 3,1%, MaCA *versus* MaBU com 3,5% e MaME *versus* MaCA com 4,1%.

Para as comparações interpopulacionais envolvendo *M. jelskii*, o valor de divergência genética mais baixo foi observado na comparação MjADO *versus* MjBu (0,3%). As demais comparações interpopulacionais apresentaram valores de divergência elevados (MjBu *versus* MjME com 4,7% e MjADO *versus* MjME com 5,0%).

Com relação às comparações interpopulacionais envolvendo o grupo externo Pg todas apresentaram valores de divergência genética extremamente elevados, com variação de 19,4 a 22%.

Já as comparações interespecíficas nas amostras coletadas juntas, na mesma localidade, apresentaram valores interessantes: para as amostras de Ma e Mj coletadas em Adolfo, foi encontrada uma taxa de divergência genética baixa (0,3%). O mesmo foi visualizado na comparação das duas espécies para as amostras coletadas em Buritama (0,5%). Apenas as amostras coletadas em Mendonça apresentaram altas taxas de divergências interespecíficas (5,5%).

As demais comparações interespecíficas, envolvendo diferentes localidades, apresentaram baixas taxas de divergência genéticas nos seguintes grupos: MaADO *versus* MjBU (0,1%), MaME *versus* MjBU (1,1%), e MaME *versus* MjADO (1,4%). Taxas mais elevadas foram encontradas nas comparações entre MaADO *versus* MjME (4,7%) e MaBU *versus* MjME (5,2%).

Com relação às amostras oriundas do CAUNESP, não foram realizadas análises interespecíficas, uma vez que a mesma é composta apenas por *M. amazonicum*.

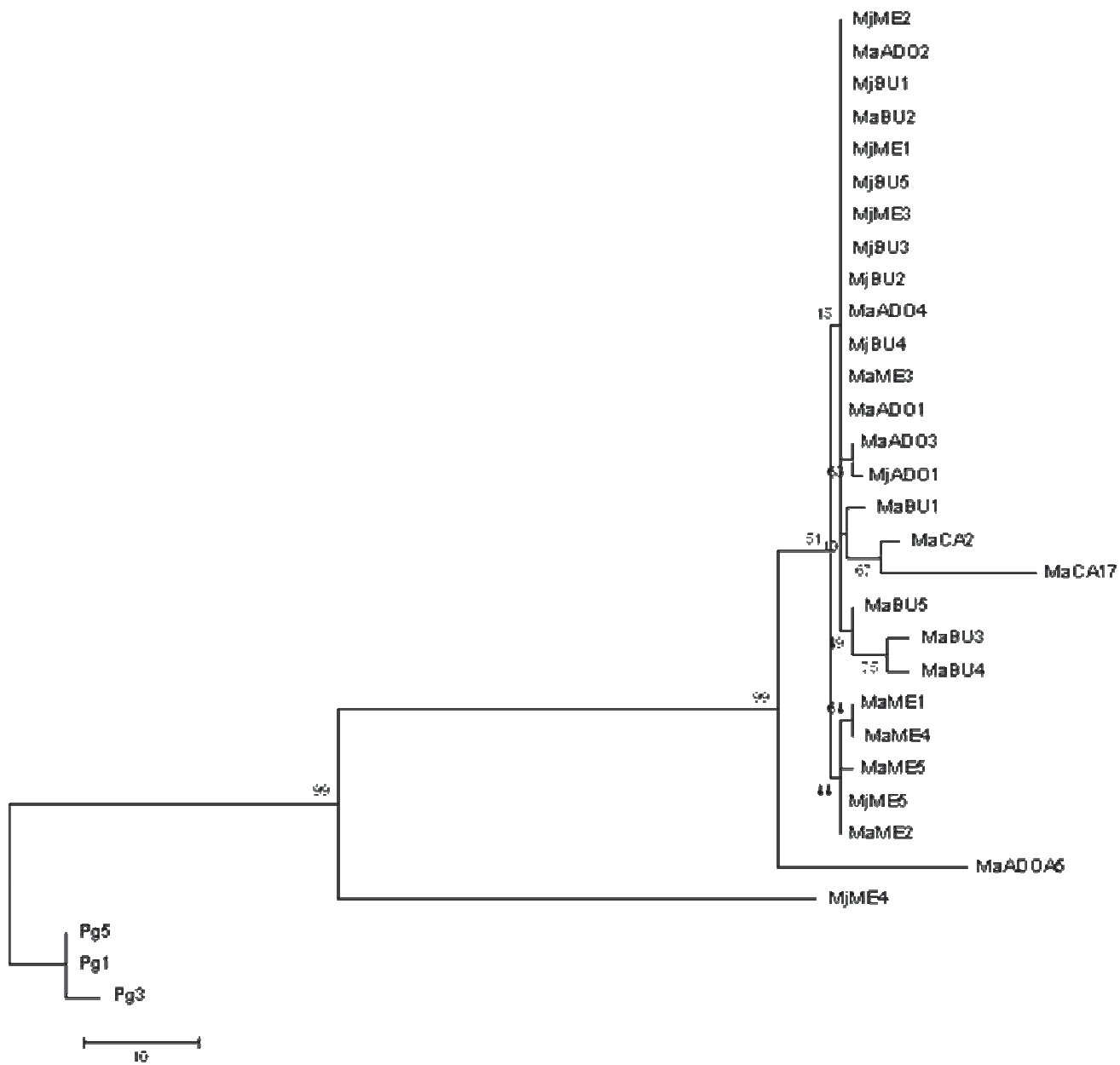
O dendograma, apresentado com um consenso de 50% (*majority-rule*), foi construído pelo método *Neighbor-Joining* e a frequência dos *clusters* é mostrada em cada nó, conforme visualizado na Figura 7. A árvore gerada a partir da análise das sequências COI não evidenciou a formação de *clusters* discriminativos. O grupo externo constituiu o ramo mais periférico, com um valor de *bootstrap* de 99%. Os demais indivíduos analisados foram

agrupados em apenas um nó, com um ramo constituído por MjME e o outro, agrupando os demais indivíduos (com valor de *bootstrap* de 99%).



**Tabela 4.** Valores de divergência genética (%) entre as populações analisadas no presente estudo. Os valores médios de distância genética intrapopulacional são apresentados em negrito, na diagonal. Os demais valores correspondem à divergência interpopulacional.

	<b>MaADO</b>	<b>MaBU</b>	<b>MaCA</b>	<b>MaME</b>	<b>MjADO</b>	<b>MjBU</b>	<b>MjME</b>	<b>Pg</b>
<b>MaADO</b>	<b>0,1</b>							
<b>MaBU</b>	0,6	<b>0,9</b>						
<b>MaCA</b>	3,1	3,5	<b>5,2</b>					
<b>MaME</b>	1,1	1,4	4,1	<b>1,5</b>				
<b>MjADO</b>	0,3	0,8	3,2	1,4	-			
<b>MjBU</b>	0,1	0,5	3,1	1,1	0,3	<b>0,1</b>		
<b>MjME</b>	4,7	5,2	7,5	5,5	5	4,7	<b>9,3</b>	
<b>Pg</b>	19,4	20	22	20	20	19,4	20	<b>11</b>



**Figura 7.** Dendrograma construído pelo método *Neighbor-Joining* para o gene COI. Os números nos nós representam os valores de *bootstrap*.

## 2. Sequências rRNA 16S

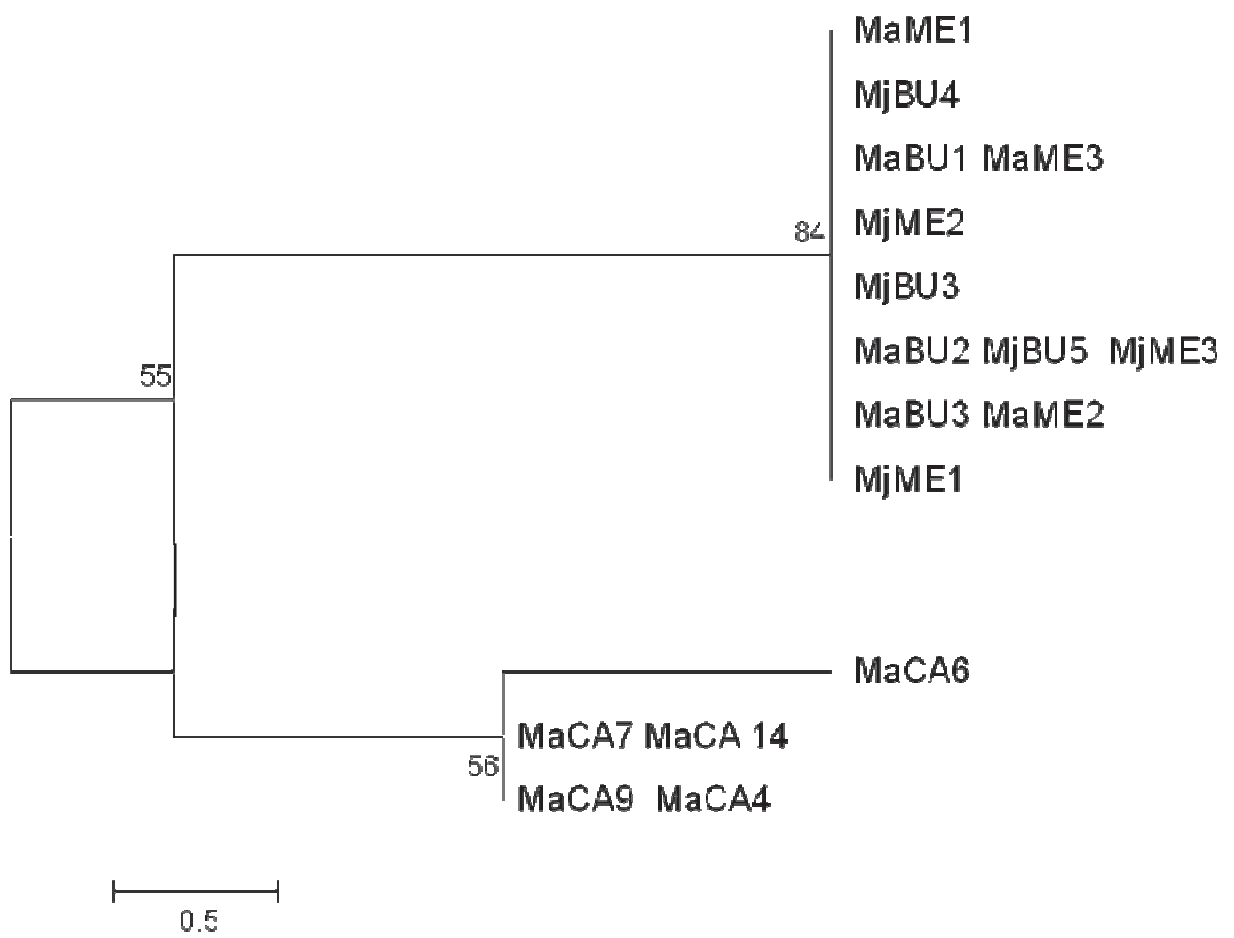
As seqüências obtidas do gene rRNA 16S apresentaram tamanhos que variaram de 520 a 529 pb, com valor médio de 520 pb. As freqüências nucleotídicas encontradas foram 0,144 (A); 0,190 (T); 0,62 (C), e 0,129 (G). Saturações correspondentes às taxas de transições/transversões não foram encontradas.

O dendograma gerado a partir das seqüências rRNA 16S (Figura 8), apresentado com um consenso de 50% (*majority-rule*), construído pelo método *Neighbor-Joining*, com as freqüências dos *clusters* mostradas em cada nó, também não evidenciou a formação de *clusters* discriminativos. Apenas a população originada do CAUNESP mostrou a formação de um grupo separado (com valor de *bootstrap* de 55%).

