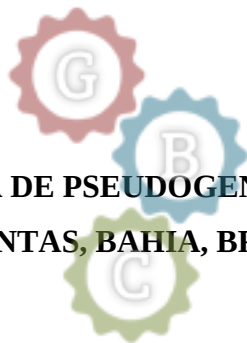
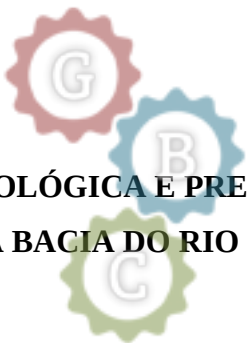




Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

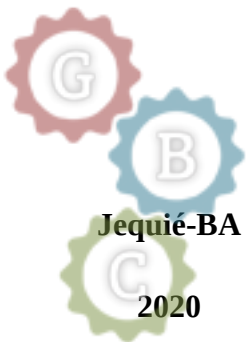
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**



**VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E PRESENÇA DE PSEUDOGENES EM
Macrobrachium jelskii DA BACIA DO RIO DE CONTAS, BAHIA, BRASIL**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

LETICIA OLIVEIRA BARBOSA



Jequié-BA

2020

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



LETICIA OLIVEIRA BARBOSA

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E PRESENÇA DE PSEUDOGENES EM
Macrobrachium jelskii DA BACIA DO RIO DE CONTAS, BAHIA, BRASIL**

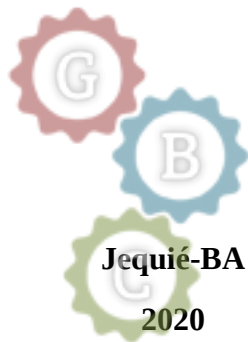


Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do Título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cervini

Coorientador(a): Prof.^a Dr.^a Ana Karina de Francisco

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

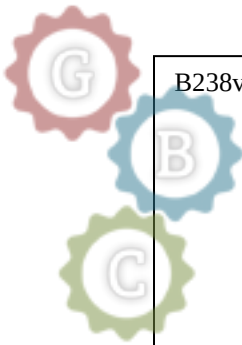


**Jequié-BA
2020**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



B238v Barbosa, Leticia Oliveira.
Variabilidade morfológica e presença de pseudogenes em *Macrobrachium jelskii* da bacia do Rio de Contas, Bahia, Brasil / Leticia Oliveira Barbosa.- Jequié, 2020.
90f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Cervini e coorientação da Prof.^a Dr.^a Ana Karina de Francisco)

1.Cefalotórax 2.DNA barcoding 3.Morfometria geométrica
4.Pseudogenes I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 617.7

Rafaella Cância Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: **“VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E PRESENÇA DE PSEUDOGENES EM *Macrobrachium jelskii* DA BACIA DO RIO DE CONTAS, BAHIA, BRASIL”.**

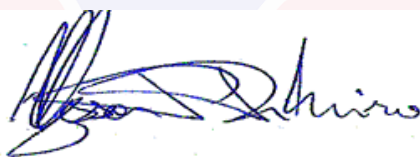
Autor (a): Leticia Oliveira Barbosa

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Cervini

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:



Prof. Dr. Marcelo Cervini – UESB / Jequié, BA



Prof. Dr. Allysson Pontes Pinheiro – URCA / Crato, CE

Campus de Jequié

(73) 3528-9725 | ppggbc@uesb.edu.br

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016



UESB



Governo do
Estado da Bahia

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Marina G. de Figueiredo

Dra. Marina Gomes de Figueiredo – UESC/ Ilhéus, BA

Data de realização: 27 de agosto de 2020.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

AD PLENAM VITAM

Campus de Jequié

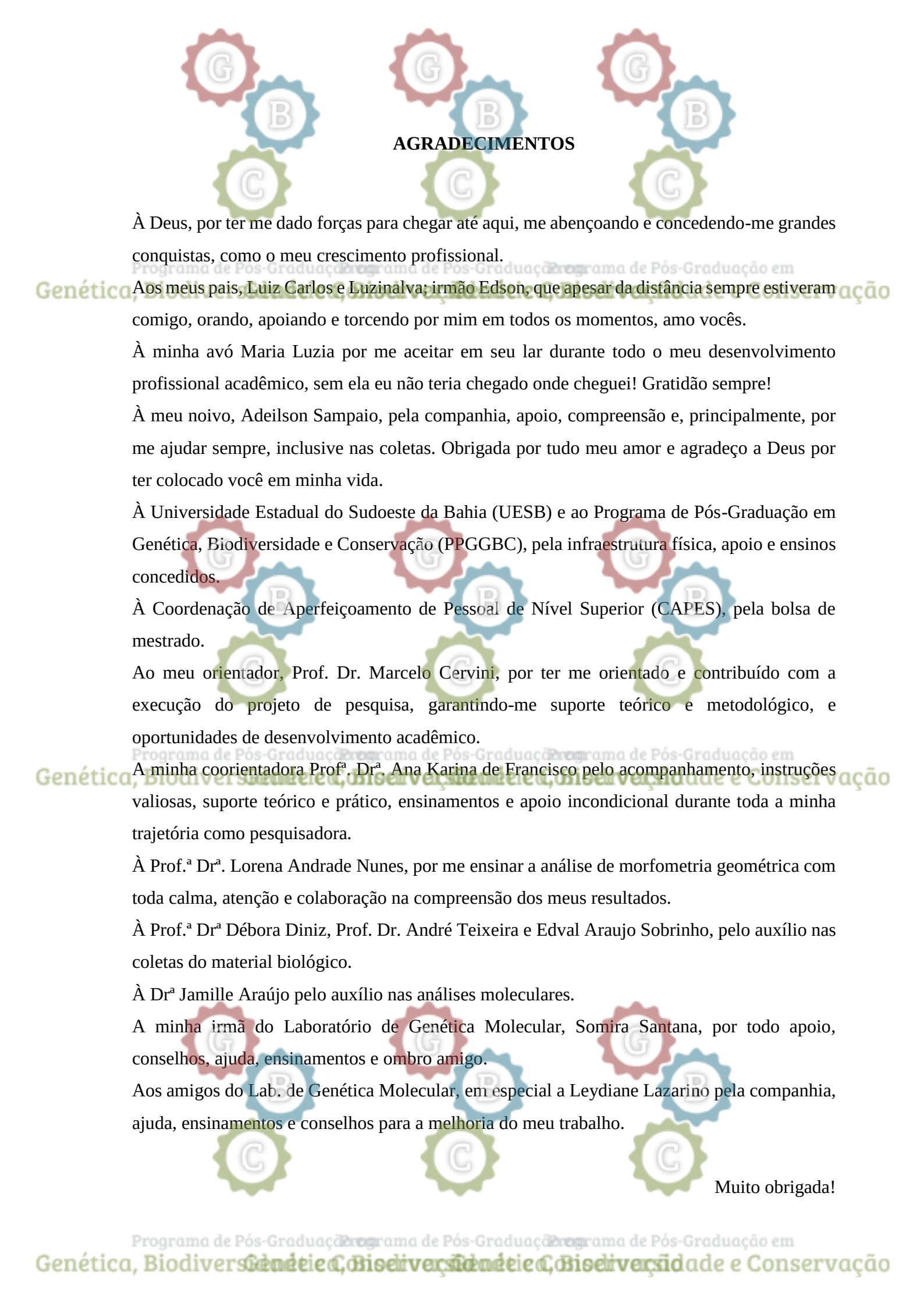
(73) 3528-9725 | ppggbc@uesb.edu.br

Campus de Itapetinga
Praça da Primavera, 40
Bairro Primavera
CEP 45.700-000
PABX.: (77) 3261-8600

Campus de Jequié
Rua José Moreira Sobrinho, s/n
Bairro Jequezinho
CEP 45.200-000
PABX.: (73) 3528-9600

Campus de Vitória da Conquista
Estrada do Bem Querer, km 4
Bairro Universitário
CEP: 45031-300
PABX.: (77) 3424-8600

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado forças para chegar até aqui, me abençoando e concedendo-me grandes conquistas, como o meu crescimento profissional.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Luzinalva; irmão Edson, que apesar da distância sempre estiveram comigo, orando, apoiando e torcendo por mim em todos os momentos, amo vocês.

À minha avó Maria Luzia por me aceitar em seu lar durante todo o meu desenvolvimento profissional acadêmico, sem ela eu não teria chegado onde cheguei! Gratidão sempre!

À meu noivo, Adeilson Sampaio, pela companhia, apoio, compreensão e, principalmente, por me ajudar sempre, inclusive nas coletas. Obrigada por tudo meu amor e agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC), pela infraestrutura física, apoio e ensinamentos concedidos.

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

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Cervini, por ter me orientado e contribuído com a execução do projeto de pesquisa, garantindo-me suporte teórico e metodológico, e oportunidades de desenvolvimento acadêmico.

A minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Ana Karina de Francisco pelo acompanhamento, instruções valiosas, suporte teórico e prático, ensinamentos e apoio incondicional durante toda a minha trajetória como pesquisadora.

À Prof.^a Dr.^a Lorena Andrade Nunes, por me ensinar a análise de morfometria geométrica com toda calma, atenção e colaboração na compreensão dos meus resultados.

À Prof.^a Dr.^a Débora Diniz, Prof. Dr. André Teixeira e Edval Araujo Sobrinho, pelo auxílio nas coletas do material biológico.

À Dr.^a Jamille Araújo pelo auxílio nas análises moleculares.

A minha irmã do Laboratório de Genética Molecular, Somira Santana, por todo apoio, conselhos, ajuda, ensinamentos e ombro amigo.

Aos amigos do Lab. de Genética Molecular, em especial a Leydiane Lazarino pela companhia, ajuda, ensinamentos e conselhos para a melhoria do meu trabalho.

Muito obrigada!



