

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 05/05/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Câmpus de Botucatu

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia

Tese de Doutorado

A análise interdisciplinar comparativa entre os camarões *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) e *Macrobrachium pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013 suporta a diferenciação interespecífica?

Caio dos Santos Nogueira

Orientador: Prof. Dr. Rogerio Caetano da Costa

Coorientador: Prof. Dr. João Alberto Farinelli Pantaleão

Botucatu – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Câmpus de Botucatu

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia

A análise interdisciplinar comparativa entre os camarões *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) e *Macrobrachium pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013 suporta a diferenciação interespecífica?

Caio dos Santos Nogueira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Câmpus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Rogerio Caetano da Costa

Coorientador: Prof. Dr. João Alberto Farinelli Pantaleão

Botucatu – SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Nogueira, Caio dos Santos.

A análise interdisciplinar comparativa entre os camarões *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) e *Macrobrachium pantanalense* (Dos Santos, Hayd & Anger, 2013) suporta a diferenciação interespecífica? / Caio dos Santos Nogueira. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rogerio Caetano da Costa

Coorientador: João Alberto Farinelli Pantaleão

Capes: 20402007

1. Hibridização. 2. Morfometria. 3. Reprodução animal. 4. Larvas - Anfíbios (Crustáceos, peixes, invertebrados, etc.) 5. Zoologia - Classificação.

Palavras-chave: Desenvolvimento larval; Hibridização; Morfometria geométrica; Sistema reprodutor; Taxonomia integrativa.

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha gratidão ao Prof. Dr. Rogerio Caetano da Costa por confiar em mim e ter me concedido a oportunidade de desenvolver esse trabalho. Além disso, agradeço sinceramente pelos seus valiosos conselhos e orientações ao longo dos últimos seis anos. Estou confiante de que essa experiência será fundamental para o meu desenvolvimento profissional no futuro.

Gostaria de agradecer ao meu coorientador, Prof. Dr. João Alberto Farinelli Pantaleão, por sua ajuda desde a época do mestrado e por ter me ensinado muito sobre o mundo dos crustáceos e do mundo científico em geral. Obrigado por ter aceitado coorientar minha Tese e por ter concordado com a ideia da temática. Sem sua ajuda, este trabalho não teria sido concluído.

Gostaria de expressar minha gratidão ao Prof. Dr. Fernando José Zara, que mais uma vez aceitou colaborar comigo em outro projeto. Muito obrigado pelos conselhos e dicas, não só no capítulo do qual teve participação direta, mas também por todas as discussões que tivemos sobre minha pesquisa. Sua contribuição foi essencial para a conclusão deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a qual financiou a execução minha Tese diretamente pelo processo 2019/00661-3, e também pelo Projeto Temático Biota INTERCRUSTA, processo 2018/13685-5.

Ao Ministério do Meio Ambiente e ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por conceder a licença para coleta de material nas áreas de estudo.

Ao Instituto de Biociências – IB e à Pós-Graduação em Ciências Biológicas Zoologia da UNESP de Botucatu e ao Departamento de Biodiversidade e Bioestatística.

Ao Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru, o qual o Laboratório de Biologia de Camarões (LABCAM) é vinculado.

A toda minha família, e em especial à minha mãe e meu irmão, por todo o apoio e suporte nas minhas decisões desde que decidi trilhar esse caminho.

A minha namorada Natalia, por toda paciência, apoio e conselhos que me concedeu ao longo desses longos anos de pós-graduação, muito obrigado por tudo. Sem você nada seria possível.

Aos meus irmãos de vida, Isabela e Rafael. Muito obrigado por sempre estarem ao meu lado nesses últimos anos, vocês tiveram um papel fundamental no desenvolvimento desse trabalho. Espero que nossa amizade perdure e que todos nós consigamos atingir nossos objetivos de vida.

Ao meu grande amigo e parceiro de pesquisa, Alexandre (Dino). Muito obrigado por toda a ajuda nesses últimos quatro anos. Espero que continuemos animados, e trabalhando juntos com nossa empolgação pelas “armas”.

A segunda família que ganhei nesses últimos anos graças a Rep. do Amor. Abner, Bruno (Sushi), Gabriel, Milena, Rafael e Victor, vocês são muito especiais para mim.

Aos amigos que ganhei durante esses anos de pós-graduação, Alexandre (Seu Jorge), Bruno Tayar, Gabriel, Giovana, Júlia, Lizandra, Lucas (Marginal), Mariana (Magrela) e Régis, por todos os momentos que passamos juntos, fazendo com que meus dias fossem mais alegres.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia de Camarões (LABCAM - UNESP/FC), desde os antigos aos mais novos, vocês foram fundamentais durante todos esses anos.

A todos os integrantes do Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML - UNESP/FCAV), Barbara, Camila, Fernanda, Lucas, Marcia e Maria Alice, por me acolherem tão bem e pela grande ajuda no desenvolvimento do meu mestrado e doutorado.

Aos integrantes do Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC – USP/FFCLRP), por me recepcionarem tão bem nas minhas visitas ao laboratório durante o meu doutorado.

Mais uma vez, muito obrigado a todos.