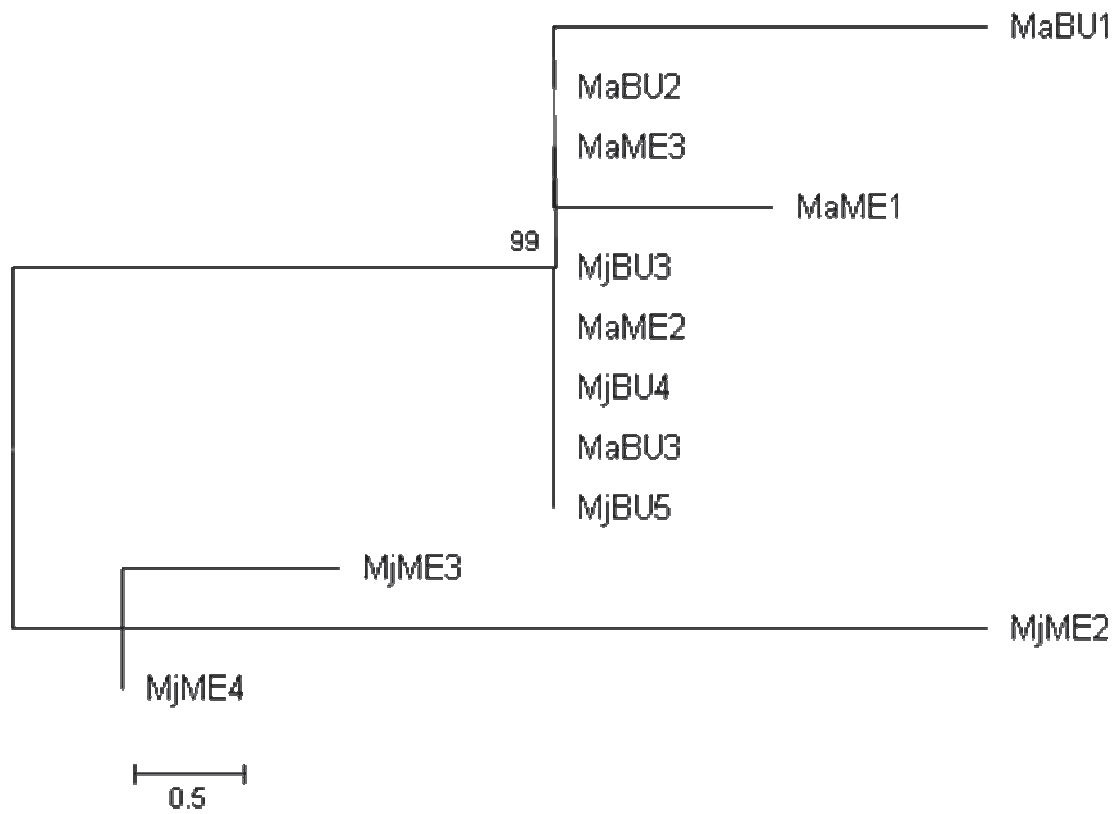
## 3. Análise conjunta das Seqüências COI e rRNA 16S

Para a construção do dendograma, a partir da análise conjunta dos dois genes em estudo, foram consideradas apenas as seqüências partilhadas pelas duas espécies, para cada população analisada. Sendo assim, foram incluídas apenas as populações de Mendonça e Buritama.

O dendograma gerado a partir da análise conjunta das seqüências COI e rRNA 16S (Figura 9), apresentado com um consenso de 50% (*majority-rule*), construído pelo método *Neighbor-Joining*, com as freqüências dos *clusters* mostradas em cada nó, também não evidenciou a formação de *clusters* discriminativos. Apenas a população de *M. jelskii* coletada em Mendonça, formou um ramo mais periférico (com valor de *bootstrap* de 99%), separada das demais.



**Figura 8.** Dendrograma construído pelo método *Neighbor-Joining* para o gene rRNA 16S. Os números nos nós representam os valores de *bootstrap*.



**Figura 9.** Dendrograma construído pelo método *Neighbor-Joining*, utilizando-se os genes COI e rRNA 16S juntos. Os números nos nós representam os valores de *bootstrap*.

## V. DISCUSSÃO

O entendimento da evolução biológica requer a descrição da variabilidade genética existente entre populações e espécies, bem como habilidades para distinguir as causas potenciais da distribuição da variação observada (LEWONTIN; HUBBY, 1966; AYALA; POWELL, 1972; McDOWELL; PRAKASH, 1976; NEI; LI, 1979)

Assim, um dos desafios da biologia atual é o de utilizar a grande quantidade de dados moleculares disponíveis, organizando-os no sentido de tentar compreender como os organismos se relacionam e como eles se derivaram no processo evolutivo. Entre as inúmeras metodologias disponíveis, os marcadores mitocondriais COI têm sido bastante utilizados em diferentes organismos, devido às suas características já mencionadas anteriormente, produzindo resultados importantes para essas finalidades e, inclusive, em estudos de *DNA barcode*, na identificação de espécies (AVISE, 1994; AVISE, 2000; BENZIE et al., 2002; HEBERT, 2003; CHANDRA et al., 2006; COOK et al., 2008; QING-YI; QI-QUN; WEI-BING, 2009; VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011).

Outra ferramenta molecular importante, utilizada atualmente para análises de filogenia, é o gene rRNA 16S (*Small Subunit Ribosomal RNA*) (SCHUBART et al., 2000; LIU et al., 2007; CHEN et al., 2009). Conforme já mencionado, em decápodes, a análise de regiões conservadas desse gene mostrou-se um marcador interespecífico eficaz (DANIELS, 2003; HARRISON, 2004; FRANCISCO; GALETTI JUNIOR, 2005; LIU et al., 2007; MANTELATTO; ROBLES; FELDER, 2007; VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011).

Mantellato e colaboradores (2007) utilizaram o gene rRNA 16S para estudar aspectos filogenéticos do gênero *Portunus*, um crustáceo marinho, que apresenta dificuldades de identificação taxonômica, devido à alta semelhança morfológica dos adultos. Das 14 espécies analisadas, 12 mostraram tratar-se de espécies distintas, com suas respectivas classificações taxonômicas reconhecidas como válidas. Os autores ressaltaram, ainda, que provavelmente este gênero não é monofilético e que é necessária a realização de uma revisão taxonômica detalhada, a fim de se esclarecer as questões relacionadas à filogenia.

No presente trabalho, a análise das seqüências COI e rRNA 16S foram empregadas para o estudo da variabilidade genética e dos aspectos filogenéticos em duas espécies de camarões do gênero *Macrobrachium*, *M. jelskii* (Mj) e *M. amazonicum* (Ma), utilizando

*Potimirim glabra* (Pg) como grupo externo (KENSLEY; WALKER, 1982; MAGNUSSON; VIEIRA; LIMA, 1987; PORTO, 1998; GUERRA et al., 2010).

As ferramentas moleculares, amplamente utilizadas na distinção de populações e espécies produzem importantes resultados que podem tornar essas análises consistentes (GARCIA-MACHADO et al., 2001; DINIZ, 2005). Para que estes estudos sejam desenvolvidos de forma segura, é necessário considerar alguns aspectos relevantes, tais como: as comparações dos valores de divergência genética; a formação de diferentes grupos (*clusters*) nos dendogramas, a partir das seqüências gênicas analisadas e, os aspectos morfológicos que possam corroborar tais divergências genéticas.

A taxa de divergência genética é um aspecto variável para ser analisado em estudos de identificação de populações e espécies, uma vez que diferentes grupos possuem diferentes taxas evolutivas e, ainda, o valor de distância genética, usado para testar a existência de ruptura e discriminar duas amostras de espécies diferentes, é arbitrário (HEBERT, 2003). Contudo, a mesma deve ser considerada em estudos dessa natureza, e constitui um importante complemento, auxiliando a compreensão da estrutura genética populacional e, também, da evolução de um complexo de espécies, como por exemplo as do gênero *Macrobrachium*, objeto do presente estudo, o qual ainda apresenta muitas incongruências taxonômicas (QING-YI; QI-QUN; WEI-BING, 2009).

Particularmente para as espécies em questão, estudos que atestem a estrutura genética populacional também podem ser importantes para a compreensão de aspectos relacionados à origem e evolução das mesmas na Região Noroeste do Estado de São Paulo. Outra questão importante que deve ser mencionada, e que poderia estar influenciando na estruturação genética dessas populações, diz respeito à introdução dessas espécies no Estado de São Paulo. Machado (1966) e Torloni et al., (1993) confirmaram que entre 1966 e 1973, *M. jelskii* e *M. amazonicum* foram introduzidos na estação de piscicultura da CESP (Companhia Energética de São Paulo), como parte do processo de cultivo do peixe *Plagioscion squamosissimus*, oriundo dos reservatórios do Nordeste brasileiro, provavelmente do Pará. Por volta de 1970, provavelmente por causa acidental, essas espécies atingiram o ambiente natural, inicialmente no Rio Pardo, alcançando, em seguida, o Rio Grande e os reservatórios de Jupuíá e Ilha Solteira, no alto do Rio Paraná. Outra possibilidade apontada por esses autores é a prática esportiva dos “Pesque e Pague”, que utilizam esses camarões como iscas vivas, e muitas vezes acabam liberando no ambiente os espécimes não utilizados. Por fim, formas larvais, juvenis ou imaturas desses decápodes podem ter sido transportados inadvertidamente,

associados às raízes de plantas aquáticas utilizadas para abrigar e proteger os peixes nos reservatórios.

O cálculo dos índices médios de divergência genética, obtidos nas comparações intrapopulacionais, mostraram dados interessantes, capazes de diagnosticar a atual estrutura genética dessas populações nas regiões analisadas. A média desses valores, considerando-se todos os índices calculados, para todas as comparações intrapopulacionais, foi elevada (3,5%). Contudo, observando-se estes valores individualmente, pode-se notar que, na maioria das comparações intrapopulacionais, os valores são baixos e muito semelhantes, refletindo uma provável estruturação genética destas populações. O desvio no valor médio destes índices provavelmente se deve às populações de MjME e do CAUNESP, cujos índices foram os mais elevados. Com relação a esta última população, este fato pode ser atribuído às condições de cativeiro nas quais estes indivíduos são mantidos, de longa data. Já para a população de MjME, o alto índice de divergência intrapopulacional podem refletir um desequilíbrio na estruturação dessa população para a espécie Mj, causado por interferência antrópica. De fato, a Represa de Mendonça, onde estas amostras foram obtidas, está sob constante interferência humana, principalmente liberando na natureza exemplares utilizados como iscas vivas na pesca esportiva, bastante praticada nesta região (MAGALHÃES et al., 2005; GUERRA et al., 2010).

Nas comparações interpopulacionais as taxas de divergência genética apresentaram uma ampla variação (de 0,1 a 20%).

Nas comparações interpopulacionais, envolvendo as amostras de *M. amazonicum*, três combinações apresentaram altas taxas de divergência (MaCA versus MaADO: 3,1%; MaCA versus MaBU: 3,5%; MaCA versus MaME: 4,1%), todas elas envolvendo a população de cativeiro, obtida no CAUNESP. Esse fato merece destaque, pois existem dúvidas a cerca da origem das amostras de *M. amazonicum* que invadiram o Estado de São Paulo, oriundas provavelmente do Pará e, é sabido que, a população do CAUNESP foi fundada a partir de espécimes coletados neste Estado. Assim, as taxas de divergência elevadas poderiam descartar essa hipótese. Contudo, como a população do CAUNESP é mantida em cativeiro de longa data, é importante considerar vários fatores que podem estar alterando a variabilidade genética da mesma, como por exemplo isolamento reprodutivo (VERGAMINI et al., 2011). Nas demais comparações interpopulacionais envolvendo *M. amazonicum*, os valores de divergência foram baixos e próximos (MaADO versus MjBU: 0,1%; MaME versus MjBU:



1,1%; MaME *versus* MjADO: 1,4%), o que poderia confirmar a origem comum dessas populações (MAGALHÃES et al., 2005; GUERRA et al., 2010).