BIOGRAFIA

Leticia Oliveira Barbosa, filha de Luzinalva Oliveira Barbosa e Luiz Carlos Barbosa, nasceu em 01 de fevereiro de 1994, na cidade de Santos, São Paulo, Brasil. Em 2012, ingressou no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Genética, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié, Bahia. Durante a graduação, foi voluntária no projeto de iniciação científica (2014-2016) e desenvolveu trabalhos na área de genética molecular de ictiofauna marinha, sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Ana Karina de Francisco (UESB). Em novembro de 2016, concluiu o curso de graduação, com o trabalho de monografia intitulado: “DNA *barcoding* de peixes no Brasil: uma revisão de literatura” sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Ana Karina de Francisco. Foi estagiária voluntária no sub-projeto de Criação e Organização da Coleção Científica de Ictiologia do DCB - UESB/Jequié (2016-2017), sob a coordenação do Prof. Dr. André Teixeira da Silva. Em março de 2018, ingressou no curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Cervini, sendo bolsista CAPES e desenvolvendo trabalhos na área de morfometria geométrica e genética molecular de camarões de água doce.



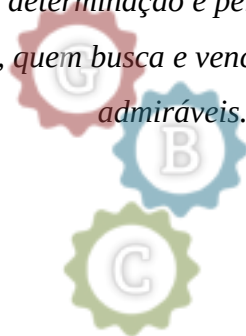
EPÍGRAFE

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

*O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.*



(José de Alencar)

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



RESUMO

Macrobrachium jelskii é um camarão dulcícola que ocorre na América do Sul e na maioria dos Estados brasileiros, tendo uma ampla distribuição geográfica. Sendo importantes ecologicamente na manutenção da cadeia trófica e para o consumo humano. A sua dispersão é limitada devido a seu desenvolvimento larval abreviado, influenciando na variabilidade interespecífica, dificultando a sua identificação taxonômica. Visto a degradação nas áreas de ocorrência dessa espécie e a influência desses fatores em diferentes características biológicas nesses organismos foi analisado a variabilidade morfogenética dessa espécie de camarão de água doce amostradas em rios e em uma represa do Sul e Sudoeste da Bahia. Neste estudo realizamos a análise da morfometria geométrica e verificamos quatro morfotipos populacionais, com variações encontradas na forma do cefalotórax, comprimento do rostro e tamanho. Essas variações podem ser devido ao diferente estágio de maturação gonadal dos camarões e adaptações ambientais, como a distância hidrológica, a localização geográfica, clima e o ambiente aquático. Realizamos análise de genética molecular para identificação da espécie através do gene mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade I (COI). Nas análises das sequências foi observado a presença de picos duplos e códons de parada na tradução das sequências, com 12 haplótipos, e apenas dois compartilhados, sendo os demais exclusivos para cada indivíduo, além de 43 mutações. A maior distância genética intraespecífica foi entre as sequências do presente estudo (2.6%) e, quando comparadas com sequências dos bancos de dados, a divergência interespecífica foi de 140.9% em relação a *M. jelskii* do BOLD e 135.1% em relação a *M. rosenbergii*, do GenBank, sequências obtidas por similaridade no BLAST. As árvores de *neighbor-joining* (NJ), máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI), apresentaram a mesma topologia com diferenças no valor de suporte. As sequências de *M. jelskii* do presente estudo formou um clado independente nos dois bancos de dados (BD1 e BD2) com alto suporte (NJ/ML/BI - BD1 100%/100% de *bootstrap* e 1 probabilidade posterior; BD2 95%/ 100% de *bootstrap* e 1 de probabilidade posterior). Estes resultados representam a possibilidade de amplificação de pseudogenes mitocondriais da região COI. Portanto, a espécie *M. jelskii* apresenta uma alta plasticidade fenotípica e a presença de pseudogenes podem acarretar em superestimação de espécies, enfatizando a importância do desenvolvimento de iniciadores específicos para cada táxon em determinadas situações. Estes resultados podem auxiliar em futuros estudos taxonômicos com camarões de água doce, enfatizando a importância da taxonomia integrativa, utilizando também genes nucleares, morfologia e ecologia.

Palavras-chave: Cefalotórax, DNA *barcoding*, morfometria geométrica, pseudogenes



ABSTRACT

Macrobrachium jelskii is a sweet shrimp that occurs in South America and in most Brazilian states, with a wide geographical distribution. Being ecologically important in the maintenance of the trophic chain and for human consumption. Its dispersion is limited due to its abbreviated larval development, influencing interspecific variability, making taxonomic identification difficult. In view of the degradation in the areas of occurrence of this species and the influence of these factors on different biological characteristics in these organisms, the morphogenetic variability of this species of freshwater shrimp sampled in rivers and in a dam in the South and Southwest of Bahia was analyzed. In this study, we performed the analysis of geometric morphometry and verified four population morphotypes, with variations found in the shape of the cephalothorax, length of the rostrum and size. These variations may be due to the different stage of gonadal maturation of shrimp and environmental adaptations, such as hydrological distance, geographic location, climate and aquatic environment. We performed molecular genetic analysis to identify the species through the mitochondrial gene Cytochrome C Oxidase subunit I (COI). In the analysis of the sequences it was observed the presence of double peaks and stop codons in the translation of the sequences, with 12 haplotypes, and only two shared, the others being exclusive for each individual, in addition to 43 mutations. The greatest intraspecific genetic distance was between the sequences of the present study (2.6%) and, when compared with sequences in the databases, the interspecific divergence was 140.9% in relation to *M. jelskii* from BOLD and 135.1% in relation to *M. rosenbergii*, from GenBank, sequences obtained by similarity in BLAST. The neighbor-joining (NJ), maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) trees showed the same topology with differences in the support value. The *M. jelskii* sequences of the present study formed an independent clade in the two databases (BD1 and BD2) with high support (NJ / ML / BI - BD1 100% / 100% bootstrap and 1 posterior probability; BD2 95% / 100% bootstrap and 1 posterior probability). These results represent the possibility of amplification of mitochondrial pseudogenes from the COI region. Therefore, the species *M. jelskii* has a high phenotypic plasticity and the presence of pseudogenes can lead to overestimation of species, emphasizing the importance of developing specific primers for each taxon in certain situations. These results may assist in future taxonomic studies with freshwater prawns, emphasizing the importance of integrative taxonomy, also using nuclear genes, morphology and ecology.

Keywords: Cephalothorax, DNA barcoding, geometric morphometry, pseudogenes

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Mapa do Estado da Bahia destacando a bacia do rio de Contas (cinza) (A) elaborado no programa Quantum GIS 3.0.3. Em detalhe, os quatro locais de coleta de *Macrobrachium jelskii* (B).....56

Figura 2. Vista do lado direito do cefalotórax de *Macrobrachium jelskii*. Os pontos vermelhos demonstram os marcos (1) ápice do rostro, (2) espinho hepático, (9) ângulo anterior inferior e os pretos os semimarcos anatômicos (3,4,5,6,7,8,10).....56

Figura 3. A) Análise de Componentes principais (ACP) para a forma do cefalotórax das fêmeas de *Macrobrachium jelskii*. No gráfico, cada localidade é representada por um símbolo e cor. **B, C, D, E)** *Outlines* apresentando as variações na forma dos espécimes. As linhas azuis escuras representam a variação e as linhas azuis claras representam a forma média do cefalotórax dos indivíduos. O escore da PC1 (eixo x) positivo está disposto à direita, e o negativo na esquerda, e o escore da PC2 (eixo y) positivo na esquerda e o negativo na direita.....57

Figura 4. Dendrograma gerado por UPGMA ilustrando as distâncias morfométricas médias entre a forma do cefalotórax de *Macrobrachium jelskii*, oriundas de diferentes localidades do Estado da Bahia, com 1.000 permutações.....58

Figura 5. *Boxplot* do tamanho do centróide obtido para as fêmeas de *Macrobrachium jelskii*. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).....59

Capítulo 2

Figura 1. Cromatogramas das sequências MjIp134 e MjJi186 obtidas com os iniciadores COIa e COIf visualizados no programa BioEdit. As setas estão evidenciando a sobreposição de “picos”.....77

Figura 2. Gráfico indicando as taxas de transições (azul) e transversões (verde) versus distância F84 para as sequências de *Macrobrachium jelskii*.....77

Figura 3. Rede haplotípica do gene mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade I de 13 seqüências da espécie *Macrobrachium jelskii*. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de seqüências que compartilham cada haplótipos (em frente de cada círculo possui o código da seqüência). Os traços entre os ramos estão representando o número de eventos mutacionais entre os pseudogenes.....78

Figura 4. Árvore representativa baseada em NJ das seqüências do COI de *Macrobrachium jelskii* BOLD e seqüências de *M. jelskii* pseudogene marcadas com (*) do presente estudo. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade (>80%) e os valores de probabilidade a posteriori (BI) acima de 0,8 e valores abaixo foram representados pelo (*).....79

Figura 5. Árvore representativa baseada em NJ das seqüências do COI do gênero *Macrobrachium* obtidas pelo BLAST e seqüências de pseudogene marcadas com (*), os pseudogenes incluíram *Macrobrachium jelskii* pseudogene (presente estudo) e *Macrobrachium amazonicum* pseudogene do GenBank. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade (>80%) e os valores de probabilidade a posteriori (BI) acima de 0,8, valores abaixo foram representados pelo (*)......80

LISTAS DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Dados dos locais de amostragem dos municípios em que foram realizadas as coletas.....60

Tabela 2. Descrição da localização de cada marco e semimarco anatômico implementado no cefalotórax da espécie *Macrobrachium jelskii*.....60

Tabela 3. Classes e valores médios do comprimento do cefalotórax (CC) de fêmeas de *Macrobrachium jelskii* por localidade de coleta.....60

Tabela 4. Teste da distância de Procrustes com 10.000 permutações entre as formas do cefalotórax das populações. Destacado em negrito a menor e maior distância.....61

Capítulo 2

Tabela 1. Lista dos locais de amostragem e coordenadas geográficas dos municípios em que foram realizadas as coletas.....81

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação do gene mitocondrial COI na espécie *Macrobrachium jelskii* e suas respectivas sequências.....81

Tabela 3. Descrição dos protocolos testados para amplificação do gene COI na espécie de camarão de água doce *Macrobrachium jelskii*.....81