Sumário

Resumo	1
Considerações iniciais	2
Referências	4

CAPÍTULO I: Hybridization experiments between the freshwater prawns *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) and *M. pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013 (Decapoda: Palaemonidae)

Artigo: Hybridisation experiments between freshwater prawns <i>Macrobrachium amazonicum</i> and <i>M. pantanalense</i> (Decapoda: Palaemonidae), and the effects of geographical isolation	9
---	---

CAPÍTULO II: Variation in body structure shape as a tool for discriminating between the freshwater prawns *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) and *M. pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013 (Caridea: Palaemonidae)

Artigo: Elucidating taxonomic problems of two closely related freshwater prawn lineages of the genus <i>Macrobrachium</i> (Caridea: Palaemonidae): A geometric morphometrics approach	10
--	----

CAPÍTULO III: Male reproductive system of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) and *M. pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013: new insights into the analysis of sperm morphology in crustaceans

Abstract	11
Introduction	12
Material and methods	14
<i>Anatomy and histology of the male reproductive system</i>	15
<i>Ultrastructure of the spermatozoa</i>	16
<i>Linear and geometric morphometrics of spermatozoa</i>	16
Results	18
<i>Anatomy of the male reproductive system</i>	18
<i>Spermatozoa ultrastructure under TEM</i>	20
<i>Histological and histochemical analyses</i>	21
<i>Spermatozoa morphometrics</i>	25
<i>Micrographic documentation</i>	27
Discussion	48
<i>Anatomy and histochemistry of the male reproductive system</i>	48
<i>Morphology, morphometry, and ultrastructure of spermatozoa</i>	51
References	55

CAPÍTULO IV: Morphology and morphometrics of larvae of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) and *M. pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013: a comparative approach among different lineages and phenotypes

Abstract	65
Introduction	66
Material and methods	69
<i>Sampling of ovigerous females and cultivation of larvae</i>	69
<i>Description and comparison of larval morphology</i>	70
<i>Larval morphometrics</i>	71
Results	72
<i>Larval morphology</i>	74
<i>Larval morphometrics</i>	89
Discussion	90
References	94
Considerações finais	103

Resumo

Macrobrachium amazonicum e *M. pantanalense* são duas espécies de camarões dulcícolas proximamente relacionadas que ocorrem no Brasil. *Macrobrachium pantanalense* é uma espécie endêmica das regiões pantaneiras, e constituía um clado presente dentro do complexo de *M. amazonicum*. A descrição dessa linhagem como espécie gerou controvérsias quanto a sua validade, principalmente pela alta semelhança morfológica com *M. amazonicum* e por conta do baixo distanciamento genético entre as espécies. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar se ferramentas comumente utilizadas na taxonomia integrativa suportam a existência de *M. pantanalense*. Foram utilizadas quatro ferramentas; experimentos de hibridização, morfometria geométrica, descrição da anatomia do sistema reprodutor masculino (SRM) e ultraestrutura do espermatozoide, e morfologia e morfometria larval. Em todas essas abordagens integrativas foram observadas diferenças interespecíficas. Nos experimentos de hibridização, foi constatado um isolamento reprodutivo entre esses organismos, portanto, essas espécies não copulam naturalmente. A morfometria geométrica evidenciou diferenças no formato em cinco estruturas taxonomicamente relevantes. Não houve diferença na morfologia do SRM, entretanto, ocorreram variações histoquímicas nas secreções que compõem o espermatóforo. O formato do espermatozoide apresentou variações entre as duas espécies. As larvas apresentaram variações heterocrônicas e morfométricas ao longo do seu desenvolvimento. Desse modo, essas análises integrativas demonstram que ocorrem variações entre traços biológicos de *M. amazonicum* e *M. pantanalense*, sustentando a separação de ambas as linhagens. Evidentemente, algumas dessas diferenças são sutis, o que pode estar correlacionado ao fato de que o processo de especiação entre esses grupos seja recente.

Palavras-chave: Hibridização; Morfometria geométrica; Sistema reprodutor; Desenvolvimento larval; Taxonomia integrativa

Abstract

Macrobrachium amazonicum and *M. pantanalense* are two closely related freshwater prawn species, the latter having been described from populations that were previously considered *M. amazonicum*. Distinguishing these two lineages from the available taxonomic description can be a complex task due to the morphological similarity of these organisms. In these cases, the investigation of morphological characters that help in the differentiation of these groups is of great value. Thus, the present study aimed to analyze taxonomically informative structures through geometric morphometrics analyses, evaluating the informative potential of these structures in the separation of these lineages. The selected structures were carapace, dactyl, propodus, scaphocerite and telson. The analyzed dactyl and propodus are from the second pair of pereopods (chelipeds). Three populations of each species were analyzed. All structures were photographed and marked with landmarks and semilandmarks for the acquisition of shape variables. The shape and size of all structures differed statistically between the two species, regardless of sex. Among the observed morphometric variations, the most evident were in the carapace and telson. In the carapace, the position of the first ventral tooth of the rostrum is different, while the posterior region of the telson is proportionally thinner in *M. amazonicum* and wider in *M. pantanalense*. Our results indicate that the carapace and the telson are informative structures that can help distinguish these two groups. Furthermore, our results support the proposal presented in other studies that *M. amazonicum* and *M. pantanalense* may be in a relatively recent process of speciation.

Keywords: Integrative taxonomy; *Macrobrachium amazonicum*; *Macrobrachium pantanalense*; Morphometry; Speciation

Link de acesso ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2023.03.003>

We have shown the occurrence of marked differences in several traits of the male reproductive system of *M. amazonicum* and *M. pantanalense*, specifically the composition of secretions from some regions of the *vasa deferentia* and also in the size and shape of the spermatozoa of both species. These results complement the findings on reproductive behavior and geometric morphometrics of taxonomically important structures, reinforcing that *M. amazonicum* and *M. pantanalense* are two distinct groups that have undergone a process of speciation.

References

Alfaro, J., Muñoz, N., Vargas, M., & Komen, J. (2003). Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeoid shrimps. *Aquaculture*, 216(1-4), 371-381.