Para as comparações interpopulacionais envolvendo *M. jelskii*, o valor de divergência genética mais baixo foi observado na comparação MjADO *versus* MjBu (0,3%). As demais análises apresentaram valores de divergência elevados (MjBu *versus* MjME: 4,7%; MjADO *versus* MjME: 5,0%), mas todas elas envolveram a população coletada na Represa de Mendonça, cujo desequilíbrio genético na sua estruturação populacional, já foi discutido anteriormente.

Outro ponto importante a ser destacado são as altas taxas de divergência genética intra e interpopulacional observadas para a amostra constituída pelo *outgroup* Pg (média de 20%). Os valores obtidos são condizentes com comparações envolvendo diferentes grupos de animais, inclusive de filos diferentes (HEBERT, 2003; WARD, 2005). Para a divergência interpopulacional, essa problemática seria menor, pois esta espécie é utilizada, no presente estudo, como *outgroup*. Contudo, a elevada distância encontrada para os indivíduos dentro desse mesmo grupo (11%), merece atenção e pode ser uma questão relacionada com a biologia desta espécie de camarão, amplamente distribuída nas Américas do Norte, Central e do Sul (BARROS; FONTOURA, 1996; PAIM *et al.*, 1997; RAMOS-PORTO; COELHO, 1998; LIMA; OSHIRO, 1999 e MELO, 2003). De acordo com Lima e Oshiro (2002b), como os espécimes apresentam ampla seleção de habitats e estão associados a um ambiente de declive, com rochas e correnteza, a alta taxa de fluxo gênico pode estar favorecendo a divergência intrapopulacional desse grupo (DÍAZ; CONDE, 1989; HARTNOLL; BRYANT, 1990; BEGON *et al.*, 1996).

Conforme já descrito, as espécies em estudo além de compartilharem muitas semelhanças morfológicas, são sintópicas, isto é, são coletadas juntas, o que dificulta a identificação taxonômica das mesmas (PILEGGI, 2009; GUERRA et al., 2010). Além disso, a presença de diferentes morfotipos, comuns principalmente para *M. amazonicum* (VERGAMINI et al., 2011), dificulta ainda mais a identificação taxonômica desses organismos. Na tentativa de verificar se o comportamento das seqüências COI, analisadas no presente estudo, refletem a presença de uma única espécie ou de espécies diferentes, foram realizadas análises interespecíficas, considerando-se a mesma localidade e, em seguida, comparando-se localidades diferentes.

Os valores de divergência genética interespecíficos nas amostras coletadas na mesma localidade geográfica foram baixos para as populações de Adolfo (0,3%), e de Buritama

(0,5%), o que seria condizente com a presença de uma única espécie, híbridos interespecíficos ou metapopulações. Isto está de acordo com estudos anteriores, realizados por Guerra e colaboradores (2010), utilizando-se as mesmas espécies e marcadores RAPD-PCR (APÊNDICE 1). Os resultados obtidos a partir da amplificação de fragmentos RAPD-PCR mostraram uma alta proximidade filogenética entre Mj e Ma, o que foi atribuído à recente introdução destas espécies nas regiões amostradas e às condições de habitat na qual elas encontram-se inseridas. Também é importante salientar que as populações amostradas, no presente estudo, habitam represas e, o isolamento geográfico desses organismos dificulta o fluxo gênico. É sabido que o isolamento leva ao endocruzamento e este, por sua vez, leva à homozigose e à redução da variabilidade genética (WRIGHT, 1931; 1943; 1960).

Novamente, para as amostras coletadas em Mendonça a taxa de divergência interespecífica foi elevada (5,5%), o que já seria esperado em um ambiente que tem sofrido muita interferência antrópica, alterando da variabilidade e a estrutura genética dessas espécies.

As demais comparações interespecíficas, envolvendo diferentes localidades, também apresentaram baixas taxas de divergência genéticas em três comparações: MaADO *versus* MjBU: 0,1%, MaME *versus* MjBU: 1,1%; MaME *versus* MjADO: 1,4%. É interessante notar que taxas mais elevadas de diferenciação genética foram encontradas nas comparações duas a duas, apenas quando amostras de MjME foram incluídas nestas análises (MaADO *versus* MjME: 4,7%; MaBU *versus* MjME: 5,2%), o que reforça uma condição particular das populações de Mendonça, provavelmente devido às diferentes pressões seletivas no seu habitat.

A análise de dendogramas também é uma ferramenta importante, muito utilizada em estudos que envolvem o diagnóstico de populações e espécies. Vários autores destacam que a formação de diferentes *clusters* em um dendograma poderia ser um bom indicador de que as populações em questão estão geneticamente estruturadas e que há ausência de trocas gênicas entre as mesmas ou, ainda, se existir fluxo de genes, então este estaria ocorrendo em baixas taxas (PEREIRA, 1997; MURPHY; AUSTIN, 2002; CHENG et al., 2007).

Com relação aos dendogramas gerados pelo programa MEGA 4.0, utilizando-se apenas as seqüências COI separadamente e, em seguida, agrupando-se os marcadores COI e rRNA 16S na mesma análise, ambos não evidenciaram a formação de *clusters*, o que poderia indicar prováveis perturbações na estrutura genética das amostras analisadas, provavelmente decorrentes de ação antrópica. Este fato é mais evidente quando observa-se a posição do indivíduo MjME4, formando um ramo mais periférico nos dois dendogramas, confirmando os

valores elevados de divergência genética obtidos para esta população (MjME, com 9,3% de divergência genética intrapopulacional, para as seqüências COI), já discutidos anteriormente.

O dendograma gerado a partir das seqüências rRNA 16S (programa MEGA 4.0), também não evidenciou a formação de *clusters* discriminativos. Apenas a população originada do CAUNESP mostrou a formação de um grupo separado (com valor de *bootstrap* de 55%), evidenciando sua diferenciação em relação aos demais grupos, já esperado por tratar-se de uma população mantida em cativeiro. Contudo, como existem suposições a respeito da origem das populações locais de *Macrobrachium*, a partir do mesmo ancestral que originou a amostra do CAUNESP, a separação destas amostras em dois grupos distintos parece não refletir uma provável origem comum entre as mesmas. Como estes dados são pioneiros nestes grupos de organismos, outros estudo complementares, utilizando-se outros marcadores e novas populações coletadas em outros pontos geográficos importantes, poderão esclarecer a rota de migração destas espécies e a provável origem genética das mesmas.

As bacias hidrográficas do Estado de São Paulo sofreram severas intervenções antrópicas que drasticamente modificaram a biota aquática, tais como: os represamentos, a remoção da vegetação, as práticas agrícolas inapropriadas, a liberação de poluentes das indústrias, capazes de provocar alterações nos parâmetros físicos e químicos da água. A introdução de novas espécies em um ambiente perturbado pode favorecer seletivamente a espécie exótica em detrimento da nativa, por mecanismos de predação e competição por nichos ecológicos. Diversos estudos demonstraram a importância da manutenção das espécies endêmicas ou nativas na conservação e recuperação de áreas naturais como sendo um aspecto fundamental para preservar a biodiversidade de ecossistemas e para uma melhor compreensão dos seus processos de interação bióticos e abióticos (MAGALHÃES et al., 2005).

Conforme mencionado na Introdução, o gênero *Macrobrachium* apresenta uma grande diversidade de representates, com ampla distribuição geográfica no Brasil e no mundo. Suas características morfológicas altamente variáveis e a presença de morfotipos, dificultam a identificação taxonômica dos mesmos, com base apenas nesses caracteres (ODINETZ-COLLART; MOREIRA, 1993; ODINETZ-COLLART; MAGALHÃES, 1994; PEIXOTO, 2002; PORTO, 2004; ANGER et al., 2009). Segundo Qing-Yi e colaboradores (2009) e Murphy e Austin (2002) existem muitas dúvidas e incongruências a respeito dos aspectos filogenéticos e taxonômicos entre dezenas de espécies deste gênero. Muitas destas questões ainda permanecem contraditórias, mesmo utilizando-se os marcadores COI e rRNA 16S, considerados eficientes para esta finalidade.

Segundo Anger et al., (2009) altas taxas de variabilidade genética intraespecífica e, consequentemente, divergência genética intra e interpopulacionais, podem ser causadas por isolamento genético e prováveis mecanismos de especiação incipientes. Como as espécies em questão possuem ampla distribuição geográfica, em ambientes bastante perturbados por interferência antrópica, a ocorrência de variações morfológicas consideráveis, e a presença de morfotipos variados, podem indicar prováveis mudanças evolutivas dentro destes grupos, o que os tornam ferramentas interessantes para estudos desta natureza.

Os dados obtidos no presente trabalho confirmam esta problemática ecológica e evolutiva existente entre estas espécies, principalmente para as amostras *M. jelskii* coletadas em Mendonça, e são pioneiros nesses crustáceos. Espera-se que a continuidade deste estudo, permita avaliar melhor a estrutura genética das espécies analisadas, compreender aspectos filogenéticos básicos entre *M. jelskii* e *M. amazonicum*, espécies sintópicas e taxonomicamente difíceis de serem identificadas e, também, contribuir para o conhecimento da biologia desses organismos ainda pouco estudados. Também é importante ressaltar a necessidade de maiores cuidados com relação à genética da conservação não apenas das espécies analisadas, mas de todas as demais espécies que habitam essa região.

Outras análises envolvendo a estrutura genética destas populações devem fornecer as informações necessárias para que, ao longo do tempo, seja possível conhecer melhor as questões relacionadas à variabilidade e à diferenciação dessas espécies.

## VI. CONCLUSÕES

A análise do polimorfismo das seqüências gênicas mitocondriais da subunidade I do citocromo oxidase (COI) e rRNA 16S, em três populações naturais (ME, BU e ADO) e uma de cativeiro (CAUNESP), em duas espécies de camarões palemonídeos do gênero *Macrobrachium*, *M. amazonicum* e *M. jelskii*, permitiu obter-se as seguintes conclusões:

1) Os índices médios de divergência genética intrapopulacionais foram elevados, com média de 3,5%. Entretanto, individualmente esses valores são baixos e muito semelhantes, refletindo uma provável estruturação genética destas populações em cada ponto de coleta avaliado. O desvio no valor médio dos índices de divergência genética intrapopulacionais foi atribuído às populações de MjME e do CAUNESP, sugerindo um desequilíbrio na estruturação genética das mesmas, causado por interferência antrópica e situação de cativeiro, respectivamente.

2) Nas comparações interpopulacionais as taxas de divergência genética apresentaram uma ampla variação, também com média elevada (7,07%). Nas comparações envolvendo *M. amazonicum*, três combinações apresentaram altas taxas de divergência (MaCA *versus* MaADO: 3,1%; MaCA *versus* MaBU: 3,5%; MaCA *versus* MaME: 4,1%), todas com a população do CAUNESP. Como existem dúvidas a cerca da origem das amostras de *M. amazonicum* que invadiram o Estado de São Paulo, oriundas provavelmente do Pará (mesma origem da população do CAUNESP), as taxas de divergência elevadas poderiam descartar essa hipótese. Nas demais comparações interpopulacionais envolvendo *M. amazonicum*, os valores de divergência foram baixos e próximos (MaADO *versus* MjBU: 0,1%; MaME *versus* MjBU: 1,1%; MaME *versus* MjADO: 1,4%), o que poderia confirmar a origem comum dessas populações.