Tabela 4. Sequências obtidas do presente estudo e dos bancos de dados BOLD e GenBank usadas nas análises moleculares.....82

Tabela 5. Dados de polimorfismos de DNA de *M. jelskii* pseudogene (presente estudo), *M. amazonicum* pseudogene e *M. jelskii* do BOLD para fins comparativos.....85

Tabela 6. Matriz de distância genética da espécie *M. jelskii* do BOLD (BINs) e *M. jelskii* pseudogene (presente estudo), com base no modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros (K2P)..85

Tabela 7. Matriz de distância genética de *M. jelskii* pseudogene do presente estudo e sequências de *Macrobrachium* obtidas pelo BLAST no GenBank, com base no modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros (K2P).....86



LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABBI: *All Birds Barcode Initiative*

nDNA: DNA nuclear

ACP: Análise de Componentes Principais

NJ: *Neighbor-Joining*

All-Leps: *Lepidoptera Barcode of Life*

Numts: *Nuclear mitochondrial pseudogenes*

ANOVA: Análise de Variância

pb: pares de bases

BA: Bahia

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

BI: Inferência Bayesiana

SLM: semimarcos (*semilandmarks*)

BIN: *Barcode Index Numbers*

TPS: *Thin Plate Spline*

BOLD: *Barcode of Life Data System*

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

CBOL: *The Consortium for the Barcode of Life*

CC: Correlação Cofenética

π : Diversidade nucleotídica

COI: Citocromo C Oxidase subunidade I

DNA: ácido desoxirribonucleico

FISH-BOL: *Fish Barcode of Life*

Hd: Diversidade haplotípica

K2P: Kimura-2-Parâmetros

LM: Marcos (*landmarks*)

MANOVA: Análise de Variância Multivariada

MCMC: Monte Carlo via Cadeias de Markov

ML: Máxima verossimilhança

mtDNA: DNA mitocondrial

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Considerações sobre os camarões.....	16
2.2 Gênero <i>Macrobrachium</i>	17
2.3 Impactos a biodiversidade de camarões dulcícolas	19
2.4 Caracterização da bacia do rio de Contas.....	21
2.5 Morfometria geométrica.....	22
2.6 DNA <i>barcoding</i> na identificação taxonômica.....	25
2.6.1 Heteroplasmia e pseudogenes: implicações na conservação da biodiversidade....	26
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
6.Capítulo 1: Variabilidade morfológica de <i>Macrobrachium jelskii</i> (Miers, 1877) (Decapoda, Palaemonidae) determinada por fatores biológicos e ambientais.....	39
Introdução.....	40
Material e Métodos.....	42
Resultados.....	44
Discussão.....	45
Referências	50
7.Capítulo 2: Pseudogenes mitocondriais na espécie <i>Macrobrachium jelskii</i> (Decapoda: Palaemonidae) e suas implicações na superestimação da biodiversidade.....	62
Introdução.....	63
Material e métodos	64
Resultados.....	67

Discussão.....	69
Referências.....	73
8.CONCLUSÕES GERAIS.....	87

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da biodiversidade é fundamental para a conservação das espécies nos diferentes ambientes. Principalmente no cenário atual de degradação, inclusive do ambiente aquático. Águas interiores continentais, como as bacias hidrográficas do Brasil, recebem grande quantidade de efluentes urbanos e industriais, além, da exploração de seus recursos, implantação de barragens e introdução de espécies exóticas.

A bacia do rio de Contas é uma bacia importante no Estado da Bahia, que sofre com os impactos antrópicos citados acima, e compõe três componentes fisiográficos, desde semiárido até o semiúmido, porém com poucos estudos referente a composição da fauna aquática.

Atualmente existem diversas metodologias que favorecem o conhecimento da biodiversidade dentro e entre as populações biológicas, como a morfometria geométrica, que analisa a variação na forma das estruturas biológicas, através de marcos anatômicos homólogos determinados, verificando a variação e covariação da forma dos indivíduos.

E a genética molecular, que também vem sendo importante em estudos biológicos, auxiliando na compreensão das relações evolutivas das espécies, podendo ser aplicada em análises de indivíduos em qualquer estágio de desenvolvimento, tanto larval quanto juvenil, identificar indivíduos fragmentados quando não podem ser identificados morfologicamente, sendo utilizada principalmente na identificação de espécies crípticas (morfologicamente iguais e geneticamente distintas).

As análises moleculares de estudos taxonômicos do DNA mitocondrial são bastante utilizadas, a técnica de DNA *barcoding* descrita por Hebert *et al.* (2003), analisa o gene mitocondrial Citocromo C Oxidase Subunidade I, e vem sendo uma ferramenta eficaz em estudos de taxonomia e identificação molecular, devido a sua maior taxa de mutação, permitindo estudos populacionais e filogenéticos.

No entanto, a maioria dos estudos não abordam a possibilidade de obtenção de pseudogenes mitocondriais, que são cópias não funcionais das sequências mitocondriais que foram incorporadas ao genoma nuclear, acumulando mutações, que quando utilizados em uma perspectiva taxonômica, podem acarretar na superestimação de espécies e descrição errônea da biodiversidade.

Portanto, neste estudo iremos analisar a espécie de camarão de água doce *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877), utilizando a morfometria geométrica e a genética molecular. Estudos do gênero *Macrobrachium* são dificultados pelas semelhanças morfológicas

entre as espécies, principalmente as sintópicas, e também devido a alta plasticidade fenotípica dentro das espécies. Assim, as ferramentas citadas acima podem favorecer a análise da variabilidade morfo genética da espécie de camarão de água doce *Macrobrachium jelskii* amostradas no Sul e Sudoeste da Bahia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações sobre os camarões

Os camarões pertencem ao filo Arthropoda e subfilo “Crustacea”, com aproximadamente 68.000 espécies descritas de crustáceos, ocorrendo em diversos ambientes marinhos, salobros e de água doce do planeta Terra (Pinheiro & Boos, 2016). Eles fazem parte da Ordem Decapoda, a qual inclui espécies conhecidas, como os caranguejos, siris, camarões, lagostins, lagostas e tatuzinhos-de-jardim (Silva *et al.* 2010).

Regier *et al.* (2010), realizaram um estudo verificando as relações dos artrópodes através da análise de filogenômica de sequências codificadoras de proteínas nucleares de cópia única, onde analisaram 62 genes em 75 espécies de artrópodes. Os resultados das árvores filogenéticas do estudo foi o agrupamento do subfilo Hexapoda como grupo irmão de Xenocarida (clado do subfilo Crustacea), confirmando assim a paralifia de “Crustacea”. Este estudo demonstra a importância de análises de taxonomia molecular em espécies do subfilo Crustacea, afim de maximizar os dados disponíveis referente a evolução e morfogênese dos Arthropoda.

Os decápodes são invertebrados que possuem uma ampla distribuição, sendo um dos grupos mais representativos de animais aquáticos. Eles possuem grande importância econômica por serem, utilizados na alimentação humana e como fonte de renda para pescadores locais (Melo, 2003). Além da importância econômica, estes organismos são essenciais nos processos ecológicos, como na manutenção da cadeia trófica: sendo herbívoros, predadores ou presas para outros grupos animais (Silva *et al.* 2010).

Os Decapoda se subdividem em duas subordens, que se diferenciam de acordo com o tipo de reprodução: as fêmeas da subordem Pleocyemata incubam os ovos nas cerdas pleopodiais, enquanto as da subordem Dendrobranchiata (superfamílias Penaeoidea e Sergestoidea) os liberam diretamente na água (Pinheiro & Hebling, 1998).

A subordem Pleocyemata é dividida em sete infra-ordens, Anomura, Astacidea, Brachyura, Caridea, Palinura, Stenopodidea e Thalassinidea. A maior parte das espécies de camarões pertencem a infra-ordem Caridea, que é composta de aproximadamente 2.500

espécies distribuídas em 31 famílias, tendo muitos representantes de água doce. No Brasil ocorrem três famílias de Caridea em águas continentais, sendo a família Palaemonidae a mais abundante. Esta é composta por numerosas espécies de camarões bentônicos que habitam regiões marinhas, estuarinas e de água doce. A família Palaemonidae é dividida em duas subfamílias, a Pontoniinae (Kingsley, 1878) (com 116 gêneros e 602 espécies) e Palaemoninae (Kingsley, 1878) (com 14 gêneros e 379 espécies), esta última apresenta camarões de grande porte pertencentes ao gênero *Macrobrachium* (Spence Bate, 1868) (Cintra *et al.* 2003 e Mantelatto *et al.* 2016).

As demais famílias de camarões de água doce da infra-ordem Caridea, incluem, Atyidae que é composta por quatro espécies pertencentes aos gêneros *Atya* (Leach, 1816) e *Potimirim* (Holthuis, 1954).

2.2 Gênero *Macrobrachium*

Os camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* (Spence Bate, 1868) (Decapoda: Palaemonidae) são um grupo altamente diversificado de crustáceos decápodes, com espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sendo frequentemente utilizados comercialmente em aquicultura (Zimmermann *et al.* 2012). Atualmente, existem 246 espécies válidas de *Macrobrachium*, cerca de 40 espécies são encontradas nas águas doces e tropicais da América do Sul, das quais 19 ocorrem no Brasil (Pileggi & Mantelatto, 2012; Vera-Silva *et al.* 2016). As espécies geralmente possuem uma variabilidade intraespecífica alta que geralmente dificulta o trabalho taxonômico (Vera-Silva *et al.* 2016).

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. As características morfológicas utilizadas para identificação das espécies incluem o rostro, o segundo pereópode e o télson. Entretanto, estas características são altamente variáveis dentro das espécies, tornando assim este gênero uma problemática taxonômica (Lopes, 2014).

Dentro destas controvérsias taxonômicas, o monofiletismo do grupo se torna questionável, Pileggi & Mantelatto (2010), fizeram análises filogenéticas em 58 espécies do gênero *Macrobrachium* e discutem que apoiam a monofilia do grupo caso o *Cryphiops* (Dana, 1852) fosse aceito como gênero sinônimo de *Macrobrachium*, visto que espécies destes dois gêneros foram agrupadas no mesmo clado.