Almón, B., Cuesta, J. A., Schubart, C. D., Armenia, L., & García-Raso, J. E. (2022). Redescription of the hermit crab *Diogenes pugilator* (Decapoda: Anomura) reveals the existence of a species complex in the Atlanto-Mediterranean transition zone, resulting in the resurrection of *D. curvimanus* and the description of a new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 195(4), 1116-1146.

Antunes, M., Zara, F. J., López Greco, L. S., & Negreiros-Fransozo, M. L. (2018). Male reproductive system of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* (Inachoididae). *Invertebrate Biology*, 137(2), 171-184.

Bauer, R. T., & Cash, C. E. (1991). Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Transactions of the American Microscopical Society*, 144-162.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Bode, S. N. S., Adolfsson, S., Lamatsch, D. K., Martins, M. J. F., Schmit, O., Vandekerkhove, J., Mezquita, F., Namiotko, T., Rosseti, G., Schon, I., Butlin, R. K., & Martens, K. (2010). Exceptional cryptic diversity and multiple origins of parthenogenesis in a freshwater ostracod. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2), 542-552.

Braga, A., Nakayama, C. L., Poersch, L., & Wasielesky, W. (2013). Unistellate spermatozoa of decapods: comparative evaluation and evolution of the morphology. *Zoomorphology*, 132(3), 261-284.

Brown, G. G. (1966). Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm—egg interaction in the decapod *Callinectes sapidus*. *Journal of Ultrastructure Research*, 14(5-6), 425-440.

Buranelli, R. C., Zara, F. J., & Mantelatto, F. L. (2014). Male reproductive system of the red brocade hermit crab *Dardanus insignis* (Diogenidae) and its relationship to other family members. *Zoomorphology*, 133(2), 127-137.

Butcher, A. R., & Fielder, D. R. (1994). The reproductive anatomy of male freshwater prawns *Macrobrachium australiense* (Holthuis, 1890) in southeast Queensland. *Invertebrate Reproduction & Development*, 26(3), 205-212.

Calixto-Cunha, M., Rodrigues, T. S., Ueira-Vieira, C., Alves, D. F. R., & de Almeida, A. C. (2021). Genetic and phenotypic variability in populations of the *Macrobrachium amazonicum* complex: new findings to the Upper Paraná Hydrographic Basin. *Zoologischer Anzeiger*.

Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2016). Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology*, 135(1), 67-81.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2017). Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod Structure & Development*, 46(4), 588-600.

Camargo, T. R., Wolf, M. R., Mantelatto, F. L., Tudge, C., & Zara, F. J. (2020). Ultrastructure of spermatozoa of members of Calappidae, Aethridae and Menippidae and discussion of their phylogenetic placement. *Acta Zoologica*, 101(1), 89-100.

Chow, S. (1982). Artificial insemination using preserved spermatophores in the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 48, 1693-1695.

Chow, S., Ogasawara, Y., Taki, Y. (1982). Male reproductive system and fertilization of the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 177–183.

Chow, S., Taki, Y., & Ogasawara, Y. (1989). Homologous functional structure and origin of the spermatophores in six palaemonid shrimps (Decapoda, Caridea). *Crustaceana*, 247-252.

Chow, S., Dougherty, M. M., Dougherty, W. J., & Sandifer, P. A. (1991). Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 11(2), 201-216.

Chow, S., & Sandifer, P. A. (2001). Sperm-egg interaction in the palaemonid shrimp *Palaemonetes vulgaris*. *Fisheries science*, 67(2), 370-372.

Dos Santos, A., Hayd, L., & Anger, K. (2013). A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. *Zootaxa*, 3700(3), 534-546.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Dougherty, W. J., Dougherty, M. M., & Harris, S. G. (1986). Ultrastructural and histochemical observations on electroejaculated spermatophores of the palaemonid shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *Tissue and Cell*, 18(5), 709-724.

Dupré, E., & Barros, C. (1983). Fine structure of the mature spermatozoon of *Rhynchocinetes typus*, Crustacea Decapoda. *Gamete Research*, 7(1), 1-18.

Fransozo, V., Fernandes, A. B., López-Greco, L. S., Zara, F. J., & Santos, D. C. (2016). Functional morphology of the male reproductive system of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) (Crustacea, Penaeidea) compared to other *Litopenaeus*. *Invertebrate reproduction & development*, 60(3), 161-174.

Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9.

Introini, G. O., Passos, F. D., & Recco-Pimentel, S. M. (2013). Comparative study of sperm ultrastructure of *Donax hanleyanus* and *Donax gemmula* (Bivalvia: Donacidae). *Acta Zoologica*, 94(3), 261-266.

Jamieson, B. G. M. (1991). Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. *Memoirs of the Queensland Museum*, 31, 109-142.

Junqueira, L. C. U., & Junqueira, L. M. M. S. (1983). *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. São Paulo, SP: Editora Santos.

Karplus, I., & Barki, A. (2019). Male morphotypes and alternative mating tactics in freshwater prawns of the genus *Macrobrachium*: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 925-940.

Kim, D. H., Jo, Q., Choi, J. H., Yun, S. J., Oh, T. Y., Kim, B. K., & Han, C. H. (2003). Sperm structure of the pandalid shrimp *Pandalopsis japonica* (Decapoda, Pandalidae). *Journal of Crustacean Biology*, 23(1), 23-32.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Lai, J. C., Ng, P. K., & Davie, P. J. (2010). A revision of the *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) species complex (Crustacea: Brachyura: Portunidae), with the recognition of four species. *Raffles Bulletin of Zoology*, 58(2).

López-Greco, L. S., Vazquez, F., & Rodríguez, E. M. (2007). Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater 'red claw' crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). *Acta Zoologica*, 88, 223–229.