3) Para as comparações interpopulacionais envolvendo *M. jelskii*, o valor de divergência genética mais baixo foi observado na comparação MjADO *versus* MjBu (0,3%). As demais comparações apresentaram valores de divergência elevados (MjBu *versus* MjME: 4,7%; MjADO *versus* MjME: 5,0%), mas todas elas envolveram a população coletada na Represa de Mendonça, cujo desequilíbrio genético na sua estruturação populacional, foi atribuído à introdução freqüente de espécimes exóticos à esta região.

4) Os valores de divergência genética interespecíficos nas amostras coletadas na mesma localidade geográfica foram baixos para as populações de Adolfo (0,3%), e de Buritama (0,5%), condizente com a presença de uma única espécie, híbridos interespecíficos ou metapopulações.

5) Para as amostras coletadas em Mendonça a taxa de divergência interespecífica foi elevada (5,5%), o que já seria esperado em um ambiente que tem sofrido muita interferência antrópica, alterando da variabilidade e a estrutura genética dessas espécies.

6) Nas comparações interespecíficas, envolvendo diferentes localidades, também foram visualizadas baixas taxas de divergência genética em três comparações envolvendo Adolfo e Buritama (MaADO *versus* MjBU: 0,1%, MaME *versus* MjBU: 1,1%; MaME *versus* MjADO: 1,4%). Taxas mais elevadas de diferenciação foram visualizadas apenas quando amostras de MjME foram incluídas nestas análises (MaADO *versus* MjME: 4,7%; MaBU *versus* MjME: 5,2%), o que reforça uma condição particular desta população, provavelmente devido às diferentes pressões seletivas no seu habitat.

7) A análise dos dendogramas, utilizando-se as seqüências COI separadamente e, em seguida, agrupadas aos marcadores rRNA 16S, não evidenciaram a formação de *clusters*, o que reforça a existência de perturbações na estrutura genética das amostras analisadas. Este fato foi mais evidente quando observa-se a posição do indivíduo MjME4, formando um ramo mais periférico nos dois dendogramas, confirmando os valores elevados de divergência genética obtidos para esta população (MjME, com 9,3% de divergência genética intrapopulacional).

8) O dendograma gerado a partir das seqüências rRNA 16S, também não evidenciou a formação de *clusters* discriminativos. Apenas a população originada do CAUNESP mostrou a formação de um grupo separado, evidenciando sua diferenciação em relação aos demais grupos, o que já era esperado por tratar-se de população uma mantida em cativeiro. Contudo, como existem suposições a respeito da origem das populações locais de *Macrobrachium*, a partir do mesmo ancestral que originou a amostra do CAUNESP, a separação destas amostras em dois grupos distintos parece não refletir uma provável origem comum entre as mesmas.

9) Os dados genéticos obtidos a partir das amostras em Mendonça, principalmente para *M. jelskii*, mostram claramente que trata-se de um ambiente severamente perturbado, por interferência antrópica, alterando da variabilidade e a estrutura genética dessas populações e espécies. Esses resultados indicam a necessidade de maiores cuidados com relação à genética da conservação não apenas das espécies em estudo, mas de todas as demais espécies que habitam essa região.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGER, K.; HAYD, L.; KNOTT, J.; NETTELMANN, U. Patterns of larval growth and chemical composition in the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, v. 287, p. 341-348, 2009.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. Chapman and Hall, New York, NY, p. 511, 1994.

AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard University Press, p. 511, 2000.

AYALA, F. J.; POWELL, J. R. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. **Genetics**, v. 70, p. 113-139, 1972.

AYALA, F. J.; WETTERER, J. K.; LONGINO, J. T.; HARTL, D. L. Molecular phylogeny of *Azteca* ants (Hymenoptera, Formicidae) and the colonization of *Cecropia* trees. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 5, p. 423-428, 1996.

BARROS, M. P.; FONTOURA, N. F. Crescimento de *Potimirim g/abra* (Kingsley, 1878) (Crustacea, Decapoda, Atyidae), na Praia da Vigia, Garopaba, Santa Catarina, Brasil. **Nauplius**, v. 4, p. 1 -28, 1996.

BAKER, N.; DE BRUYN M.; MATHER, P. B. Patterns of molecular diversity in wild stocks of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) from northern Australia and Papua New Guinea: impacts of Plio-Pleistocene landscape evolution. **Freshwater Biology**, v. 53, p. 1592-1605, 2008.

BARCODES OF LIFE: **Barcoding Animal Life**. Disponível em: <[http://www.barcodinglife.org/static/Archive\\_21feb05/static/background/COIProtein.html](http://www.barcodinglife.org/static/Archive_21feb05/static/background/COIProtein.html)> Acesso em: 16 de jan, 2011.

BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. **Ecology: individuals, populations and communities**. 1996.

BENZIE, J. A.; BALLMENT, E.; FORBES, A. T.; DEMETRIADES, N. T.; SUGAMA, K.; MORIA, S. Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2553– 2569, 2002.

BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA. **Evolution of genes and proteins**. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, p. 62-88, 1985.



COOK, B. D.; BUNN, S. E.; HUGHES, J. M. Molecular evidence for sequential colonization and taxon cycling in freshwater decapod shrimps on a Caribbean island. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 1066-1075, 2008.

CORNELI, P. S.; WARD, R. H. Mitochondrial Genes and Mammalian Phylogenies: Increasing the Reliability of Branch Length Estimation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 224-234, 2000.

CHANDRA, S. B. C.; JENNIFER, L. VLK.; KAPATRAL, V. Comparative insect mitochondrial genomes: Differences despite conserved genome synteny. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1308-1318, 2006.

CHEN, R. T.; TSAI, C. F.; TZENG, W. N. 16S and 28S rDNA sequences in phylogenetic analyses of freshwater prawns (*Macrobrachium* BATE, 1868) from Taiwan. **Journal of Crustacean**, v. 29, p. 400-412, 2009.

CHENG, Q. Q.; FAN, Q. G.; XIA, L. J.; HUANG, N. Y. Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA gene of three species of *Macrobrachium*. **Natural Science**, v. 26, p. 1-6, 2007.

DANIELS, S. R. Examining the genetic structure among populations of the common cape river crab *Potamonautes perlatus* from river systems in South Africa reveals hydrographic boundaries. **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, p. 936-950, 2003.

DIAZ, H.; CONDE, J. E. The mangrove tree crab *Aratus pisonii* in a tropical estuarine coastal lagoon. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 28, p. 639-650, 1989.

DINIZ, M. C. Variabilidade do gene mitocondrial COI em dois plantéis reprodutores do camarão *Litopenaeus vannamei* do Nordeste Brasileiro. Fortaleza, CE. 2005, 67p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas – Área de concentração em Genética Molecular). **Universidade Estadual do Ceará**.

DOBLER, S.; MULLER, K. Resolving phylogeny at the family level by mitochondrial cytochrome oxidase sequence: phylogeny of carrion beetles (Coleoptera, Silphidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15, p. 309-402, 2000.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. **Revista Brasileira de Genética**, v. 19, p. 23-29, 1996.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. **Evolution**, v. 39, p.783-791,1985.

FRAKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University press. Cambridge, 2002.

FRANCISCO, A. K.; GALETTI JUNIOR, P. M. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 258-261, 2005.

GARCIA-MACHADO, E.; PEMPERA, M.; DENNEBOUY, N.; OLIVA-SUAREZ, M.; MOUNOLOU, J. C.; MONNEROT, M. Mitochondrial genes collectively suggest the paraphyly of Crustacea with respect to Insecta. **Journal of Molecular Evolution**, v. 49, p. 142-149, 2001.

GUERRA, A. L.; LIMA, A. V. B.; TADDEI, F. G.; CASTIGLIONI, L. Genetic polymorphism, molecular characterization and relatedness of *Macrobrachium* species (Palaemonidae) based on RAPD-PCR. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 2317-2327, 2010.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARRISON, J., S. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16s and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinixa*. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 30, p. 743-754, 2004.

HARRISON, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 6-11, 1989.

HARTNOLL, R. G.; BRYANT, A. D. Size-frequency distributions in decapod Crustacea - the quick, the dead, and the cast-offs. **Journal of Crustacean Biology**, v. 10, p. 14-19, 1990.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, L. S.; WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v. 270, p. 313-321, 2003.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

**KENSLEY, B.; WALKER, I. Palaemonid shrimps from the Amazon Basin, Brazil (Crustacea: Decapoda: Natantia). Smithsonian Contributions to Zoology, v. 362, p. 1-28, 1982.**

KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PAABO, S.;

VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 6196-6200, 1989.

LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. L. A Molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. **Genetics**, v. 54, p. 577-594, 1966.

LIMA, G.V.; OSHIRO, L. M. Y. Aspectos reprodutivos do camarão de água doce *Potillirim* (Müller, 188 1) (Crustacea, Decapoda, Atyidae) do Rio Sahy, Mangaratiba/RJ. **Nauplius**, v. 7, p. 65-71, 1999.

LIU, B. Fuzzy process, hybrid process and uncertain process. **Journal of Uncertain Systems**, v. 2, p. 3-16, 2008.

LIU, M. Y.; CAI, Y. X.; TZENG, C. S. Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. **Zoological Studies**, v. 46, p. 272-289, 2007.

LORENZON, S.; FRANCESE, M.; FERRERO, E. A. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *P. elegans*. **Arch. Environmental Contamination Toxicology**, p. 167 -176, 2000.

LORENZON, S.; GIULIANINI, P. G.; FERRERO, E. A. Lipopolysaccharide-induced hyperglycaemia is mediated by CHH release in crustaceans. **General and Comparative Endocrinology**, v. 108, p. 395 -405, 2002.

MACHADO, C. E. M. **Estações experimentais de Biologia e Psicultura em represas da CHERP**. Secretaria da Agricultura, Departamento da Produção Animal, Divisão de Proteção e Produção de peixes e Animais Silvestres, São Paulo. Technical Report, v. 12, 1966.

MAGALHÃES, C. Abbreviated development of *M. jelskii* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) from the Rio Solimões foodplain, Brazil, rears in the laboratory. **Nauplius**, v. 8, p. 1-14, 2000.

MAGALHÃES, C.; BUENO, S.; BOND, G.; VALENTI, W. C.; SILVA, H. M.; KIYOARA, F.; MOSSOLIN, E. C.; ROCHA, S. Exotic species of freshwater decapod crustaceans in state of São Paulo, Brasil: records and causes of their introduction. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 1929-45, 2005.

MAGNUSSON, W. E.; VIEIRA, E.; LIMA, A. P. Diets of Amazonian crocodilians. **Journal of Heredity**, p. 85-95, 1987.

MANTELATTO, F. L.; ROBLES, R.; FELDER, D. L. Molecular phylogeny and taxonomic approach of the crab genus *Portunus* (Crustacea, Portunidae) from Western Atlantic. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 150, p. 211-220, 2007.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. **Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos**. *Biologia Molecular e Evolução*, Cap. 15. Editora Holos, 2001.

McDOWELL, R. E.; PRAKASH, S. Allelic heterogeneity within allozymes separated by electrophoresis in *Drosophila pseudoobscura*. **Proceedings of the National Academy of sciences**, v. 73, p. 4150-4153, 1976.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. São Paulo: Editora Loyola, p.143-287, 2003.