Estudo realizado no complexo de espécies *M. olfersii* (Wiegmann, 1836), destacou que a identificação morfológica não foi suficiente para distinguir as espécies. Com as análises moleculares utilizando os marcadores (16S e COI mtDNA; Histona (H3) nDNA) foi possível identificar a separação entre o complexo de espécies e estimar a recente divergência genética (Rossi & Mantelatto, 2013).

Dificuldades taxonômicas também são evidentes entre *M. amazonicum* (Heller, 1862) e *M. jelskii* (Miers, 1877), os quais apresentam muitas semelhanças morfológicas conservadas (principalmente no estágio juvenil), que dificultam a identificação dos mesmos. Este fato pode ainda ser agravado por tratarem-se de espécies sintópicas, ou seja, que podem ser coletadas juntas, no mesmo instrumento de coleta. Alguns estudos evidenciam uma alta proximidade entre *M. amazonicum* e *M. jelskii* tanto morfológicamente quanto geneticamente, sugerindo que poderiam pertencer a uma mesma espécie (Lopes, 2014; Guerra *et al.* 2014). No entanto, análises moleculares com genes mitocondriais e identificação morfológica rigorosa, mostraram que *M. jelskii* é monofilético e distinto de *M. amazonicum* (Vera-Silva *et al.* 2016).

Macrobrachium jelskii (Miers, 1877) é conhecido popularmente no Brasil como “camarão sossego”. É endêmico da América do Sul, ocorrendo na Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Bolívia, Brasil (estados do Amapá, Pará, Amazonas, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso, São Paulo e Santa Catarina) (Melo, 2003; Pileggi *et al.* 2013) e Argentina. São comercialmente importantes (para o consumo humano e isca para pesca), além de fazer parte da manutenção da cadeia trófica, sendo predador e presa para outros animais. Podem ser encontrados em ambientes lênticos e lóticos, águas escuras ou claras e entre as raízes de plantas e gramíneas aquáticas, essas fornecem proteção e nutrição para as fêmeas ovígeras e larvas durante o desenvolvimento (Rocha & Barbosa, 2017).

Macrobrachium jelskii é exclusivamente dulcícola e tem o desenvolvimento larval abreviado com 3 estágios larvais (2 zoea e 1 pós-zoea), que limita a sua dispersão, quando comparado a espécies com desenvolvimento larval prolongado (Vera-Silva *et al.* 2017). A abreviação do desenvolvimento larval e a extensão do cuidado da ninhada, são interpretadas como adaptações às variações dos parâmetros hidrodinâmicos, fatores físico-químicos e disponibilidade de fitoplâncton em habitats de água doce. O desenvolvimento abreviado está associado à redução da dispersão e do fluxo gênico entre as populações (Vogt, 2012), aumentando potencialmente a variabilidade interespecífica e dificultando a diferenciação morfológica dessa espécie com as demais simpátricas morfológicamente semelhantes (Vera-Silva *et al.* 2017).

Os resultados obtidos por Guerra *et al.* (2014), pode ser devido as semelhanças morfológicas entre *M. jelskii* e *M. amazonicum*, que puderam acarretar em identificação errônea. Vera-Silva *et al.* (2017), fizeram a redescrição da espécie *M. jelskii* através de análises morfológicas, onde informam caracteres morfológicos que permitem a discriminação correta da espécie *M. jelskii* em relação as espécies semelhantes morfológicamente e simpátricas, como a *M. amazonicum* e *M. acanthurus*. Os principais caracteres diagnósticos foram a forma do carpo do segundo pereópode, o comprimento do rostro e nos indivíduos adultos os espinhos internos do télson, que ultrapassam o ápice mediano em *M. jelskii*. A taxonomia alfa correta dos organismos é essencial para a organização do conhecimento da diversidade biológica, principalmente na região Neotropical, onde a fauna de camarão de água doce é subestimada (Magalhães *et al.* 2016).

Os caracteres morfológicos podem ser perdidos durante a coleta, onde alguns indivíduos podem ser fragmentados impedindo a identificação morfológica, sendo importante mais estudos, como da morfometria geométrica e genética molecular da espécie *M. jelskii*, principalmente no estado da Bahia, visto que a espécie ainda é pouco conhecida quanto às suas características biológicas e genéticas na região. Vera-Silva *et al.* (2016) revelou a existência de dois clados, o clado amazônico e o costeiro, dentro de *M. jelskii*, mas não encontram diferenças morfológicas para sustentar os clados, descartando a proposição de um novo status taxonômico para a espécie, podendo sugerir recente divergência das linhagens. Apesar da baixa variabilidade genética devido a atividade de introdução antrópica podendo homogeneizar as populações, a espécie possui variabilidade intraespecífica.

Sendo assim, estudos morfogenéticos se tornam fundamentais, inclusive, para o sucesso do seu cultivo, conhecimento do impacto antrópico nas populações, desenvolvimento biológico, adaptações ambientais e para futuras medidas de conservação. Essas informações são fundamentais para a conservação da espécie, visto que as ameaças para os camarões de água doce na América do Sul ao longo dos anos são decorrentes dos impactos antropogênicos, como poluição, degradação, perda de habitat e introdução de espécies exóticas (Magalhães *et al.* 2016).

Levando em consideração esses dados, é provável que a plasticidade intraespecífica em *Macrobrachium jelskii* tenha contribuído para a dificuldade taxonômica. Nesse contexto, estudo da espécie não deve se basear apenas nas características morfológicas, mas na integração de fontes complementares de evidência (por exemplo, dados morfométricos e moleculares) (Castelin *et al.* 2017). Essa integração dos dados biológicos é conceituada como “Taxonomia Integrativa”, que consiste na união de diferentes abordagens (genética, ecológica e

morfométrica) na determinação de linhagens evolutivas, além de favorecer na compreensão dos processos de diversificação biológica (Dayrat, 2005)

2.3 Impactos a biodiversidade de camarões dulcícolas

O conhecimento da biodiversidade e de suas interações evolutivas é fundamental na conservação das espécies nos diferentes ambientes. A crescente atividade antrópica nas proximidades dos rios desencadeia no aumento da poluição, destruição dos ambientes naturais, sobrepesca, introdução de espécies exóticas e agronegócio, prejudicando a viabilidade das espécies nesses ambientes aquáticos naturais (Miranda *et al.* 2012).

O agronegócio acarreta na diminuição do abastecimento de água, devido ao desmatamento, porque ocorre a conversão de florestas e vegetação nativa para a agricultura (áreas de cultivo e pastagens) e irrigação em grande escala para o cultivo, acarretando em mudanças climáticas, como a redução das chuvas regionais na estação seca, sendo necessário que o agronegócio utilize mais água para as plantações. Muitos corpos d'água no estado da Bahia, como riachos, foram secos ou assoreados devido ao agronegócio, e o nível de água nos rios estão reduzindo (Prager & Milhorange, 2018).

Dentre as espécies animais que sofrem com os impactos citados, destacam-se os camarões de água doce, principalmente devido ao crescimento no interesse econômico na carcinocultura, por possuírem potencial para cultivo e comercialização (Sampaio *et al.* 2009).

Entretanto pouco se conhece a respeito das espécies que habitam rios, represas, riachos, estuários e lagos do Brasil, inclusive das bacias da região Nordeste. É imprescindível a realização de estudos nestas áreas geográficas, tendo em vista as modificações ambientais já verificadas em várias bacias e sub-bacias do país (Guerra, 2011).

É importante destacar que espécies de camarões de água doce que habitam diferentes ambientes, como as do gênero *Macrobrachium*, apresentam características adaptativas quanto aos seus aspectos morfológicos, fisiológicos e comportamentais, permitindo a realização de muitos estudos. Entretanto, dados sobre as relações biológicas (como genética e morfologia), desses organismos são escassos, visto que as maiorias dos trabalhos encontrados na literatura abordam, principalmente, aspectos ecológicos e do manejo de espécies com potencial comercial (Guerra, 2011).

Visto a degradação dos ecossistemas aquáticos e a importância destes organismos para o equilíbrio do ambiente natural, estudos relacionados a conservação aquática no Brasil tem

sido realizados. Porém a maioria em ambientes marinhos, e a concentração dos estudos e programas de conservação são principalmente nas regiões Sul e Sudeste, possuindo muito mais conhecimentos acumulados que as demais regiões do Brasil (Mattos *et al.* 2014).

Estudos no Nordeste, inclusive no estado da Bahia, poderão maximizar o conhecimento da diversidade e biologia das espécies de camarões de água doce, visto que esses organismos são pouco conhecidos no estado. Essas informações favorecem o entendimento da situação dessas espécies, tanto na perspectiva local quanto no contexto morfogenético.

Características particulares dos rios contínuos e intermitentes dessa região do estado podem ter potencializado adaptações locais específicas, refletindo nas estimativas de diversidade genética. Como foi observado em microcrustáceos que vivem em rios intermitentes, eles são altamente diversificados, devido à sua plasticidade adaptativa para resistir a flutuações ambientais estressantes (Magalhães *et al.* 2016).

2.4 Caracterização da bacia do rio de Contas

A Região Hidrográfica do Atlântico Leste onde se encontra a bacia do rio de Contas ocupa 3,9% do território do Brasil, abrangendo quatro Estados (Bahia, Minas Gerais, Sergipe e Espírito Santo) (ANA, 2019). No estado da Bahia a bacia do rio de Contas é uma das seis mais importantes, tendo cerca de 500 km e ocupa uma área de 55.483 km² na região centro-sul do Estado, abrangendo 76 municípios (INEMA, 2019). Esta bacia passa por três componentes fisiográficos: alto Contas (onde predominam as características climáticas e fisiográficas do semiárido baiano); médio Contas (onde ocorre a transição do clima semiárido da Caatinga para o clima semiúmido do baixo Contas) e Baixo Contas (com clima semiúmido e predominância de Mata Atlântica) (SRHSH, 1993). No médio Contas, esta a zona de transição do clima semiárido para o semiúmido, este trecho atravessa uma região semiárida com influência de rios intermitentes (SRHSH, 1993).