Lynn, J. W., & Clark Jr, W. H. (1983). The fine structure of the mature sperm of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *The Biological Bulletin*, 164(3), 459-470.

Machado, M., Salti, F. C., Bertini, G., Zara, F. J., & Negreiros-Fransozo, M. L. (2021). Is *Potimirim potimirim* (Crustacea, Decapoda, Atyidae) a protandric hermaphrodite species? Behavioral and morphological aspects of the reproductive system. *Arthropod Structure & Development*, 63, 101060.

Mathews, L. M., & Anker, A. (2009). Molecular phylogeny reveals extensive ancient and ongoing radiations in a snapping shrimp species complex (Crustacea, Alpheidae, *Alpheus armillatus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(2), 268-281.

Medina, A., de La Rosa, I. L., & Santos, A. (1994). Ultrastructural comparison of the spermatozoa of *Sicyonia carinata* (Sicyoniidae) and *Penaeopsis serrata* (Penaeidae) shrimps (Crustacea, Dendrobranchiata), with particular emphasis on the acrosomal structure. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, 26, 395-395.

Medina, A., Mourente, G., de la Rosa, I. L., Santos, A., & Rodríguez, A. (1994). Spermatozoal ultrastructure of *Penaeus kerathurus* and *Penaeus japonicus* (Crustacea, Dendrobranchiata). *Zoomorphology*, 114(3), 161-167.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Medina, A., Scelzo, M. A., & Tudge, C. C. (2006). Spermatozoal ultrastructure in three Atlantic solenocerid shrimps (Decapoda, Dendrobranchiata). *Journal of Morphology*, 267(3), 300-307.

Mello, M. L. S., & Vidal, B. D. C. (1980). *Práticas de biologia celular*. Campinas, SP: Edgard Blücher – Funcamp.

Murphy, N. P., Short, J. W., & Austin, C. M. (2004). Re-examination of the taxonomy of the *Macrobrachium australiense* Holthuis (Decapoda: Palaemonidae) species-complex: molecular evidence for a single species. *Invertebrate Systematics*, 18(2), 227-232.

Niksirat, H., Kouba, A., Rodina, M., & Kozak, P. (2013). Comparative ultrastructure of the spermatozoa of three crayfish species: *Austropotamobius torrentium*, *Pacifastacus leniusculus*, and *Astacus astacus* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Morphology*, 274(7), 750-758.

Nogueira, C. S., Pantaleão, J. A. F., & Costa, R. C. (2020). Hybridisation experiments between freshwater prawns *Macrobrachium amazonicum* and *M. pantanalense* (Decapoda: Palaemonidae), and the effects of geographical isolation. *Marine and Freshwater Research*, 72(4), 520-525.

Nogueira, C. S., Antunes, M., Zara, F. J., & Costa, R. C. (2023). Male reproductive system of the freshwater prawn *Macrobrachium brasiliense* (Decapoda: Palaemonidae): Notes on spermatophore formation and sperm count. *Tissue and Cell*, 81, 102008.

Nunes, E. T., Braga, A. A., Santos, D. C., & Camargo-Mathias, M. I. (2010). Cytodifferentiation during the spermatogenesis of the hermaphrodite Caridea *Exhippolysmata oplophoroides*. *Micron*, 41, 585–591. DOI: 10.1016/j.micron.2010.04.005

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Oliveira, L. J. F., & Zara, F. J. (2018). An investigation into the male reproductive system of two freshwater crabs from the Amazon: is there a sperm plug or packet formation?. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 51(4), 227-249.

Oliveira, L. J. F., Tudge, C., & Zara, F. J. (2021). Comparative morphology of the spermatophores and spermatozoa of three Amazon freshwater crabs (Decapoda, Brachyura, Trichodactylidae). *Journal of Natural History*, 55(29-30), 1877-1893.

Paschoal, L. R. P., & Zara, F. J. (2018). Sperm count of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) populations with distinct life histories, with introduction of a simple counting method. *Aquaculture*, 491, 368-374.

Paschoal, L. R. P., & Zara, F. J. (2019). The androgenic gland in male morphotypes of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). *General and Comparative Endocrinology*, 275, 6-14.

Paschoal, L. R., & Zara, F. J. (2020). Size at onset of sexual maturity in *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) phenotypes: an integrative approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92.

Pavlov, D. A., & Emel'yanova, N. G. (2018). Comparative analysis of spermatozoa morphology in three fish species from the suborder Scorpaenoidei. *Journal of Ichthyology*, 58(2), 226-238.

Pearse, A. G. (1960). *Histochemistry, theoretical and applied*. London, UK: J. & A. Churchill Ltd.

Pitnick, S. S., Hosken, D. J., & Birkhead, T. R. (Eds.). (2008). *Sperm biology: an evolutionary perspective*. Academic press.

Poljaroen, J., Vanichviriyakit, R., Tinikul, Y., Phoungpetchara, I., Linthong, V., Weerachatanukul, W., & Sobhon, P. (2010). Spermatogenesis and distinctive mature

NOGUEIRA, C. S. (2023)

sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). Zoologischer Anzeiger, 249(2), 81-94.

Rao, C. N., Shakuntala, K., & Reddy, S. R. (1987). Histology of the male reproductive system of the prawn *Macrobrachium lanchesteri* (Crustacea: Decapoda). Journal of the Indian Institute of Science, 67(1&2), 29.

Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. The Journal of cell biology, 17(1), 208.

Rohlf, F. J. (2004). tpsUtil. Version 1.26. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook.

Rohlf, F. J. (2005). TpsDig. Version 2.04. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook.

Rohlf, F. J. (2009). TpsRegr, version 1.31. New York: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 10, 155.