MEYER, D.; AMORIN, D. S. **Análises filogenéticas de sequências de DNA. Elementos básicos de sistemática filogenética**. Ribeirão Preto: Holos e Sociedade Brasileira de Entomologia, p. 187-212, 1997.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 269-292, 1987.

MOSSOLIN, E. C.; BUENO, S. L. Relative Growth of the second pereopod in *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836), (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v. 76, p. 363-376, 2003.

MURPHY, N. P.; AUSTIN, C. M. A preliminary study of 16S rRNA sequence variation in Australian *Macrobrachium* shrimps (Palaemonidae: Decapoda) reveals inconsistencies in their current classification. **Invertebrate Systematics**, v. 16, p. 697-701, 2002.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of sciences**, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: Sarvier, p. 1202, 2006.

ODINETZ-COLLART, O.; MAGALHÃES, C. Ecological constraints and life history strategies of palaemonid prawns in Amazonia. **Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, v. 25, p. 2460-2467.

ODINETZ-COLLART, O.; MOREIRA, L. C. Potencial pesqueiro de *Macrobrachium amazonicum* na Amazônia Central (Ilha do Careiro): variação da abundância e do comprimento. **Amazoniana**, v. 12, p. 399-413, 1993.

PAIM, J. P.; M.C.; PESO-AGUIAR; C. R. G.; CARQUEJA, T. C. A.; ALMEIDA, R. C. F.; ASSIS. Ocorrência de *Potimirim* {*Jotimirim* (Müller. 1881) (Crustacea, Decapoda, Atyidae) no Rio Mucuri-Bahia. **Nauplius**, v. 5, p. 147-148, 1997.

PEIXOTO, A. A.; BAUZER, L. G. S. R.; GESTO, J. S. M.; SOUZA, N. A.; WARD, R. D.; HAMILTON, J. G. C.; KYRIACOUS, C. P. Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 1624-1627, 2002.

PEREIRA, G. A cladistic analysis of the freshwater shrimps of the family Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Caridea). **Acta Biologica Venezuelica**, v. 17, p. 1-69, 1997.

PEREIRA, G.; STEFANO, H.; STATON J.; FARRELL, B. **Phylogenetic relationships in some species of the genus *Macrobrachium* based on nucleotide sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase**. Modern Approaches to the Study of Crustacea, New York, Kluwer Academics/Plenum Publishers, p. 319-322, 2002.

PILEGGI, L. G.; MANTELATTO, F. L. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae) with emphasis on the relationships among American species and the status of the type species. **Invertebrate Systematics**, v. 24, p. 194-208, 2009.

PORTO, A. C. Estrutura Populacional e Biologia Reprodutiva de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1892) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae), na Bacia Hidrográfica do Rio Meia Ponte, Bela Vista de Goiás - GO, Brasil. **Instituto de Biociências/UNESP**, Campus de Jaboticabal, 1998.

PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JULIO, H. F.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, D.; PRIOLI, L. M. Identification of *A. altiparanae* in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 421-430, 2002.

QING-YI, Z.; QI-QUN, C.; WEI-BING, G. Mitochondrial COI Gene Sequence variation and taxonomic status of three *Macrobrachium* species. **Zoological Research**, v. 30, p. 613-619. 2009.

RAMOS-PORTO, M.; COELHO, P. A. Malacostraca. Elicarida (Alpheoidea excluded), *In*: P.S. (Ed.). no. 6, p. 717. **Catalogue of Crustacea of Brazil**. Rio de Janeiro, Museu Nacional, Série Livros p. 325-350, 1998.

REIS, J. A.; HOFFMAN, P.; MARCOS, L. M.; TADDEI, F. G.; HOFFMAN, F. L. Estudo higiênico-sanitário dos camarões dulcícolas *M. amazonicum* e *M. jelskii*. **High Alimentar**, p. 58-68, 2004.

SAHLS, G.; NYBLOM, K. Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 15, p. 235-241, 2000.

SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction “primers”. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651-701, 1994.

SCARPASSA, V. M.; TADEI, W. P.; SUAREZ, M. F. Genetic divergence in mitochondrial DNA of *Anopheles nuneztovani* (Diptera, Culicidae) from Brazil and Colombia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 71-78, 2000.

SCHUBART, C. D.; NEIGEL, J. E.; FELDER, D. L. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. **Crustacean Issues**, v. 12, p. 817-830, 2000.

SHORT, J. W. A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). **Hydrobiologia**, v. 525, p. 1-100, 2004.

TADDEI, F. G. Biologia populacional: crescimento e reprodução dos camarões palemonídeos *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) e *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1868) na região noroeste do Estado de São Paulo. Botucatu, SP. 2006, 200p. Tese (Doutorado – Área de concentração em Zoologia). **Instituto de Biociências/UNESP**, Campus de Botucatu.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TASSANAKAJON, A.; PONGSOMBOON, S.; JARAYABHAND, P.; KLINBUNGA, S.; BOONSAENG, V. V. Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Panaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 6, p. 249-254, 1998.

TASSANAKAJON, A.; PONGSOMBOON, S.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; JARAYABHAND, P.; BOONSAENG, V. Random amplified polymorphic DNA for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn in Thailand. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 6, p. 110-115, 1997.



THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEAMNOUGIN, F.; HIGGIS, D. G. The CLUSTAL\_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TORLONI, C. E. C.; SANTOS, J. J.; CARVALHO, A. A. Jr.; CORREA, A. R. A. A pescada do Piauí *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Perciformes) nos reservatórios da Companhia Energética de São Paulo – CESP. Série Pesquisa e Desenvolvimento (CESP: São Paulo), v. 84, p. 1-23, 1993.

VALENTI, W. C. **Carcinicultura de água doce**. São Paulo. FAPESP/IBAMA, p. 383, 1998.

VERGAMINI, F. G.; PILEGGI, L. G.; MANTELATTO, F. L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, v. 80, p. 67-83. 2011.

XIA, X. H.; XIE, Z. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. **Journal of Heredity**, v. 93, p. 371-373, 2001.

WARD; PETER; MYERS, A. R. Shifts in open-ocean fish communities coinciding with the commencement of commercial fishing. **Ecology**, v. 86, p. 835–847, 2005.

WILSON, K.; CAHILL, V.; BALLMENT, E.; BENZIE, J. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods? **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 863-874, 2000.

WRIGHT, S. An analysis of local variability of flower color in *Linanthus Parryae*. **Ibidem**, v. 28, p. 139-156, 1943.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Geneticis**, v. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. Physiological genetics, ecology of populations, and natural selection. In S. Tax (org.), *Evolution after Darwin*. Chicago, Univ. of Chicago Press, 1960.

WOLSTENHOLME, D. R. **Animal mitochondrial DNA: structure and evolving. Mitochondrial Genomes**. Eds. D.R. Wolstenholme e K.M. Joen, Academic Press, San Diego, p. 173-216, 1992.

## **VIII. ANEXOS**

**ANEXO 1.** Licença obtida no IBAMA para realização das coletas realizadas no presente estudo.





## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 25145-1	Data da Emissão: 22/09/2010 09:14
-----------------	-----------------------------------

### Dados do titular

Nome: Ana Letícia Guerra	CPF: 353.562.238-70
Título do Projeto: ANÁLISE MOLECULAR DA REGIÃO ITS1 EM CAMARÕES Macrobrachium (M. amazonicum e M. jelskii)	
Nome da Instituição : UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Padronização da Metodologia	10/2010	03/2011
2	Coleta dos espécimes	10/2010	09/2011
3	Levantamento Bibliográfico	10/2010	03/2012
4	Obtenção e análise dos resultados	10/2010	03/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Lilian Castiglioni	Orientadora	169.827.028-39	19388773-3 SSP-SP	Brasileira
2	Dante Bruno Avanzo Rosan	Estagiário	378.582.788-19	46865109-3 SSP-SP	Brasileira
3	Fabiano Gazzí Taddei	Colaborador	202.753.658-24	242331701 SSP-SP	Brasileira
4	Alexandre Vidotto Barboza Lima	Colaborador	337.446.748-27	346665243 SSP-SP	Brasileira

### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	ADOLFO	SP	Tietê	Fora de UC
2	BURITAMA	SP	Tietê	Fora de UC
3	ICEM	SP	Tietê	Fora de UC
4	SALES	SP	Tietê	Fora de UC
5	MENDONCA	SP	Tietê	Fora de UC

### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
---	-----------	--------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 62446171





### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 25145-1</b>	<b>Data da Emissão: 22/09/2010 09:14</b>
------------------------	--

#### Dados do titular

Nome: Ana Letícia Guerra	CPF: 353.562.238-70
Título do Projeto: ANÁLISE MOLECULAR DA REGIÃO ITS1 EM CAMARÕES <i>Macrobrachium</i> (M. amazonicum e M. jelskii)	
Nome da Instituição : UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Macrobrachium amazonicum</i> , <i>Macrobrachium jelskii</i>
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Macrobrachium amazonicum</i> (*Qtde: 150), <i>Macrobrachium jelskii</i> (*Qtde: 150)

\* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

#### Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Aquáticos)	Peneira
---	--	---------

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	Laboratório de Evolução Molecular

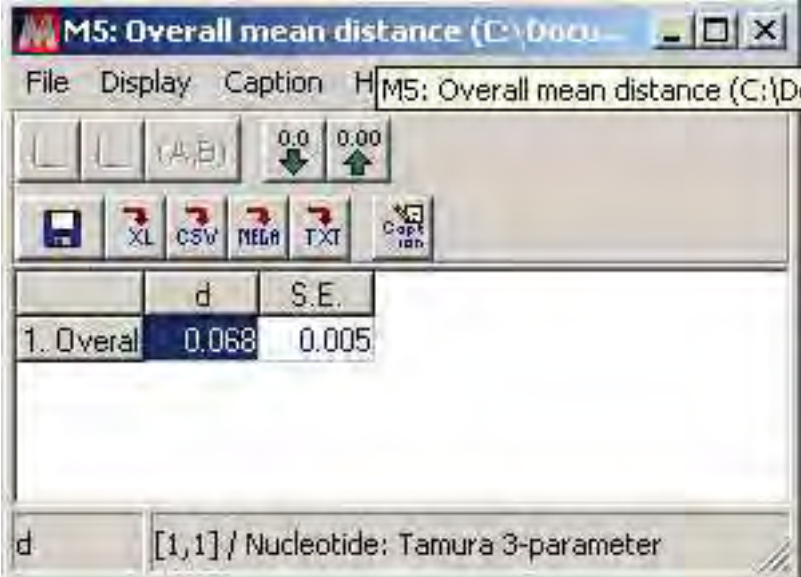
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 62446171**





ANEXO 2. Média Geral da distância entre todas as sequências.



The screenshot shows a software window titled "M5: Overall mean distance (C:\Docu...)" with a menu bar containing "File", "Display", "Caption", and "H". Below the menu bar is a toolbar with icons for file operations and a "Caption" button. A table displays the overall mean distance and its standard error. The table has two columns: "d" and "S.E.". The first row is labeled "1. Overall" and contains the values 0.068 and 0.005. At the bottom of the window, there is a status bar showing "d [1,1] / Nucleotide: Tamura 3-parameter".

	d	S.E.
1. Overall	0.068	0.005

**ANEXO 3.** Análise de divergência genética intrapopulacional ( $d$  = Tamura-3-parâmetros).

	d	S.E.
1. Gp 1	0.001	0.001
2. Gp 2	0.009	0.002
3. Gp 3	0.052	0.009
4. Gp 4	0.015	0.003
5. Gp 5	n/c	n/c
6. Gp 6	0.001	0.001
7. Gp 7	0.093	0.008
8. Gp 8	0.111	0.010

d [8,1] (Gp 8-Gp 1) / Nucleotide; Tamura 3-parar

ANEXO 4. Análise de distância dentro dos grupos (d = Tamura-3-parâmetros).