Os três componentes fisiográficos da bacia do rio de Contas demonstra a elevada heterogeneidade ambiental presente na bacia. O alto Contas compreende áreas de caatinga, a partir do município de Jequié, há uma faixa de transição entre o clima semiárido e o semiúmido, e a sua foz em Itacaré tem o clima mais úmido, enquadrando-se nos domínios da mata atlântica e restinga (SRHSH, 1993).

No rio de Contas foram construídas duas barragens em seu trecho médio, uma dessas presentes no município de Jequié/BA. Para a regularização das descargas do rio, controle de enchentes, abastecimento de água, irrigação agrícola e geração de energia elétrica.

A construção de barragens muda drasticamente as características naturais de um rio, tornando as águas que tinham características de serem rápidas e com correntezas, em águas calmas e paradas, algumas espécies que são incapazes de se adaptarem a esse tipo de mudança podem ser levadas à extinção (Severi *et al.* 2010). Em espécies de camarões de água doce, as barragens influenciam no ciclo de vida de muitas espécies, como a maturação sexual, migração através das correntezas, acarretando em redução de fluxo gênico entre as populações. Um exemplo de espécie que está correndo risco de extinção no Nordeste por alta exploração, destruição de habitats, diminuição da vazão dos rios e construção de barragens, é a espécie *Atya gabinensis*, que está na lista vermelha como quase ameaçada de extinção (Mantelatto, 2016).

O presente estudo foi realizado em uma represa e rios da bacia do rio de Contas do Estado da Bahia. A represa é isolada do rio de Contas em uma área preservada de Mata Atlântica, já a bacia recebe efluentes urbanos, resíduos industriais, agrícolas e de mineração, sendo a agricultura a atividade mais impactante nessa bacia, além da contaminação por metais pesados e elevado nível de assoreamento ao longo de praticamente todo o seu leito. Nas últimas décadas, esse sistema hidrográfico foi exposto a uma quantidade maior de efluentes das atividades mencionadas acima, devido ao desenvolvimento econômico local. No entanto, estudos da fauna aquática se tornam essenciais para compreender possíveis impactos antrópicos nesta bacia, que permanece pouco estudada (Jesus *et al.* 2014).

Barreto *et al.* (2016) realizaram na bacia do rio de Contas uma análise de taxonomia integrativa do gênero de peixes *Nematocharax*, analisando as sequências do gene COI e a análise de morfometria geométrica. Os resultados indicaram a presença de unidades evolutivamente significativas em *N. venustus*. Além disso foi destacado que a população do alto Contas foi a que mais divergiu tanto nos dados morfométricos quanto genéticos, indicando a presença de uma nova espécie de *Nematocharax* na bacia do rio de Contas. Estes resultados demonstram a importância da bacia do rio de Contas como área prioritária para a conservação biológica.

Dentro dessa perspectiva de padrões de biodiversidade e alto grau de endemismo observado em diferentes regiões do estado, faz-se necessário analisar as espécies de camarões do Estado da Bahia, e no presente estudo analisamos a espécie *Macrobrachium jelskii*. Dentro dessa abordagem, a avaliação dos espécimes encontrados e a estimativa de diversidade dentro e entre os indivíduos são importantes para contextualizar esse grupo de organismo na região do presente estudo. Sendo assim, dados de morfometria geométrica são uma das alternativas para o maior entendimento da espécie em questão.

2.5 Morfometria geométrica

Desde os primórdios do conhecimento científico uma das principais formas de identificação da biodiversidade é pelas características morfológicas dos organismos, essas características são descritivas e quantitativas. Em meados do século XX ocorreu a união da descrição quantitativa da morfologia e a análise estatística para caracterizar padrões de variação de formas dentro e entre os grupos de organismos, surgindo assim o moderno campo da morfometria. Este termo foi formulado em 1965 proposto por R. Blackith. Iniciou-se com o estudo da morfometria tradicional que verificava a variação na distância entre os pontos anatômicos dos organismos. Essa metodologia tinha dificuldade na descrição da forma do organismo completo, pois são multidimensionais. Além disso os taxonomistas analisavam a variação na forma dos organismos, relacionada tanto a forma como ao tamanho, sendo os dados obtidos praticamente específico para cada táxon, dificultando a comparação entre organismos (Fornel & Estela, 2012).

Na década de 80 ocorreu o avanço significativo de ferramentas computacionais e pacotes estatísticos, revolucionando a morfometria através da união da biologia, estatística e geometria, criando assim a morfometria geométrica. O surgimento dessa ferramenta ocorreu no ano de 1984, onde o pesquisador Fred L. Bookstein propôs um novo método geométrico para estudar diferenças de forma em configurações de marcos anatômicos (em inglês *landmarks*) (Bookstein, 1991).

Esta metodologia analisa detalhadamente a variação da forma nas estruturas dos organismos de diferentes tamanhos, detectando variações intra e interespecíficas, sendo adicionados marcos anatômicos em estruturas específicas, rígidas ou menos variáveis das espécies, sendo estes pontos homólogos. Estes pontos são determinados na estrutura do organismo e são utilizados como referência para obter informações da forma morfológica do organismo. Para ser considerado um marco anatômico, estes pontos devem ter algum significado no desenvolvimento estrutural, funcional ou evolutivo do organismo (Klingenberg & Polak, 2003).

Existem três tipos de marcos anatômicos: tipo I, que possui uma homologia altamente confiável por justaposição de tecidos; tipo II, a homologia é medianamente confiável, os pontos ficam nas extremidades e curvaturas das estruturas; tipo III, pontos de homologia de baixa confiabilidade ou semimarcos, os quais representam extremidades de estruturas (contornos) ou ponto central (Bookstein, 1991; Monteiro & Reis, 1999).

Para realizar a análise por morfometria geométrica, utilizam-se imagens digitalizadas de uma câmera padrão e análise em programas. É necessária a inserção de marcos que possibilitarão a quantificação da forma por coordenadas cartesianas. As coordenadas demarcadas com os marcos contêm informações geométricas que indicam suas posições e são necessárias para o processo de sobreposição de Procrustes, para eliminar os efeitos de rotação, translação e escala, removendo o tamanho e os efeitos do espaçamento arbitrário (Gunz & Mitteroeckerb, 2013). A morfometria geométrica pode ser utilizada em estudos taxonômicos, sistemáticos, genéticos, populacionais, variação geográfica intraespecífica, ontogenéticos e dimorfismo sexual. Esta ferramenta permite a reconstrução das variações de forma inferidas estatisticamente o que é de extrema importância na visualização das diferenças de forma, ou seja, identificar onde, como e em que magnitude estão ocorrendo as mudanças (Fornel & Estela, 2012).

A morfometria geométrica vem sendo eficaz para estudos populacionais, os quais analisam as diferenças intraespecíficas e interespecíficas, inclusive em crustáceos. Silva *et al.* (2018), identificaram o dimorfismo sexual e etário do caranguejo de água doce da espécie *Goyazana castelnaui*. Os resultados demonstraram, para a vista ventral (pléon), nenhuma variação na forma entre jovens e adultos de fêmeas e machos, e na vista dorsal (cefalotórax), foi observada uma separação entre as fêmeas adultas e os demais grupos, indicando uma modificação notória do volume do cefalotórax para alocação das gônadas. Torres *et al.* (2014), analisaram populações da espécie *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896) ao longo de diferentes rios em um sistema de várzea. Eles observaram a forma do cefalotórax entre as populações que tinham maior distância hidrológica, e os machos apresentaram o rostro ligeiramente mais longo e orientado para cima. Essa variação pode ser devido a ausência de fluxo gênico entre as populações e a magnitude das correntes da água, que podem refletir nas forças exercidas pelos organismos na corrente. Já entre os sexos, as diferenças entre fêmeas e machos podem ser devido a um maior abdômen nas fêmeas para transportar ovos, e cefalotórax mais longo para o desenvolvimento das gônadas.

Zimmermann *et al.* (2012), observaram em *Macrobrachium australe* (Guérin-Méneville, 1838) que a forma do rostro varia com a velocidade da água, tendo a presença de dois morfotipos: o primeiro com população de ambiente lântico com rostro longo e fino e o segundo de população de ambiente lótico com rostro curto e robusto, ressaltando a plasticidade fenotípica dentro do gênero *Macrobrachium*.

Moraes *et al.* (2020), analisaram a forma do cefalotórax em *M. jelskii* para investigar se a distribuição da espécie seria natural ou introduzida por atividades antrópicas. Foi observado uma baixa dissimilaridade fenotípica entre bacias, o que pode ser uma indicação de introdução.

Nas análises de morfometria verificamos o efeito de alometria, a alometria nos informa se a forma está se alterando ou não em relação as variações no tamanho corporal, sendo útil em investigações morfológicas e evolutivas. Nesse contexto, a morfometria geométrica pode ser usada para visualizar alterações de forma para identificar modificações na forma corporal de um organismo durante o crescimento ou amadurecimento (Ruffini & Scalici, 2013).

Em crustáceos o amadurecimento é marcado por alterações morfológicas causadas pelo crescimento diferenciado de algumas estruturas corporais, principalmente do estágio juvenil para o adulto. Entretanto estas alterações podem ser sutis, passando despercebida pela identificação taxonômica tradicional, sendo necessário análises morfométricas da variação da forma, bem como outras variáveis (por exemplo, sexo, estágios de maturação e características ambientais). O rosto, por exemplo, é uma estrutura morfológica com comprimento variável durante o desenvolvimento (Moraes *et al.* 2018).

Portanto, a morfometria geométrica tem contribuído para a redução de incertezas taxonômicas, identificação de diferenças e variações significativas no formato e no tamanho de estruturas corpóreas, no intuito de entender questões evolutivas e ecológicas das espécies. Sendo assim, essas análises devem ser integradas em estudos da conservação da biodiversidade.

2.6 DNA *barcoding* na identificação taxonômica

Além de usar ferramentas morfológicas para o estudo dos organismos, é importante também analisar geneticamente, para compreender melhor as relações evolutivas e análises de diversidade dos mesmos. A genética molecular têm sido a principal metodologia na identificação de espécies crípticas, permitindo análises em qualquer fase de desenvolvimento dos organismos (larval e juvenil).