Rohlf, F. J. (2010). TpsRelw v1. 49. Free software available. Available on: <http://morphometrics.org/morphmet.html> (accessed June 22, 2011).

Rossi, N., & Mantelatto, F. L. (2013). Molecular analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) supports the existence of a single species throughout its distribution. PLoS One, 8(1), e54698.

Sánchez, M.V., Bastir, M., & Roldan, E. R. (2013). Geometric morphometrics of rodent sperm head shape. PLoS One, 8(11), e80607.

Sasikala, S. L., & Subramoniam, T. (1987). On the occurrence of acid mucopolysaccharides in the spermatophores of two marine prawns, *Penaeus indiens* (Milne-Edwards) and *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) (Crustacea: Macrura). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 113(2), 145-153.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Simeó, C. G., Ribes, E., & Rotllant, G. (2009). Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Tissue and Cell*, 41(5), 345-361.

Smith, R. J., Matzke-Karasz, R., Kamiya, T., & De Deckker, P. (2016a). Sperm lengths of non-marine cypridoidean ostracods (Crustacea). *Acta Zoologica*, 97(1), 1-17.

Smith, R. J., Matzke-Karasz, R., & Kamiya, T. (2016b). Sperm length variations in five species of cypridoidean non-marine ostracods (Crustacea). *Cell and Tissue Research*, 366(2), 483-497.

Subramoniam, T. (1993). Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans. *Advances in Marine Biology*, 29, 129-214.

Siriwut, W., Jeratthitikul, E., Panha, S., Chanabun, R., & Sutcharit, C. (2020). Molecular phylogeny and species delimitation of the freshwater prawn *Macrobrachium pilimanus* species group, with descriptions of three new species from Thailand. *PeerJ*, 8, e10137.

Tan, M. M., Tudge, C., Penna-Díaz, M. A., & Thiel, M. (2020). Fertilization success in crustaceans from the male perspective: sperm ultrastructure and sperm economy. *The Natural History of the Crustacea: Reproductive Biology: Volume VI*, 60.

Terossi, M., Tudge, C., López-Greco, L. S., & Mantelatto, F. L. (2012). A novel spermatozoan ultrastructure in the shrimp *Hippolyte obliquimanus* Dana, 1852 (Decapoda: Caridea: Hippolytidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 56(4), 299-304.

Tiseo, G. R., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2014). Is cleistospermy and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*, 34(6), 704-716.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Tomas, A. L., Garcia Bento, M. A., Mutti, L. D., Zara, F. J., & López Greco, L. S. (2019). New insights in the male anatomy, spermatophore formation, and sperm structure in Atyidae: The red cherry shrimp *Neocaridina davidi*. *Invertebrate Biology*, 138(1), 17-28.

Tripathi, R., & Pandey, A. K. (2014). Anatomical, histological and ultrastructural studies on reproductive system of freshwater prawn, *Macrobrachium dayanum* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Experimental Zoology India*, 17(2), 631-647.

Tudge, C. C. (1992). Comparative ultrastructure of hermit crab spermatozoa (Decapoda: Anomura: Paguroidea). *Journal of Crustacean Biology*, 12(3), 397-409.

Vergamini, F. G., Pileggi, L. G., & Mantelatto, F. L. (2011). Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contributions to Zoology*, 80, 67-83.

Viscosi, V., & Cardini, A. (2011). Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PloS one*, 6(10), e25630.

Watanabe, T. T., Nascimento, F. A., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2020). Ultrastructure and histochemistry of the male reproductive system of the genus *Callinectes* Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae). *Journal of Morphology*, 281(12), 1660-1678.

Weiss, R., Anger, K., Hayd, L., & Schubart, C. D. (2015). Interpreting genetic distances for species recognition: the case of *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 and the recently described *M. pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013 (Decapoda, Palaemonidae) from Brazilian fresh waters. *Crustaceana*, 88, 1111-1126.

Zar, J. H. (2010). *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Zara, F. J., Toyama, M. H., Caetano, F. H., & López-Greco, L. S. (2012). Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*, 32(2), 249-262.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

two species even at the larval stage. Therefore, the differences observed here add to other biological characteristics that vary between these two species (*e.g.*, reproductive isolation, reproductive aspects, and body shape) and corroborate that *M. amazonicum* and *M. pantanalense* are two lineages separated by low genetic distance but with differences that support the separation of these organisms as two taxonomic entities.

References

Almeida, A. S., Alves, D. F. R., Pescinelli, R. A., Santos, R. C., & Costa, R. C. (2021). Morphology of the early larval stages of *Lysmata lipkei* Okuno and Fiedler, 2010 (Caridea: Lysmatidae): an invasive shrimp in the Western Atlantic. *Zootaxa*, 4903(1), zootaxa-4903.

Almeida, A. O., Terossi, M., & Mantelatto, F. L. (2014). Morphology and DNA analyses reveal a new cryptic snapping shrimp of the *Alpheus heterochaelis* Say, 1818 (Decapoda: Alpheidae) species complex from the western Atlantic. *Zoosystema*, 36(1), 53-71.

Anger, K. (1995). The conquest of freshwater and land by marine crabs: adaptations in life-history patterns and larval bioenergetics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 193(1-2), 119-145.

Anger, K. (2001). *The biology of decapod crustacean larvae* (Vol. 14, pp. 1-420). Lisse: AA Balkema Publishers.

Anger, K. (2006). Contributions of larval biology to crustacean research: a review. *Invertebrate Reproduction & Development*, 49(3), 175-205.

Anger, K., & Hayd, L. (2010). Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. *Aquatic Biology*, 9(3), 251-261.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Batel, A., Melzer, R. R., Anger, K., & Geiselbrecht, H. (2014). Heterochrony in mandible development of larval shrimp (Decapoda: Caridea) — A comparative morphological SEM study of two carideans. *Journal of morphology*, 275(11), 1258-1272.