M5: Between Group Mean Distance (C:\Documents and Settings\...)

File Display Caption Help

(A,B) 0.0 0.00 XL CSV MEGA TXT Copy

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Gp 1		0.002	0.005	0.003	0.002	0.000	0.004	0.015
2. Gp 2	0.006		0.005	0.003	0.003	0.002	0.004	0.015
3. Gp 3	0.031	0.035		0.006	0.005	0.005	0.007	0.016
4. Gp 4	0.011	0.014	0.041		0.003	0.003	0.005	0.016
5. Gp 5	0.003	0.008	0.032	0.014		0.002	0.005	0.016
6. Gp 6	0.001	0.005	0.031	0.011	0.003		0.004	0.015
7. Gp 7	0.047	0.052	0.075	0.055	0.050	0.047		0.014
8. Gp 8	0.194	0.197	0.221	0.199	0.197	0.194	0.199	

d [8,1] (Gp 8-Gp 1) / Nucleotide: Tamura 3-parameter

## **IX. APÊNDICE**

Genetic polymorphism, molecular characterization and relatedness of *Macrobrachium* species  
(Palaemonidae) based on RAPD-PCR.

A.L. Guerra, A.V.B. Lima, F.G. Taddei and L. Castiglioni

Artigo publicado na revista  
Genetics and Molecular Research (DOI 10.4238/vol9-4gmr935)



# Genetic polymorphism, molecular characterization and relatedness of *Macrobrachium* species (Palaemonidae) based on RAPD-PCR

A.L. Guerra<sup>1</sup>, A.V.B. Lima<sup>1</sup>, F.G. Taddei<sup>2</sup> and L. Castiglioni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, Centro Universitário de Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Corresponding author: L. Castiglioni  
E-mail: clilian@terra.com.br

Genet. Mol. Res. 9 (4): 2317-2327 (2010)

Received July 26, 2010

Accepted September 17, 2010

Published November 30, 2010

DOI 10.4238/vol9-4gmr935

**ABSTRACT.** The prawn genus *Macrobrachium* belongs to the family Palaemonidae. Its species are widely distributed in lakes, reservoirs, floodplains, and rivers in tropical and subtropical regions of South America. Globally, the genus *Macrobrachium* includes nearly 210 known species, many of which have economic and ecological importance. We analyzed three species of this genus (*M. jelskii*, *M. amazonicum* and *M. brasiliense*) using RAPD-PCR to assess their genetic variability, genetic structure and the phylogenetic relationship between them and to look for molecular markers that enable separation of *M. jelskii* and *M. amazonicum*, which are closely related syntopic species. Ten different random decamer primers were used for DNA amplification, yielding 182 fragments. Three of these fragments were monomorphic and exclusive to *M. amazonicum* or *M. jelskii* and can be used as specific molecular markers to identify and separate these two species. Similarity indices and a phylogenetic tree showed that *M. amazonicum* and *M. jelskii* are closest to each other, while *M. brasiliense* was the most differentiated species among them; this may be attributed to the different habitat



conditions to which these species have been submitted. This information will be useful for further studies on these important crustacean species.

**Key words:** RAPD-PCR; *Macrobrachium*; Polymorphism; Prawn; Phylogenetic relationship; Crustacean

## INTRODUCTION

The genus *Macrobrachium* (Bate, 1868) includes several species of prawns widely distributed in lakes, reservoirs, floodplains, and rivers in tropical and subtropical regions of South America, including all the main river basins (Orinoco, Amazon, Araguaia, Tocantins, São Francisco, Paraná, and Paraguai River basins), as well as the smaller rivers of the South Atlantic Basin in the northern, northeastern, and eastern coasts of Brazil (Melo, 2003; Maciel and Valenti, 2009). Currently, there are nearly 210 species known worldwide, of which 45 are registered in the Americas, including about 18 in Brazil (Melo, 2003).

The term prawn has a very broad meaning. It is used to characterize species whose entire life cycle is restricted to freshwater, as well as those that need brackish water at the beginning of their development and later freshwater after metamorphosis (Sampaio et al., 2007). They are decapod crustaceans belonging to the Suborder Pleocyemata, Infraorder Caridea, Superfamily Palaemonoidea, and Family Palaemonidae. Although they are also called prawns, like saltwater shrimp, they are considered to be closer to lobsters, since they share many similarities mainly regarding their reproductive habits, because the female prawns, similar to lobsters, keep their eggs in the abdomen until spawning time (Valenti, 1993; Martin and Davis, 2001).

Most of the prawn species of economic importance belong to the genus *Macrobrachium*. They are widely exploited by artisan fisheries and used as protein sources by humans and other animals, and in addition, these prawns show a high potential for aquaculture. In recent years, intense research efforts have been directed toward developing the technology for commercial culture of this species (Valenti, 1993; Moraes-Valenti and Valenti, 2007, 2010).

Besides economic factors, the *Macrobrachium* species have been shown to play important ecological roles (Magalhães, 2000; Magalhães et al., 2005). However, their biological characteristics and genetic structure are poorly understood.

According to Magalhães (2000), several species that occupy different habitats, including those within the genus *Macrobrachium*, have shown interesting adaptive particularities in their morphological and physiological aspects and behavioral patterns that could be the object of many studies. These studies are important since in several basins drastic environmental changes have occurred due to the presence of exotic species, pollution and the deterioration of aquatic ecosystems caused by human occupation.

As described by Magalhães et al. (2005), *M. amazonicum* and *M. jelskii* have similar geographic distribution throughout South America (from Venezuela to northern Brazil), and also the basins of the Orinoco, Amazonas, and lower Paraná, and the northeast and southeast regions of Brazil, including the State of São Paulo. Particularly in this state, the introduction of both species could have been caused by humans who have interfered by cultivating them for commercial purposes (live bait for a practice known as “fish-pay”) or by their accidental escape from the fish breeding stations of CESP (Companhia Energética de São Paulo), probably in the early 1970s.

Also according to Magalhães et al. (2005), there are several difficulties in taxonomic classification of some species of *Macrobrachium* that are based only on morphological characteristics so that even the literature regarding this problem is of poor value. Such difficulties are most evident between *M. amazonicum* and *M. jelskii*, which have many morphological similarities that hinder their identification, and this may even be increased because they are syntopic species.

In the present study, we contribute to the biological knowledge of three *Macrobrachium* species: *M. amazonicum*, *M. jelskii* and *M. brasiliense*, using RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA by polymerase chain reaction) markers to study their genetic polymorphism, to obtain molecular markers to enable the identification of mainly *M. jelskii* and *M. amazonicum*, which are closely related and syntopic species, and also to assess the phylogenetic relationship between them. These species are very interesting because they were recently introduced in our river basins, and currently, they are widely distributed in our region.

RAPD-PCR was chosen because it is considered to be a means of rapidly detecting genetic polymorphisms. Among the many molecular methods currently available for genetic studies, it appears particularly suitable for analysis of any species, revealing a high degree of polymorphism in many cases (Williams et al., 1990; Garcia et al., 1998; Castiglioni and de Campos Bicudo, 2005; Roratto et al., 2008; Cesniene et al., 2010; Nath et al., 2010). The method uses PCR with a single short oligonucleotide primer that randomly amplifies short fragments of genomic DNA, separated by size, with agarose gel electrophoresis. Because the RAPD technique explores many loci, it is considered to be appropriate for analysis of genetic distance and phylogenetic relationships.

## MATERIAL AND METHODS

### Sample sources and DNA extraction

DNA was extracted from *Macrobrachium* species collected at the following localities: *M. amazonicum* (Ma) and *M. jelskii* (Mj) were collected from the Barra Mansa Dam, Mendonça, São Paulo State, Brazil (21°14'27"S; 49°56'28"W). *M. brasiliense* (Mb) samples were obtained from the Talhadinho Stream, Talhados, São Paulo State, Brazil (20°47'07"S; 49°20'35"W). The outgroup was *Potimirin glabra* (Pg), collected in Ubatuba, São Paulo State, Brazil (23°26'13"S; 45°04'08"W). DNA was individually extracted from 42 adults of each *Macrobrachium* species studied and 12 individuals of *P. glabra*, used as an outgroup.

Genomic DNA was prepared as described by Dellaporta et al. (1983), with modifications adapted by Castiglioni and de Campos Bicudo (2005). Approximately 1g muscle tissue was homogenized in microtubes with 160 µL cold solution I (10 mM Tris, 60 mM NaCl, 5% sucrose, 10 mM EDTA, pH 7.8). After adding 200 µL solution II (300 mM Tris, 1.25% SDS, 5% sucrose, 10 mM EDTA, pH 8.0), the homogenate was mixed and the tube placed in a water bath at 65°C for 30 min. Next, 60 µL 3 M sodium acetate was added and the tube was cooled at -20°C for 20 min. After centrifugation twice for 15 min at 13,000 rpm, an equal volume of isopropanol was added to the recovered aqueous phase, and the sample was maintained at room temperature for 5 min. After another centrifugation for 10 min at 13,000 rpm, the pellet was rinsed with 70% ethanol, dried at room temperature and resuspended in 100 µL TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0).

## Primers and amplification reaction

DNA was amplified using 10 random decamer primers (selected among 20 previously tested for the quality of bands produced) whose base sequences are in Table 1. The primers used were Operon-RAPD® 10 mer obtained from Operon Technologies (Alameda, CA, USA).

**Table 1.** Nucleotide sequences of the 10 RAPD primers used in the present study.

Primer	Nucleotide sequence 5'-3'
02	GTT GCG TTC C
08	GTG ACG TAG G
09	TAC CGA AGC C
10	GTG ATC GCA G
11	CAA TCG CCG T
13	CAG CAC CCA C
14	TCT GTG CTG G
15	TTC CGA ACC C
18	AGG TGA CCG T
20	GTT GCG ATC C

The amplification reaction was performed in a 25- $\mu$ L volume containing 2.5 U Taq DNA polymerase (Biotools), 20 mM Taq DNA polymerase buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.2  $\mu$ M primer, 25 ng genomic DNA and sterile MilliQ water. Amplifications were performed using an Eppendorf Thermocycler. The reaction profile was: 94°C for 3 min; 45 cycles for 30 s at 94°C, 1 min at 35°C and 2 min at 72°C, and 5 min at 72°C. The amplification was submitted to electrophoresis on a 1.5% agarose gel at 70 V for 2 h, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The DNA marker used on the gel to determine fragment sizes was 1-kb DNA ladder (GE Healthcare Life Science do Brasil, Ltda.). The size of each fragment was estimated in bp, by finding the distance between its location and the location of the band closest to the DNA ladder.

We took precautions in relation to the factors that can affect reproducibility of RAPD profiles by keeping the experimental conditions constant and by avoiding contaminations. Besides, only the bands with frequencies of at least 10% were considered, in order to avoid bands possibly resulting from non-specific amplification (Castro and Madi-Ravazzi, 2000; Castiglioni and de Campos Bicudo, 2005).

We also performed experiments to verify the polymorphism pattern generated by each of the 10 primers used in this study. Each individual that showed all the bands generated by each primer was selected, and DNA was amplified again by PCR, under the same previously standardized conditions. After electrophoresis, also conducted under the same conditions described above, the amplified bands were analyzed and the results compared with the previous analysis in order to establish and confirm the genetic profile generated for each species by each primer.