A identificação errônea de espécie pode ter várias consequências, desde a subestimação da biodiversidade local, e ameaça de extinção de espécies raras e/ou ainda não descritas, que podem não estar sendo protegidas por serem morfológicamente similares a outras espécies mais comuns (Frankham *et al.* 2008).

Devido às limitações existentes na identificação morfológica, a taxonomia associada a dados de sequências de DNA tem sido frequentemente utilizada a partir dos anos 2000 (Dayrat, 2005), principalmente com o desenvolvimento de marcadores moleculares para complementar

os dados de taxonomia tradicional (análises morfológicas), o sequenciamento de fragmentos de DNA se tornou uma metodologia mais rápida e informativa para resoluções taxonômicas, pois permitiu a disponibilização desses dados em bancos de dados de DNA.

Marcadores baseados em análise de genes mitocondriais têm sido utilizados nas últimas três décadas como marcadores moleculares de diversidade animal, devido as mitocôndrias possuírem um genoma próprio, denominado DNA mitocondrial (mtDNA) onde apresenta-se como uma molécula circular, fita dupla e compacta.

O DNA mitocondrial é variável em populações naturais devido à sua maior taxa de mutação em relação ao DNA nuclear. O DNA mitocondrial pode gerar algum sinal sobre a história evolutiva da população em curtos períodos de tempo. Este marcador tem sido o mais utilizado para reconstrução de relações filogenéticas em vários níveis taxonômicos, de populações a filos, e resolução de incertezas taxonômicas (Galtier *et al.* 2009).

Um fragmento mitocondrial, o Citocromo C oxidase subunidade I (COX1 ou COI), foi proposto como uma ferramenta padronizada para a taxonomia e identificação molecular (Galtier *et al.* 2009), conhecida como DNA *barcoding* (Hebert *et al.* 2003a). O DNA *barcoding* proposto por Hebert *et al.* (2003), consiste na utilização de uma região de aproximadamente 650 pares de bases do gene mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade I, esta região ficou conhecida como o “código de barras” genético.

A metodologia envolve o sequenciamento dessa porção do DNA de um organismo, e posteriormente são quantificadas as distâncias intraespecíficas e interespecíficas das sequências. Também é feita a comparação dessas com outras sequências previamente depositadas em um banco de dados. As espécies são identificadas pela similaridade da sequência obtida com sequências disponíveis no banco de dados (Hebert *et al.* 2003a, b; 2004a).

O primeiro estudo baseado nesta metodologia avaliou o potencial do gene COI como uma ferramenta taxonômica para identificação de metazoários. Na realização dos testes para identificação dos organismos foram utilizadas 55 amostras para o nível de filo, 50 para ordem e 150 para espécie. Foram obtidos 96,4%, 100% e 100% respectivamente de confiança na identificação taxonômica. Desta forma esta metodologia foi considerada ideal na identificação molecular de espécies, validando o COI como uma sequência *barcoding* para identificação de metazoários em escala mundial (Hebert *et al.* 2003a).

Análises de polimorfismos nas sequências do gene COI têm sido utilizados nos estudos com camarões para caracterizar e identificar populações de espécies crípticas (Gusmão *et al.* 2013). O conjunto de genes mitocondriais têm sido empregados também em estudo de

diversidade do gênero *Macrobrachium* (Guerra *et al.* 2014; Qing-yi *et al.* 2009; Vergamini *et al.* 2011; Thanh *et al.* 2015; Vera-Silva *et al.* 2016).

Apesar da extensa utilização dos genes mitocondriais em diferentes questões genéticas e evolutivas, faz-se necessário avaliar a possível presença de pseudogenes e heteroplasmia nas análises genéticas, os quais podem interferir na divergência genética oriunda das sequências desses genes, podendo levar a superestimação da biodiversidade.

2.6.1 Heteroplasmia e pseudogenes: implicações na conservação da biodiversidade

O que muitos estudos com genes mitocondriais não abordam é a possibilidade de amplificação de pseudogenes ou a ocorrência de heteroplasmia.

A heteroplasmia pode ser observada pela presença de múltiplos haplótipos de DNA mitocondrial em um único indivíduo/organismo (Magnacca *et al.* 2010).

O nível de heteroplasmia da prole pode ser determinado pela deriva aleatória e seleção purificadora. Estudos afirmam que a presença de heteroplasmia de mtDNA pode dificultar o padrão de herança do mtDNA, mas não afeta a identificação molecular da espécie no gene COI (Koolkarnkhai *et al.* 2019).

Koolkarnkhai *et al.* (2019) na espécie de caranguejo *Portunus pelagicus* verificaram que a maioria das variantes heteroplásmicas hereditárias apresentou mutação silenciosa através da transição. Segundo eles geralmente ocorrem mutações do tipo transição e não geram alteração na sequência de aminoácidos.

A heteroplasmia de mtDNA também pode envolver repetições em *tandem* na região de controle não codificante do genoma mitocondrial (Williams *et al.* 2017). No caranguejo da espécie *Callinectes sapidus* foi observado um número elevado de haplótipos, totalizando 24 haplótipos em um único indivíduo, sendo caracterizado a heteroplasmia oriunda de análises com genes de mtDNA. O número de haplótipos observado nessa espécie pode ser explicado por mutações acumuladas e erros na replicação, acarretando no acúmulo de sequências divergentes (Williams *et al.* 2017).

Os pseudogenes são cópias não funcionais das sequências mitocondriais que foram incorporadas ao genoma nuclear, sendo conhecidos como DNA mitocondrial nuclear (ou *nuclear mitochondrial pseudogenes* - Numts) (Leite, 2012). A explicação da presença de pseudogenes mitocondriais são as duplicações que ocorrem em uma parte do mtDNA e subsequentes eventos de transferência horizontal para o genoma nuclear (Williams & Knowlton, 2001).

O gene mitocondrial COI é um gene que tem a função de codificar proteína possuindo um quadro de leitura aberto, ou seja, não incluem códons de parada ou *indels* (Buhay, 2009). No entanto, o pseudogene mitocondrial é um gene mitocondrial transferido para o núcleo, que perde a sua função original, favorecendo o desenvolvimento e acúmulo de mutações, mesmo que a taxa de mutação do DNA nuclear seja mais lenta que a do genoma mitocondrial. A estrutura do pseudogene é semelhante ao do mtDNA do qual se origina, porém eles podem ter códons de parada e não ter códon de início, dessa forma causando mudanças no quadro de leitura da codificação de proteínas, resultando em sequências não funcionais que não podem ser traduzidas em proteínas funcionais (Gerstein & Zheng 2006; Leite, 2012; Schizas, 2012).

Se em um produto de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tiver grande proporção de pseudogenes em comparação aos fragmentos de genes ortólogos do mtDNA, é possível gerar sequências inequívocas de genes parálogos. Isso acontece quando os iniciadores conservados ditos “universais” amplificam preferencialmente pseudogenes por causa da similaridade relativamente ancestral da sequência destes com o mtDNA ortólogo (Song *et al.* 2008).

Song *et al.* (2008), em duas linhagens de artrópodes (gafanhotos) e peixe, amplificaram pseudogenes utilizando iniciadores universais de COI descritos por Hebert *et al.* (2004), tendo em seus resultados a superestimação de espécies. O mesmo foi encontrado em estudo com crustáceos, como o de Williams & Knowlton, (2001) em camarões do gênero *Alpheus* e Kim *et al.* (2013), em caranguejos do gênero *Austinograea*.

Portanto é necessário a síntese de iniciadores específicos de cada grupo animal para evitar a estimação errônea da diversidade genética das espécies, visto que a amplificação de pseudogenes é um problema que todos os estudos baseados em PCR podem enfrentar, incluindo estudos de filogeografia e filogenia usando mtDNA. É por isso que estes estudos não devem ser apoiados apenas em dados de um marcador, torna-se necessário enfatizar a congruência entre vários marcadores, através da taxonomia integrativa, agregando dados morfológicos, fisiológicos, ecológicos, entre outros (Dayrat, 2005).

É necessário a integração de marcadores, devido a genes parálogos estarem sendo utilizados no lugar dos ortólogos para reconstruções filogenéticas, levando a reconstruções errôneas e superestimação da diversidade genética animal. Para evitar erros nas análises com mtDNA, Song *et al.* (2008) sugere procurar ambiguidade entre sequências, verificar os cromatogramas com presença de ruídos ou picos duplos, fazer a tradução das sequências em busca de códons de parada e comparar as sequências amplificadas com outras sequências publicadas de espécies intimamente relacionadas.

Como parte da estrutura do DNA *barcoding*, foi fundado o CBOL (*The Consortium for the Barcode of Life*), uma organização internacional, cujo o intuito foi disponibilizar o potencial do *barcoding* como uma ferramenta prática para identificação e delimitação de todas as espécies animais (Hebert *et al.* 2003a, b; 2004a).

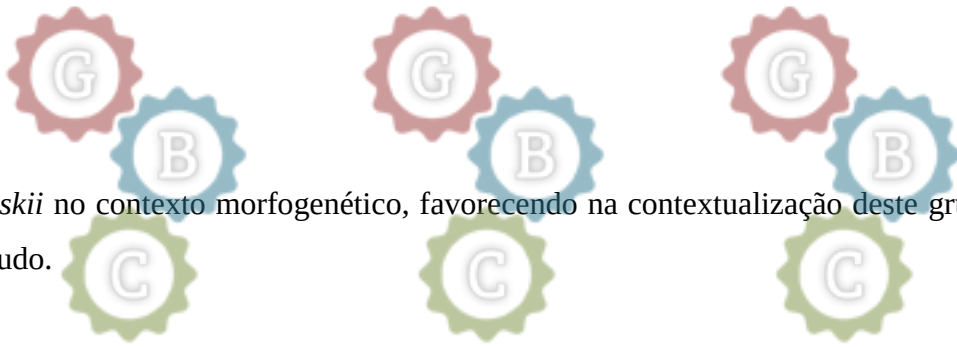
Existem bancos de dados específicos de diversos grupos animais, como: FISH-BOL (*Fish Barcode of Life*), ABBI (*All Birds Barcode Initiative*) e All-Leps (*Lepidoptera Barcode of Life*) (Costa & Carvalho, 2007). E existe também uma plataforma bioinformática mundial que é o banco de dados BOLD (*Barcode of Life Data Systems*), com sequências de COI depositadas de diversos grupos animais.