Bauer, R. T. (2004). Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the carideans (Vol. 7). University of Oklahoma Press.

Bosc, L.A.G. (1802). Manuel de l'histoire naturelle des crustacés, contenant leur description et leurs moeurs; avec figures dessinées d'après nature. 1. Paris: Deterville.

Calixto-Cunha, M., Rodrigues, T. S., Ueira-Vieira, C., Alves, D. F. R., & Almeida, A. C. (2021). Genetic and phenotypic variability in populations of the *Macrobrachium amazonicum* complex: New findings to the upper Paraná Hydrographic Basin. *Zoologischer Anzeiger*, 293, 26-36.

Choudhury, P. (1970). Complete larval development of the palaemonid shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836), reared in the laboratory. *Crustaceana*, 18(2), 113-132.

Clark, P. F. (2005). The evolutionary significance of heterochrony in the abbreviated zoeal development of pilumnine crabs (Crustacea: Brachyura: Xanthoidea). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 143(3), 417-446.

Clark, P. F. (2016). The bearing of larval morphology on brachyuran phylogeny. In *Decapod crustacean phylogenetics* (pp. 233-254). CRC Press.

Clark, P. F., Calazans, D., & Pohle, G. W. (1998). Accuracy and standardization of brachyuran larval descriptions. *Invertebrate Reproduction & Development*, 33(2-3), 127-144.

Clark, P. F., & Cuesta, J. A. (2015). Larval systematics of Brachyura. In *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C (2 vols)* (pp. 981-1048). Brill.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Cunha, A. M., Terossi, M., Mantelatto, F. L., & Almeida, A. O. (2020). Delimiting the snapping shrimp *Alpheus lobidens* De Haan, 1849 (Caridea: Alpheidae) based on morphological and molecular data. *Zootaxa*, 4718(3), zootaxa-4718.

Dos Santos, A., Hayd, L., & Anger, K. (2013). A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. *Zootaxa*, 3700(4), 534-546.

Fincham, A. A., & Figueras, A. J. (1986). Larval keys and diagnoses for the subfamily Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) in the north-east Atlantic and aspects of functional morphology. *Journal of Natural History*, 20(1), 203-224.

Guest, W. C. (1979). Laboratory life history of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 37(2), 141-152.

Hancock, M. A. (1998). The relationship between egg size and embryonic and larval development in the freshwater shrimp *Paratya australiensis* Kemp (Decapoda: Atyidae). *Freshwater Biology*, 39(4), 715-723.

Hayd, L., & Anger, K. (2013). Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. *Revista de Biología Tropical*, 61(1), 39-57.

Hines, A. H. (1986). Larval patterns in the life histories of brachyuran crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Bulletin of marine science*, 39(2), 444-466.

Jalihal, D. R., Sankolli, K. N., & Shenoy, S. (1993). Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 65(3), 365-376.

Leach, W.E. (1815). A tabular view of the external characters of four classes of animals, which Linne arranged under Insects. *Actes De Colloques* 11: 306-400.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Leeuwenhoek, A.V. (1807). The select works of A. v. Leeuwenhoek, containing his microscopical discoveries in many of the works of nature. Translated by Samuel Hoole, London. 266-267.

Linné, C. (1767). Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. 12th ed. Stockholm.

Liu, M. Y., Cai, Y. X., & Tzeng, C. S. (2007). Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. Zoological Studies, 46(3), 272.

Magalhaes, C. (1985). Desenvolvimento larval obtido em laboratório de palaemonídeos da Região Amazônica. I. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda). Amazoniana: Limnologia et Oecologia Regionalis Systematis Fluminis Amazonas, 9(2), 247-274.

Magalhães, C. (1988). The larval development of palaemonid shrimps from the Amazon Region reared in the laboratory. II. Extremely abbreviated larval development in *Euryrhynchus* Miers, 1877 (Decapoda, Euryrhynchinae). Crustaceana, 55(1), 39-52.

Magalhães, C., & Walker, I. (1988). Larval development and ecological distribution of central Amazonian palaemonid shrimps (Decapoda, Caridea). Crustaceana, 55(3), 279-292.

Mantelatto, F. L., Pileggi, L. G., Pantaleão, J. A., Magalhães, C., Villalobos, J. L., & Álvarez, F. (2021). Multigene phylogeny and taxonomic revision of American shrimps of the genus *Cryphiops* Dana, 1852 (Decapoda, Palaemonidae) implies a proposal for reversal of precedence with *Macrobrachium* Spence Bate, 1868. ZooKeys, 1047, 155.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Marco-Herrero, E., Anger, K., & Hayd, L. (2019). Extended larval development in the hololimnetic shrimp *Macrobrachium pantanalense* (Decapoda, Palaemonidae) reared in the laboratory. *Crustaceana*, 92(6), 693-723.

McNamara, K. J. (2012). Heterochrony: the evolution of development. *Evolution: Education and Outreach*, 5(2), 203-218.

Meireles, A.L., Valenti, W.C., Mantelatto, F.L., 2013. Reproductive variability of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae): influence of life cycle on egg production. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 41, 718-731.

Milne-Edwards, H. (1834). *Histoire naturelle des Crustacés, comprenant l'Anatomie, la Physiologie et la Classification de ces Animaux*. Librairie Encyclopédique de Roret 1. Paris.

Milne-Edwards, H. (1837). *Histoire naturelle des Crustacés, comprenant l'Anatomie, la Physiologie et la Classification de ces Animaux*. Librairie Encyclopédique de Roret 2. Paris.