## Data analysis

For detecting genetic relatedness between species, a data matrix for all primers was produced, with each individual being represented as a vector of 1 and 0 (for the presence or absence of a fragment, respectively). In the phylogenetic analysis, the PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony 4.0, beta version) program developed by Swofford (2000)

was used. This analysis was performed using the neighbor-joining algorithm and bootstrap proportions (1000 replicates) that determine the confidence level in each node of the phylogenetic trees. The trees were rooted by adding *P. glabra* as an outgroup. The genetic similarity was computed on the basis of shared bands, as described by Nei and Li (1979). The similarity indices were calculated separately for each primer and for the complete set of primers using the mean similarity indices.

## RESULTS

The results obtained herein refer to the amplification product produced by using 10 random decamer primers in three shrimp species analyzed in this study, plus the external group. The polymorphic fragments generated by the RAPD-PCR technique were confirmed from experiments carried out to obtain a genetic profile generated by each primer, in each species.

A total of 182 fragments were obtained, with molecular weights varying from 2.40 to 0.30 kb. As shown in Table 2, the amplification product resulted in totals of 68, 65, 74, and 71 fragments in species Mj, Ma, Mb, and Pg, respectively. Primer 9 was the most polymorphic, producing a total of 25 different bands, while primer 18 was the least polymorphic, producing a total of 11 different bands.

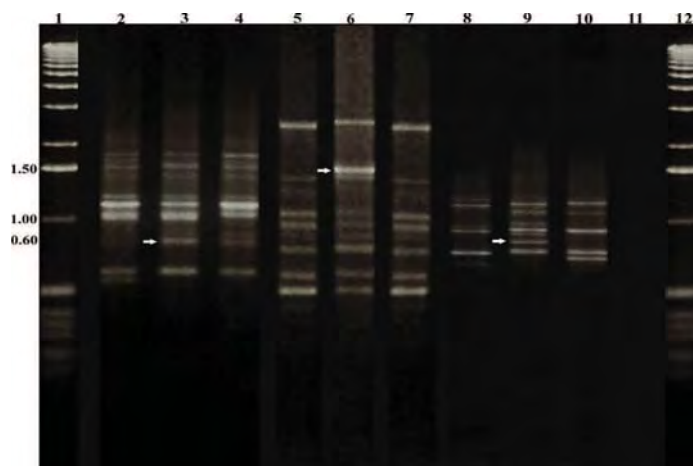
**Table 2.** Number of amplified bands scored with RAPD primers in all *Macrobrachium* species and in the outgroup.

Primer	Total number of bands	Species			
		Mj	Ma	Mb	Pg
02	23	6	10	9	12
08	22	5	7 (1)	7	10
09	25	8	6	8	7
10	14	8	6 (1)	6	3
11	21	9 (1)	10	8	12
13	15	8	9	9	6
14	15	8	5	5	3
15	19	7	6	7	7
18	11	3	4	9	2
20	17	6	2	6	9
Total	182	68	65	74	71

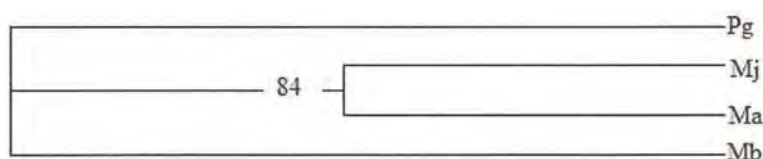
In parentheses is the number of monomorphic and exclusive bands produced by individual primers in Mj and Ma. Mj = *M. jelskii*; Ma = *M. amazonicum*; Mb = *M. brasiliense*; Pg = *Potimirin glabra*.

Of all the fragments obtained, three can be utilized as specific markers for Mj and Ma, since they were monomorphic (visualized in 100% of the individuals analyzed), and exclusive to one or the other species: a fragment of 0.60 kb generated by primer 08, exclusive to Ma; a fragment of 1.50 kb, generated by primer 10, also exclusive to this species, and a 0.60-kb fragment, the amplification product of primer 11, exclusive to Mj (Table 2; Figure 1).

For the phylogenetic analysis, based on data obtained in the present study, evaluated discretely (presence/absence), the bootstrap method was utilized with a neighbor-joining search (PAUP 4.0 program). The analyses were carried out using 182 fragments obtained by the RAPD-PCR technique, producing the phylogenetic tree shown in Figure 2. This figure reveals that Mb constitutes a more peripheral branch, therefore being the most differentiated of the three species in the study, jointly with the outgroup Pg. Mj and Ma were found to be phylogenetically closer, comprising sister branches, with a highly significant dichotomy position (84%).



**Figure 1.** Agarose gel (1.5%) showing the different banding pattern observed among *Macrobrachium* species using the primer 08 (lanes 2-4), primer 10 (lanes 5-7) and primer 11 (lanes 8-10). Lanes 1 and 12: Molecular weight markers (1-kb DNA ladder). Mj: lanes: 2, 5 and 9; Ma: lanes 3, 6 and 8; Mb: lanes 4, 7 and 10. Lane 11: Negative control (without DNA). The white arrows indicate the monomorphic bands, exclusive to Ma or Mj. Mj = *M. jelskii*; Ma = *M. amazonicum*; Mb = *M. brasiliense*.



**Figure 2.** Phylogenetic tree produced by the PAUP 4.0 program for fragments obtained with all primers together. Pg = *Potimirin glabra* (as the outgroup); Mj = *Macrobrachium jelskii*; Ma = *M. amazonicum*; Mb = *M. brasiliense*.

Table 3 displays mean similarity indices, calculated for the species analyzed in the present study, with two-by-two comparison, also including the external group. The calculation of the indices took into account the number of bands shared between any two species and the total number of bands present in each species compared, carried out for each primer. Afterward, the mean values were calculated, as specified in this table.

From the analysis of these data, we can observe a greater similarity between Mj and Ma (0.4903), and a lesser one between Mj and Mb (0.4363). In the same manner, the comparison between Ma and Mb showed a lower similarity index (0.4304) than that obtained with the Mj-Mb comparison. These values indicate the existence of a greater genetic proximity between Mj and Ma.

**Table 3.** Similarity indices (Nei and Li, 1979) between *Macrobrachium* species and between each of them and the outgroup *Potimirin glabra*.

	Mj	Ma	Mb	Pg
Mj	1			
Ma	0.4903	1		
Mb	0.4363	0.4304	1	
Pg	0.1977	0.1988	0.1907	1

Mj = *M. jelskii*; Ma = *M. amazonicum*; Mb = *M. brasiliense*; Pg = *Potimirin glabra*.

## DISCUSSION

Understanding the evolution of species requires a description of intra- and interspecific variability and the ability to distinguish the potential causes of the observed distribution of variation (Cognato et al., 1995).

Thus, one of the current challenges in biology is to organize the large amount of molecular data available so as to elucidate how the organisms are related and how they have been derived from the evolutionary process. Among the methodologies available, the RAPD-PCR technique has been amply utilized in different organisms, due to its aforementioned characteristics, with results considered important for this objective (Garcia et al., 1998; Iqbal et al., 2007; Camargo Jr. et al., 2007; Roratto et al., 2008; Guerra Jr. et al., 2010).

In the present study, the RAPD technique was employed to study the genetic variability in three shrimp species of the genus *Macrobrachium*, utilizing *P. glabra* as the outgroup, and 10 random decamer primers previously selected from a kit containing 20 primers. As already mentioned, only the bands with a frequency of at least 10% were considered, in an attempt to avoid including bands with non-specific amplification (Castro and Madi-Ravazzi, 2000; Castiglioni and de Campos Bicudo, 2005). In this manner, 182 fragments were obtained from the species analyzed, varying from 2.40 to 0.30 kb, with Mb being the most polymorphic (74 fragments) followed by Mj (68 fragments) and Ma (65 fragments). In the Pg external group, 71 fragments were observed by RAPD-PCR.

Our interest in analyzing the genetic variability of these species arises not only from their economic and ecological importance, as emphasized in previous studies, but also from the paucity of studies on their biology, from the syntopic and taxonomic difficulties in their identification, and from the fact that Mj and Ma have been introduced into our region (Kensley and Walker, 1982; Magnusson et al., 1987).

Currently, the identification of these species is based on the observation of a few morphological aspects based on the terminus of the telson (Melo, 2003). Nevertheless, such characteristics are difficult to visualize due to the small size of individuals and to the anatomical structures considered. Even so, this situation is aggravated by the fact that these are syntopic species, where these characteristics are even more diminutive in their young immature forms. These factors, taken together, have led to some hypotheses that they are only a single species, meta-populations or, even, interspecific hybrids (Taddei FG, personal communication). However, as already noted, literature data that address and clarify these doubts, unfortunately, do not yet exist.

One of the applications of the RAPD-PCR technique is obtaining specific molecular markers capable of diagnosing populations and species, for taxonomic reasons. As important characteristics, such markers must be exclusive to the species in question and preferentially monomorphic, that is, found with 100% frequency among the individuals analyzed (Castiglioni and de Campos Bicudo, 2005; Rampelotti et al., 2008; Rahman et al., 2009).

One of the objectives of the present study, as already stated, was to obtain good RAPD-PCR markers capable of identifying the species studied, principally Mj and Ma, which are syntopic and morphologically very similar. Thus, two bands were found exclusive to Ma, generated by the primers 08 and 10, and one band exclusive to Mj, generated by primer 11, all monomorphic. According to the characteristics shown by these bands, they may be considered good markers able to diagnose Mj and Ma, syntopic species that show taxonomic identification difficulties based only on morphological characteristics, due to the high level of morpho-



logical similarity between these two species. Furthermore, according to studies conducted by Taddei et al. (2006) and Sampaio et al. (2007), there is ample diversity in size among the individuals of the same population and also among different populations, depending on environmental variations, which can hinder their identification even more.

The RAPD-PCR technique has been successfully utilized in studies with taxonomic aims. Wilkerson et al. (1995) utilized the RAPD technique to differentiate four cryptic species of the complex *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*, distributed in Brazil, Paraguay and Argentina. According to these authors, the correct identification of mosquitoes belonging to the genus *Anopheles* is an important prerequisite for epidemiological studies involving the planning and monitoring of programs for control and eradication.

Castro and Madi-Ravazzi (2000) tested the taxonomic potential of the RAPD technique in species of *Drosophila* belonging to the group *buzzatii*, since there are intriguing aspects related to the speciation process in this group. Several lineages of *D. buzzatii*, *D. seriema*, *D. koepferae*, and *D. serido* were analyzed. The polymorphism detected permitted recognition of different lineages and species and confirmed the existent phylogenetic relationship between them.

The fact that the RAPD-PCR technique is capable of simultaneously exploring many gene loci highlights the need for studies on genetic distance, phylogenetic relationships and genetic identity among populations and species, to obtain data that enable the characterization of the origin and dispersion of organisms and detection of individuals and populations genetically resistant to diverse chemicals including insecticides (Garcia et al., 1998; Castiglioni and de Campos Bicudo, 2005; Cesniene et al., 2010).

In another study, Castiglioni and de Campos Bicudo (2005) genetically characterized, by RAPD-PCR, populations of *Haematobia irritans* (horn fly), an important bovine parasite. Four Brazilian populations were analyzed (Rio Branco, AC; Cassilândia, MS; Turiúba, and São José do Rio Preto, SP, Brazil) as well as an additional one from the United States (Kerrville, TX, USA). In addition to genetically characterizing these populations by the presence of specific fragments, it was possible, based on the data obtained, to evaluate the phylogenetic relationships between them, thus confirming the advantages of using the RAPD-PCR technique as a molecular tool in genetic analysis of populations.

In the present study, the results obtained with RAPD were also utilized to infer genetic similarity and notable phylogenetic relationships between the species analyzed. The mean similarity indices were calculated according to Nei and Li (1979) and confirmed the same genetic proximity as shown in the phylogenetic tree.