Outros bancos de dados como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) conhecido como GenBank, possuem dados *online* com sequências nucleotídicas publicamente disponíveis para quase 260.000 espécies formalmente descritas (Benson *et al.* 2013). O BOLD e GenBank tem sido utilizado em muitos estudos como bancos de dados de referência para identificação de espécies. Bilgin *et al.* (2014) utilizaram esses bancos de dados para identificação genética de doze espécies de camarões (Decapoda), comparando as suas sequências, com as disponíveis no GenBank e BOLD. Atualmente existem plataformas online que têm sido incluídas às análises de DNA *barcoding*, garantindo a melhor confiabilidade dos dados, tais como o sistema de BINs. O *Barcode Index Numbers* (BIN) é uma ferramenta disponível gratuitamente na plataforma BOLD, as sequências depositadas são submetidas à análise BIN, validando as sequências depositadas como *barcode tags*. Além disso podem indicar unidades taxonômicas operacionais distintas (OTUs) a partir de dados de sequências sem informações taxonômicas anteriores.

As utilizações de sequências de banco de dados em análises filogenéticas devem ser cuidadosas, pois banco de dados genômicos como o GenBank possuem sequências com códons de parada, incluindo sequências de crustáceos. Apesar de Buhay (2009) relatar que o GenBank agora está identificando essas sequências como “COI like” porque as traduções incluem códons de parada não sendo possível determinar se é um erro de edição da sequência ou pseudogene, já que não possuem os cromatogramas originais para serem examinados (Buhay, 2009). Algumas sequências ainda não estão sendo identificadas como “COI like” e apresentaram códons de parada na tradução, como as sequências do estudo de Vergamini *et al.* (2011) com camarão de água doce do gênero *Macrobrachium*.

Visto a plasticidade fenotípica decorrente de adaptações ambientais e variabilidade genética presente no gênero *Macrobrachium*, neste estudo iremos analisar espécimes da espécie

M. jelskii no contexto morfo genético, favorecendo na contextualização deste grupo na região de estudo.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a variabilidade morfo genética na espécie de camarão de água doce *Macrobrachium jelskii* amostradas em rios e represa do Sul e Sudoeste da Bahia.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar e comparar a forma e tamanho do cefalotórax dos espécimes adultos coletados através da morfometria geométrica;
- Verificar possíveis diferenças morfológicas nos diferentes pontos de coleta;
- Realizar a identificação molecular da referida espécie através do gene COI;
- Analisar a presença de pseudogenes mitocondriais no gene COI da espécie *M. jelskii*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

A dissertação foi organizada na forma de capítulos. O primeiro foi submetido à revista *Nauplius The Journal of The Brazilian Crustacean Society* (crustacea.org.br/pt/nauplius/), e o segundo será submetido a revista *Journal of Crustacean Biology* (academic.oup.com/jcb). Sendo assim, ambos encontram-se nas normas estabelecidas pelas revistas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA). Disponível em: <https://www.ana.gov.br/as-12-regioes-hidrograficas-brasileiras/atlantico-leste>. Acessado em: 10/07/2019.

BARRETO, SB. et al. 2016. Is *Nematocharax* (Actinopterygii, Characiformes) a monotypic fishgenus?. *Genome* 59: 851–865.

BENSON, DA.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, DJ.; OSTELL, J. & SAYERS, EW. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Research*, vol. 41, D1, D36-D42.

BILGIN, R.; UTKA, MA.; KALKAN, E.; KARHAN, SU.; BEKBOLET, M. 2014. DNA barcoding of twelve shrimp species (Crustacea: Decapoda) from Turkish seas reveals cryptic diversity. *Research Article*. n. 2009, p. 36 – 45.

BOOKSTEIN, FL. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press: Cambridge, UK. 435p.

BUHAY, JE. 2009. “COI-LIKE” Sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology*, 29(1): 96–110.

CASTELIN M., MAZANCOURT V., MARQUET G., ZIMMERMAN G. & KEITH P. 2017. Genetic and morphological evidence for cryptic species in *Macrobrachium australe* and resurrection of *M. ustulatum* (Crustacea, Palaemonidae). *European Journal of Taxonomy* 289: 1–27.

CINTRA, IHA. SILVA, KCA. MUNIZ, APM. 2003. Ocorrência de *Macrobrachium rosenbergii* (de man, 1879) em áreas estuarinas do estado do Pará (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). 2003. *Bol. Téc. Cient. Cephnor, Belém*, v.3, n.1, p. 219-227.

CHEN, P.C.; TZENG, T.D.; SHIH, C.H.; CHU, T.J.; LEE, Y.C. 2015. Morphometric variation of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in Taiwan. *Limnologica*. 52: 51-58.

COELHO, PA.; ALMEIDA, AO.; SOUZA-FILHO, JF.; BEZERRA, LEA.; GIRALDES, BW. 2006. Diversity and distribution of the marine and estuarine shrimps (Dendrobranchiata, Stenopodidea and Caridea) from North and Northeast Brazil. *Zootaxa*, p. 41-62.

COSTA, FO.; CARVALHO, G. R. 2007. The Barcode of Life Initiative : synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of Fish. *Genomics, Society and Policy*, v. 3, n. 2, p. 29–40.

DAYRAT, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85:407–415.

FRANKHAM, R. et al. 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação*, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 280 p.

FORNEL, R. & ESTRELA, PC. 2012. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. *Temas em Biologia*. Erechim, Edifapes, p. 101-120.

GALTIER, N., NABHOLZ, B., GLÉMIN, S., HURST, GDD. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, vol. 18, p. 4541-4550.

GERSTEIN, M.; ZHENG, D. 2006. The Real Life of Pseudogenes. *Scientific American*, p. 49-55.

GUERRA, AL. 2011. Caracterização molecular da estrutura genética de populações e espécies de camarões palemonídeos do gênero *Macrobrachium*. Campus de São José do Rio Preto – UNESP. Dissertação Mestrado em Genética. 82 p.

GUERRA, AL.; LIMA, AVB.; JÚNIOR, RVL.; CHIACHIO, MC.; TADDEI, FG.; CASTIGLIONI, L. 2014. Genetic variability and phylogenetic aspects in species of the genus *Macrobrachium*. *Genetics and Molecular Research* p. 3646-3655.

GUNZ, P.; MITTEROECKER, P. 2013. Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24 (1): 103–109.

GUSMÃO, J.; PIERGIORGE, R. M.; TAVARES, C. 2013. The Contribution of Genetics in the Study of the Sea-Bob Shrimp Populations from the Brazilian Coast. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, p. 323 – 338.

HEBERT, PDN.; CYWINSKA, A.; BALL, SL.; DEWAARD, JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, vol. 270, n. September 2002, p. 313–321.

HEBERT, PDN.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, JR. 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome C Oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society*, v. 270, supl.1, p. 96–99.

HEBERT, PDN.; STOECKLE, MY.; ZEMLAK, TS.; FRANCIS, CM. 2004a. Identification of birds through DNA Barcodes. *Plos Biology*, v.2, n.10, p.312.

INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS (INEMA). Comitês de Bacias. Disponível em: <<http://www.inema.ba.gov.br/gestao-2/comites-de-bacias/comites/cbh-contas/>>. Acessado em: 20 de janeiro de 2019.

JESUS, IS.; MEDEIROS, RLS.; CESTARI, MM.; BEZERRA, MA.; AFFONSO, PRAM. 2014. Analysis of metal contamination and bioindicator potential of predatory fish species along Contas River basin in Northeastern Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 92:551-556.

KIM, SJ.; LEE, KY.; JU, SJ. 2013. Nuclear mitochondrial pseudogenes in *Austinograea alayseae* hydrothermal vent crabs (Crustacea: Bythograeidae): effects on DNA barcoding. 13, 781–787.

KLINGENBERG, CP & POLAK, M. 2003. Developmental instability as a research tool: using patterns of fluctuating asymmetry to infer the developmental origins of morphological integration. in M Polak (ed.), *Developmental Stability: Causes and Consequences*. Oxford University Press, Oxford, pp. 427-442.

KOOLKARNKHAI, P.; INTAKHAMA, C.; SANGTHONG, P.; SURAT, W.; WONNAPINI, P. 2019. *Portunus pelagicus* mtDNA heteroplasmy inheritance and its effect on the use of mtCR and mtCOI sequence data. Mitochondrial DNA, p. 848–860.

LEITE, L.A.R. 2012. Mitochondrial pseudogenes in insect DNA barcoding: differing points of view on the same issue. Biota Neotropica, 12 (3).

LOPES, AG. 2014. Análises isoenzimáticas, moleculares e ultraestruturais em camarões dulcícolas do gênero *Macrobrachium*. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética do Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, p. 127.

MAGNACCA, KN.; BROWN, MJF. 2010. Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in *Hawaiian Hylaeus* (Nesoprosopis) bees (Hymenoptera: Colletidae). 10:74.

MAGALHÃES, PS.; SIMÕES, NR.; SONODA, SL. 2016. Limnologia de rios intermitentes: a bacia hidrográfica do rio Jequiezinho como estudo de caso. In: MORAES, MEB., and LORANDI, R., orgs. *Métodos e técnicas de pesquisa em bacias hidrográficas* [online]. Ilhéus, BA: Editus, p. 163-181.

MANTELATTO, FL.; TORATI, LS.; PILEGGI, LG.; MOSSOLIN, EC.; TEROSSI, M.; CARVALHO, FL.; ROCHA, SS. & MAGALHÃES, C. 2016. Avaliação dos Camarões Atídeos (Decapoda: Atyidae), Cap. 20, p. 252-267. In: Pinheiro, M. & Boos, H. (Org.). Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014. Porto Alegre, RS, Sociedade Brasileira de Carcinologia - SBC, 466.