Milne-Edwards, H. (1840). *Histoire naturelle des Crustacés, comprenant l'Anatomie, la Physiologie et la Classification de ces Animaux*. Librairie Encyclopédique de Roret 3. Paris.

Møller, O. S., Anger, K., & Guerao, G. (2020). Patterns of larval development. *Developmental biology and larval ecology, The Natural History of the Crustacea*, 7, 165-194.

Morgan, S. G. (1987). Morphological and behavioral antipredatory adaptations of decapod zoeae. *Oecologia*, 73(3), 393-400.

Müller, F. (1864). *Für Darwin*. Leipzig: Engelmann

Nogueira, C. S., Pantaleão, J. A. F., & Costa, R. C. (2020). Hybridisation experiments between freshwater prawns *Macrobrachium amazonicum* and *M.*

NOGUEIRA, C. S. (2023)

pantanalense (Decapoda: Palaemonidae), and the effects of geographical isolation. *Marine and Freshwater Research*, 72(4), 520-525.

Nogueira, C. S., Camargo, N. F., Pantaleão, J. A., & Costa, R. C. (2023). Elucidating taxonomic problems of two closely related freshwater prawn lineages of the genus *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): A geometric morphometrics approach. *Zoologischer Anzeiger*.

Olesen, J. (2018). Crustacean life cycles—developmental strategies and environmental adaptations. *The natural history of the crustacea. Life histories*, 5, 1-34.

Pantaleão, J. A. F., Carvalho-Batista, A., Teodoro, S. S., & Costa, R. C. (2018). The influence of environmental variables in the reproductive performance of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae) females in a continental population. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 1445-1458.

Pantaleão, J. A. F., Pescinelli, R. A., Costa, R. C., Cuesta, J. A., & Mantelatto, F. L. (2020). First zoeal stage morphology of *Alpheus carlae* and *A. intrinsecus* (Decapoda, Caridea, Alpheidae) obtained in the laboratory. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 100(6), 949-961.

Paschoal, L. R., & Zara, F. J. (2020). Size at onset of sexual maturity in *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) phenotypes: an integrative approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92.

Pescinelli, R. A., Pantaleao, J. A., Mantelatto, F. L., & Costa, R. C. (2017). Morphological description of early zoeal stages of *Alpheus brasileiro* Anker, 2012 reared in the laboratory, including a revision of the larval morphology of the first zoeal stage of the genus *Alpheus* Fabricius, 1798 (Caridea: Alpheidae). *Zootaxa*, 4269(2), 265-276.

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Queiroga, H., & Blanton, J. (2005). Interactions between behaviour and physical forcing in the control of horizontal transport of decapod crustacean larvae. *Advances in marine biology*, 47, 107-214.

Rabalais, N. N., & Gore, R. H. (2017). Abbreviated development in decapods. In *Crustacean Issues 2* (pp. 67-126). Routledge.

Santos, R. C., Pescinelli, R. A., & Costa, R. C. (2020). Description of the first zoeal stage of *Synalpheus apioceros* Coutière, 1909 (Caridea: Alpheidae), including a comparative analysis with larval morphology from the genus *Synalpheus* Spence Bate, 1888. *Zootaxa*, 4838(1), zootaxa-4838.

Sastry A.N. (1983) Ecological aspects of reproduction. In *The Biology of Crustacea* (ed. D.E. Bliss.), Vol. 8. Environmental Adaptations (eds F. J. Vernberg and W. B. Vernberg.). Academic Press Inc., New York.

Silva, R. C., Jacobucci, G. B., & Mossolin, E. C. (2017). Reproductive biology of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) in a reservoir situated in Minas Gerais State, southeastern Brazil. *Latin american journal of aquatic research*, 45(4), 776-786.

Smith, F., Brown, A., Mestre, N. C., Reed, A. J., & Thatje, S. (2013). Thermal adaptations in deep-sea hydrothermal vent and shallow-water shrimp. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 92, 234-239.

Thatje, S., Schnack-Schiel, S., & Arntz, W. E. (2003). Developmental trade-offs in Subantarctic meroplankton communities and the enigma of low decapod diversity in high southern latitudes. *Marine Ecology Progress Series*, 260, 195-207.

Thompson, J.V. (1828). On the metamorphoses of the Crustacea, and on the zoea, exposing their singular structure, and demonstrating that they are not, as has been supposed, a peculiar genus, but the larva of Crustacea. In: *Zoological Researches; or*

NOGUEIRA, C. S. (2023)

Natural History of nondiscript or imperfectly known animals, in a series of memoirs. Memoir I 1: 1-11. Cork, Ireland.

Torres, G., Giménez, L., & Anger, K. (2011). Growth, tolerance to low salinity, and osmoregulation in decapod crustacean larvae. *Aquatic Biology*, 12(3), 249-260.

Valenti, W.C., Mallasen, M. & Silva, C.A. (1998) Larvicultura em sistema fechado dinâmico. In *Carcinicultura de Água Doce: Tecnologia para a Produção de Camarões*, (Ed. by W.C. Valenti), pp. 112–39. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo and Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Brasília.

Valenti, W. C., Mallasen, M., & Barros, H. P. (2009). Sistema de recirculação e rotina de manejo para larvicultura de camarões de água doce *Macrobrachium rosenbergii* em pequena escala. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35(1), 141-151.

Van Dover, C. L., Factor, J. R., Williams, A. B., & Berg Jr, C. J. (1985). Reproductive patterns of decapod crustaceans from hydrothermal vents. *Bulletin of the Biological Society of Washington*, 6, 223-227.

Vergamini, F. G., Pileggi, L. G., & Mantelatto, F. L. (2011). Genetic variability of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contributions to Zoology*, 80(1), 67-83.