The phylogenetic tree, obtained via parsimony utilizing the neighbor-joining algorithm and applying the bootstrap method (Swofford, 2000), showed results of good reliability based on the attainment of a highly significant dichotomy (84%). Analysis of this tree, together with the calculations of the mean similarity indices, reveals that Mb constituted the most peripheral branch, therefore being the most differentiated of the three species in the study, jointly with the Pg external group. Mj and Ma were found to be phylogenetically closer, constituting sister branches.

The greater phylogenetic proximity between Mj and Ma, and their distance from Mb, based on the data obtained in the present study, can be explained by two important factors that must be discussed.

First, we may highlight the different habitat conditions in which these species are found. As already mentioned, individuals of the Mb species were collected from the Talhadinho Stream, whereas the other two species, Mj and Ma, were gathered from the Barra Mansa Dam. The fact

that gene flow must be more intense in a stream environment in comparison to a dam, which supposedly is more isolated from other geographical areas, may explain the greater differentiation of Mb in relation to the other species. It is known that such isolation leads to inbreeding and loss of genetic variability in populations and species due to genetic drift (Shikano et al., 2010).

Another important factor is the introduction of Mj and Ma into hydrographic basins in the Brazilian State of São Paulo. Machado (1966) and Torloni et al. (1993) confirmed that between 1966 and 1973, *M. jelskii* and *M. amazonicum* were introduced into a CESP (Companhia Energética de São Paulo) aquaculture breeding station as part of the process to cultivate the fish *Plagioscion squamosissimus*, which originated from reservoirs in northeastern Brazil. Around 1970, probably by accident, these species reached the natural environment, initially in the Pardo River, next arriving in the Grande River and the reservoirs of Jupuíá and Ilha Solteira, in the upper Paraná River. Another possibility posited by these authors is the recreational practice of “fish-pay”, which utilizes these shrimp as live bait, and in many cases results in the release of unused specimens into the environment. Furthermore, larval, juvenile or other immature forms of these decapods can be transported inadvertently, associated with the roots of aquatic plants utilized to house and protect fishes in the reservoirs.

According to Magalhães et al. (2005), the hydrographic basins in the State of São Paulo have suffered severe anthropogenic interventions that have drastically modified the aquatic biota. The introduction of alien species into a particular environment can alter its genetic structure. The founder effect is a “bottleneck” phenomenon which, together with genetic drift, can diminish the available genetic variability. According to Bain (2006), the loss of genetic patrimony leads to hybridization in aquatic environments. As we mentioned previously, the high morphological similarity between Mj and Ma can indicate a probable mechanism of hybridization or formation of metapopulations (Taddei FG, personal communication).

According to Haag et al. (2006), the study of the genetic structure of metapopulations can offer important insights into the origin and destination of a species, and this study can be greatly influenced by three consequences of the founder effect: a) strong pressure from genetic drift during colonization; b) local inbreeding, which can result in hybridization and elevated rates of migration after subsequent immigration, and c) selection effects through the association of neutral genes with linked loci under selection.

In the present study, despite finding three specific RAPD-PCR markers capable of diagnosing Mj and Ma, the analysis of the similarity indices and phylogenetic tree generated by the parsimony method showed high genetic similarity among them, consistent with the probable conditions of metapopulations or of interspecific hybrids. However, as there are no other researches in the literature to corroborate these possibilities, other molecular studies and an analysis of individuals from other geographic areas are needed to resolve these doubts and to comprehend the relevant aspects of the founder event in the introduction of these species into our region.

The low level of genetic differentiation between Mj and Ma calls attention to the need for the creation of management policies that can minimize this problem and also prioritize the maintenance of endemic species. Several studies have demonstrated the importance of maintaining endemic or native species in the conservation and recovery of natural areas as constituting a fundamental aspect of preserving the biodiversity of ecosystems and improving our understanding of their biotic and abiotic interaction processes (Pérez et al., 2003; Facon et al., 2005; Magalhães et al., 2005; Roman, 2006; Heborg et al., 2007).

Nevertheless, despite the awareness of this problem, there are still no works in the



literature that report on the environmental impacts, economic problems or even the possible alterations in the genetic structure of these organisms, in relation to their introduction into a different environment.

In this context, studies on genetic polymorphisms that determine the genetic structure of populations and species, utilized to better understand evolutionary, demographic or ecological factors, are very important to the conservation of these groups and constitute an essential field within the genetics of populations and conservation (Eizirik, 1996; Frankham, 2005).

We conclude that the present data obtained by the RAPD technique provide useful information on *Macrobrachium* species, thus enabling their genetic characterization and differentiation. These findings may be useful in further studies on these important crustacean species. This study must be complemented by other studies so that, over time, it will be possible to answer the questions related to the variability and differentiation among these species.

## ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by FAPESP and UNIRP (Centro Universitário de Rio Preto). We thank Dr. Claudia Márcia A. Carareto for analyzing the data using the PAUP 4.0 program.

## REFERENCES

- Bain MB (2006). Assessing impacts of introduced aquatic species: Grass carp in large systems. *Environ. Manage.* 17: 211-224.
- Camargo OA Jr, Souza EA, Mendes-Costa MC, Santos JB, et al. (2007). Identification of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* recombinants by RAPD markers. *Genet. Mol. Res.* 6: 607-615.
- Castiglioni L and de Campos Bicudo HE (2005). Molecular characterization and relatedness of *Haematobia irritans* (horn fly) populations, by RAPD-PCR. *Genetica* 124: 11-21.
- Castro JP and Madi-Ravazzi L (2000). RAPD as genetic marker in taxonomic and evolutionary studies in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Drosophila Inf. Serv.* 83: 26-32.
- Cesniene T, Kleizaite V, Ursache R, Zvingila D, et al. (2010). Soil-surface genotoxicity of military and urban territories in Lithuania, as revealed by *Tradescantia* bioassays. *Mutat. Res.* 697: 10-18.
- Cognato AI, Rogers SO and Teale SA (1995). Species diagnosis and phylogeny of the *Ips grandicollis* group using random amplified polymorphic DNA. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 397-405.
- Dellaporta SL, Wood J and Hicks J (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Eizirik E (1996). Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Rev. Bras. Genet.* 19 (Suppl): 23-29.
- Facon B, Jarne P, Pointier JP and David P (2005). Hybridization and invasiveness in the freshwater snail *Melanoides tuberculata*: hybrid vigour is more important than increase in genetic variance. *J. Evol. Biol.* 18: 524-535.
- Frankham R (2005). Stress and adaptation in conservation genetics. *J. Evol. Biol.* 18: 750-755.
- García AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Stothard JR, et al. (1998). Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 35: 38-45.
- Guerra JC Jr, Issa MR, Carneiro FE, Strapazzon R, et al. (2010). RAPD identification of *Varroa destructor* genotypes in Brazil and other regions of the Americas. *Genet. Mol. Res.* 9: 303-308.
- Haag CR, Riek M, Hottinger JW, Pajunen VI, et al. (2006). Founder events as determinants of within-island and among-island genetic structure of *Daphnia* metapopulations. *Heredity* 96: 150-158.
- Heborg LM, Weetman D, Oosterhout C and Hanfling B (2007). Genetic population structure and contemporary dispersal patterns of a recent European invader, the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Mol. Ecol.* 16: 231-242.
- Iqbal A, Khan AS, Khan IA, Awan FS, et al. (2007). Study of genetic divergence among wheat genotypes through random amplified polymorphic DNA. *Genet. Mol. Res.* 6: 476-481.
- Kensley B and Walker I (1982). Palaemonid shrimps from the Amazon Basin, Brazil (Crustacea: Decapoda: Natantia). *Smithsonian Contrib. Zool.* 362: 1-28.

- Machado CEM (1966). Estações experimentais de biologia e piscicultura em represas da CESP. *Tech. Rep.* 1: 1-12.
- Maciel CR and Valenti WC (2009). Biology, fisheries and aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. *Nauplius* 17: 61-79.
- Magalhães C (2000). Abbreviated larval development of *Macrobrachium jelskii* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) from the Rio Solimões floodplain, Brazil, reared in the laboratory. *Nauplius* 8: 1-15.
- Magalhães C, Bueno S, Bond G, Valenti WC, et al. (2005). Exotic species of freshwater decapod crustaceans in State of São Paulo, Brazil: records and causes of their introduction. *Biod. Conserv.* 14: 1929-1945.
- Magnusson WE, Vieira E and Lima AP (1987). Diets of Amazonian crocodilians. *J. Heredity* 21: 85-95.
- Martin JW and Davis GE (2001). An updated classification of the recent crustacea. *Nat. Hist. Mus.* 39: 1-124.
- Melo GAS (2003). Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de Água Doce do Brasil. Edições Loyola, Museu de Zoologia, São Paulo.
- Moraes-Valenti PMC and Valenti WC (2007). Effect of intensification on grow-out of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *J. World Aquacult. Soc.* 38: 516-526.
- Moraes-Valenti P and Valenti WC (2010). Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: *Freshwater Prawns: Biology and Farming* (New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'Abramo LR, et al., eds.). Oxford, Wiley-Blackwell, 485-501.
- Nath G, Maurya P and Gulati AK (2010). ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella typhi* strains isolated over a period of two decades. *Infect. Genet. Evol.* 10: 530-536.
- Nei M and Li WH (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 5269-5273.
- Pérez JE, Salazar SK, Alfonsi C and Ruiz L (2003). Ictiofauna del Río Manzanares: A cuatro décadas de la introducción de *Oreochromis mossambicus*. *Bol. Inst. Oceanogr. Venez.* 42: 29-35.
- Rahman SMZ, Khan MR, Islam S and Alam S (2009). Genetic variation of wild and hatchery populations of the catla Indian major carp (*Catla catla* Hamilton 1822: Cypriniformes, Cyprinidae) revealed by RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* 32: 197-201.
- Rampelotti FT, Ferreira A, Tcacenco FA, Martins JF, et al. (2008). Genetic diversity of *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil, using RAPD. *Neotrop. Entomol.* 37: 20-29.
- Roman J (2006). Diluting the founder effect: cryptic invasions expand a marine invader's range. *Proc. Biol. Sci.* 273: 2453-2459.
- Roratto PA, Buchmann D, Santos S and Bartholomei-Santos ML (2008). PCR-mediated recombination in development of microsatellite markers: mechanism and implications. *Genet. Mol. Biol.* 31: 58-63.
- Sampaio CM, Silva RR, Santos JA and Sales SP (2007). Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). *Braz. J. Biol.* 67: 551-559.
- Shikano T, Shimada Y, Herczeg G and Merila J (2010). History vs. habitat type: explaining the genetic structure of European nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*) populations. *Mol. Ecol.* 19: 1147-1161.
- Swofford DL (2000). PAUP 4.0. Phylogenetics Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- Taddei FG, Fransozo A, Costa RC, Cobo VJ, et al. (2006). Biologia Populacional e Crescimento dos Camarões Palemonídeos *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) e *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1868) (Crustacea: Caridea) na Região Noroeste do Estado de São Paulo. Tese (Doutorado em Biológicas), Instituto de Biociências, Botucatu.
- Torloni CEC, Corrêa ARA, Carvalho-Junior AA and Santos JJ (1993). Produção Pesqueira e Composição das Capturas em Reservatórios Sob Concessão da CESP nos Rios Tietê, Paraná e Grande no Período de 1986 a 1991. Série Produção Pesqueira, São Paulo, 1-73.
- Valenti WC (1993). Freshwater prawn culture in Brazil. *World Aquacult.* 24: 30-34.
- Wilkerson RC, Gaffigan TV and Bento LJ (1995). Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90: 721-732.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, et al. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.