Vogt, G. (2013). Abbreviation of larval development and extension of brood care as key features of the evolution of freshwater Decapoda. *Biological Reviews*, 88(1), 81-116.

Vogt, G. (2016). Direct development and posthatching brood care as key features of the evolution of freshwater Decapoda and challenges for conservation. In *A global overview of the conservation of freshwater decapod crustaceans* (pp. 169-198). Springer, Cham.

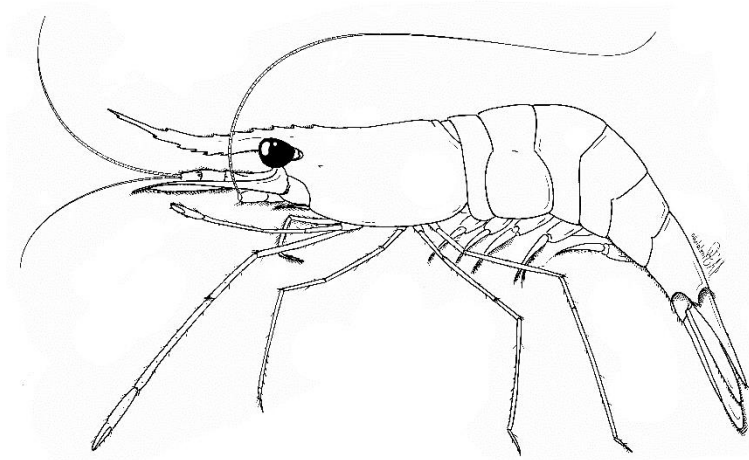
NOGUEIRA, C. S. (2023)

Weiss, R., Anger, K., Hayd, L., & Schubart, C. D. (2015). Interpreting genetic distances for species recognition: the case of *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 and the recently described *M. pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013 (Decapoda, Palaemonidae) from Brazilian fresh waters. *Crustaceana*, 88(10-11), 1111-1126.

Wowor, D., Muthu, V., Meier, R., Balke, M., Cai, Y., & Ng, P. K. (2009). Evolution of life history traits in Asian freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) based on multilocus molecular phylogenetic analysis. *Molecular phylogenetics and evolution*, 52(2), 340-350.

Zar, J.H. (2010). *Biostatistical Analysis*, 5th edn. Prentice Hall an Imprint of Pearson Education, Upper Saddle River.

Considerações finais



Considerações finais

Com base nos resultados expostos em todos os capítulos, evidenciamos que existem diferenças entre diversas características biológicas de *M. amazonicum* e *M. pantanalense*, o que confirma a hipótese central desse estudo. Em um primeiro momento (Capítulo 1), foi observado que existe um isolamento reprodutivo entre esses organismos, ou seja, ambas as linhagens não se reconhecem sexualmente e, portanto, não copulam. Possivelmente, essa falta de reconhecimento pode estar relacionada com os feromônios sexuais, os quais tendem a ser específicos para cada espécie.

Foram observadas diferenças estatísticas no formato de todas as estruturas analisadas com a ferramenta de morfometria geométrica. Duas delas foram sugeridas como potenciais estruturas para serem utilizadas na identificação dos grupos, *i.e.*, a carapaça e o telson. Porém, como foi retratado no capítulo em questão (Capítulo 2), o presente estudo não possui escopo taxonômico. Portanto, recomendamos que sejam realizadas análises adicionais com mais populações para verificar se o padrão observado nas seis populações aqui analisadas se repete em outras que estão distribuídas ao longo do Brasil.

As características do sistema reprodutor masculino e a ultraestrutura do espermatozoide também suportam a separação de *M. amazonicum* e *M. pantanalense* (Capítulo 3), sendo evidenciadas diferenças nas secreções que compõem o espermatóforo e no formato do espermatozoide. As diferenças nesses traços reprodutivos foram inesperadas, uma vez que esses caracteres são altamente conservativos. Ainda assim, foi possível elencar algumas características reprodutivas que divergem entre esses organismos, e essas somam-se as características que já foram reportadas na descrição e em outros estudos sobre *M. pantanalense*.

A morfologia e a morfometria larval (Capítulo IV) forneceram informações que seguem a mesma tendência exposta nos três primeiros capítulos, ou seja, que *M. amazonicum* e *M. pantanalense* são linhagens distintas, com várias diferenças em seus aspectos biológicos. Dentre as diferenças apontadas nesse capítulo, chamamos a atenção para a variação heterocrônica do pereópodo 5, tempo de desenvolvimento e tamanho das larvas das duas espécies. Essas diferenças somam-se aos achados descritos por Marco-Herrero et al. (2019), consolidando que esses dois grupos apresentam variações interespecíficas desde a fase de vida larval.

Podemos concluir que essas duas linhagens são duas entidades taxonômicas que apresentam diferenças em sua biologia, todas as ferramentas aqui utilizadas foram eficazes na discriminação desses dois grupos, dando suporte à sua separação. Entretanto, entendemos que a descrição original de *M. pantanalense* apresenta algumas inconsistências pelo fato de que a maioria das informações descritivas sejam baseadas em proporções de tamanho em relação a *M. amazonicum*, o que pode gerar problemas na identificação, uma vez que *M. amazonicum* é uma espécie fenotipicamente plástica, com populações de pequeno e grande porte ocorrendo ao longo do Brasil. Desse modo, algumas das características aqui levantadas podem ser muito úteis em futuros estudos que almejem redescrever *M. pantanalense*. Finalmente, reforçamos a importância da utilização de ferramentas de taxonomia integrativa em estudos que abordem a discriminação de espécies que são proximamente relacionadas.