MATTOS, BC. et al. 2014. Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da zona costeira e marinha. Departamento de Biodiversidade Aquática, mar e antártica: Ministério do Meio Ambiente, Brasília/DF.

MELO, G.A.S. 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. 1 ed. Editora, Loyola. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. p. 429.

MIRANDA, FJV. 2012. A Pesca Lúdica e Desportiva no Nordeste Transmontano (Bacia do Douro, Portugal). Bragança: Escola Superior Agrária de Bragança. Dissertação de Mestrado em Gestão de Recursos Florestais. 100 p.

MONTEIRO, LR. & REIS, SF. 1999. Princípios de Morfometria Geométrica. Ribeirão Preto, Holos Editora Ltda, 188 p.

MORAES, SASN.; ALENCAR, C.E.R.D.; FRANSOZO, A.; COSTA, R.C.; CASTILHO, A.L.; Freire, F.A.M. 2018. Sexual and ontogenetic morphometric variation in *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae): a new approach with linear and angular morphometric data. Invertebrate Reproduction & Development.

MORAES, SASN.; ALENCAR, C.E.R.D.; LIMA, SMQ.; FREIRE, FAM. 2020. Shape variation of the prawn *Macrobrachium jelskii* (Palaemonidae: Decapoda) in the Neotropical semiarid drainages: an intra- and inter-basin investigation. Marine and Freshwater Research.

SAMPAIO, SR.; NAGATA, JK.; LOPES, LO.; MASUNARI, S. 2009. Camarões de águas continentais (Crustacea, Caridea) da Bacia do Atlântico oriental paranaense, com chave de identificação tabular. *Acta Biológica Paranaense*, Curitiba, 38 (1-2): p.11-34.

SCHIZAS, NV. 2012. Misconceptions regarding nuclear mitochondrial pseudogenes (Numts) may obscure detection of mitochondrial evolutionary novelties. *Aquatic Biology*, 17: 91–96.

SECRETARIA DOS RECURSOS HÍDRICOS SANEAMENTO E HABITAÇÃO (SRHSH). 1993. Plano Diretor de Recursos Hídricos Bacia do rio de Contas: diagnóstico do sistema físico. Salvador: SRHSH. 160 p.

SEVERI, W.; EL-DEIR, ACA.; FÉLIX, RTS.; LUZ, SCS.; CALADO NETO, AV.; COSTA, BDF.; CHAGAS, RJ. & BARRETTO, MG. 2010. Composição e abundância da ictiofauna na área de influência dos reservatórios de Pedra e Funil, bacia do rio de Contas, Bahia. In: MOURA, AN.; ARAÚJO, EL.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, MC.; PIMENTEL, RMM. & ALBUQUERQUE, UP. Reservatórios do Nordeste do Brasil: biodiversidade, ecologia e manejo. Bauru: NUPEEA. p. 541-572.

SILVA, JC. 2010. Biologia e ecologia dos camarões de água doce *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) e *Macrobrachium jelskii* (Miers 1778) (crustacea: caridea: palaemonoidea) no rio grande, região de planura, MG. São Paulo: Universidade Estadual Paulista. Tese de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Zoologia.

SILVA, LN.; ALMEIDA, RSA.; MENDES, RAS. 2018. Dimorfismo sexual e alometria ontogenética em *Goyazana castelnaui* (Crustacea, Brachyura). *Iheringia, Série Zoologia*, p. 1-8.

SONG, H.; BUHAY, JE.; WHITING, MF.; CRANDALL, KA. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *PNAS*, 105: 13486–13491.

REGIER, JC.; SHULTZ, JW.; ZWICK, A.; HUSSEY, A.; BALL, B.; WETZER, R.; MARTIN, JW.; CUNNINGHAM, CW. 2010. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature*, v. 463, p.1079-1083.

ROCHA, SS.; BARBOSA, RJ. 2017. Population biology of *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Decapoda, Palaemonidae) from an artificial pond in Bahia, Brazil. *Nauplius The Journal of The Brazilian Crustacean Society*. 25: 2358-2936.

ROSSI N, MANTELATTO FL. 2013. Molecular analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) supports the existence of a single species throughout its distribution. *PLoS ONE*; 8(1):e54698.

RUFFINI, RBM.; SCALICI, M. 2013. Morphological variation in riverine cyprinids: a geometric morphometric contribution. *Italian Journal of Zoology*, 80:4, 536-546.

PRAGER, A.; MILHORANCE, F. 2018. Cerrado: Agribusiness may be killing Brazil's 'birthplace of waters'. Disponível em: <<https://news.mongabay.com/2018/03/cerrado-agribusiness-may-be-killing-brazils-birthplace-of-waters/>> Acessado em: 08/09/2020

PILEGGI, LG.; MANTELATTO, FL. 2010. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebrate Systematics*, 24, 194–208.

PILEGGI, LG.; MANTELATTO, FL. 2012. Taxonomic revision of doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, 102(4):426-437.

PILEGGI, LG.; MAGALHÃES, C.; BUCKUP-BOND, G.; MANTELATTO, FL. 2013. New records and extension of the known distribution of some freshwater shrimps in Brazil. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84: 563-574.

PINHEIRO, M. A. A.; HEBLING, NJ. 1998. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), in Valenti, W.C. (ed.), *Carcinicultura de água doce. Tecnologia para produção de camarões*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília, p. 21-46.

PINHEIRO, M.; BOOS, H. 2016. Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014. Porto Alegre, RS: Sociedade Brasileira de Carcinologia – SBC, 466p.

QING-YI, Z.; QI-QUN, C.; WEI-BING, G. 2009. Mitochondrial COI Gene Sequence Variation and Taxonomic Status of Three *Macrobrachium* Species. *Zoological Research*, 30(6):613-619.

THANH. HN.; LIU, Q.; ZHAO, L.; ZHANG, H.; LIU, J.; HAI, DN. 2015. Genetic diversity of cultured populations of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in China using mtDNA COI and 16S rDNA markers. *Biochemical Systematics and Ecology* p. 261-269.

TORRES, M.V.; GIRI, F.; COLLINS, P.A. 2014. Geometric morphometric analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Decapoda: Palaemonidae) at a microgeographical scale in a floodplain system. *Ecological Research*. 29: 959–968.

VERA-SILVA, A.L.; CARVALHO, F.L.; MANTELATTO, F.L. 2016. Distribution and genetic differentiation of *Macrobrachium jelskii* (miers, 1877) (Natantia: Palaemonidae) in Brazil reveal evidence of non-natural introduction and cryptic allopatric speciation. *Journal of Crustacean Biology*, 36(3), 373-383.

VERA-SILVA, A.L.; CARVALHO, F.L.; MANTELATTO, F.L. 2017. Redescription of the freshwater shrimp *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Caridea, Palaemonidae). *Zootaxa*, (1): 044-060.

VERGAMINI, F.G; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. 2011. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Produção Intelectual - BDPI, Universidade de São Paulo. Contributions to Zoology*, 80 (1): 67-83.

VOGT, G. 2012. Abbreviation of larval development and extension of brood care as key features of the evolution of freshwater Decapoda. *Biological Reviews*. p. 1-35.

WILLIAMS, EP.; Feng, X.; Place, AR. 2017. Extensive Heteroplasmy and Evidence for Fragmentation in the *Callinectes sapidus* Mitochondrial Genome. *Journal of Shellfish Research*. 36(1):263-272.

WILLIAMS, S.T.; KNOWLTON, N. 2001. Mitochondrial Pseudogenes Are Pervasive and Often Insidious in the Snapping Shrimp Genus *Alpheus*. *Molecular Biology and Evolution*, 18(8):1484–1493.

ZIMMERMANN, G.; BOSC, P.; VALADE, P.; CORNETTE, R.; AMÉZIANE, N.; DEBAT, V. 2012. Geometric morphometrics of carapace of *Macrobrachium australe* (Crustacea: Palaemonidae) from Reunion Island. *Acta Zoologica (Stockholm)* 93: 492–500.

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

6. Capítulo 1: Variabilidade morfológica de *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Decapoda, Palaemonidae) determinada por fatores biológicos e ambientais

Leticia Oliveira Barbosa¹

Somira Santana de Souza¹

Lorena Andrade Nunes²

Ana Karina de Francisco³

Marcelo Cervini¹

1 Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Avenida José Moreira Sobrinho, S/N. 45205-490, Jequié, Bahia, Brasil.

LOB E-mail: let94sp@gmail.com

MC E-mail: marcelo_cervini@yahoo.com.br

SSS E-mail: salsouzabio@gmail.com

2 Programa de Pós-Graduação em Enfermagem e Saúde, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Avenida José Moreira Sobrinho, S/N. 45205-490, Jequié, Bahia, Brasil.

LAN E-mail: lorenunes2@gmail.com

3 Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Avenida José Moreira Sobrinho, S/N. 45205-490, Jequié, Bahia, Brasil.

AKF E-mail: karinabrotas@yahoo.com.br

Leticia Oliveira Barbosa - orcid.org/0000-0002-0781-0781

Somira Santana de Souza - orcid.org/0000-0003-4897-6267

Lorena Andrade Nunes - orcid.org/0000-0002-7453-7666

Ana Karina de Francisco - orcid.org/0000-0003-3318-9738

Marcelo Cervini - orcid.org/0000-0002-0271-3130

Variabilidade morfológica de *Macrobrachium jelskii*

Resumo

O camarão de água doce *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877), possui tanto importância no consumo humano como na manutenção da cadeia trófica e apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, podendo apresentar diferentes morfotipos. Desta forma, analisamos a variação da forma e tamanho do cefalotórax e rostro de *M. jelskii* em diferentes ambientes do Estado da Bahia, utilizando da morfometria geométrica. Foram inseridos 3 marcos e 7 semimarcos no lado direito do cefalotórax de fêmeas adultas. Foram realizadas as análises de sobreposição Procrustes, seguida de uma regressão para verificar efeito de alometria, Análise de Componentes Principais, função discriminante, validação cruzada, distância de Procrustes, Análise de Variância Multivariada e UPGMA. Como resultado, obtivemos para todas as análises a formação de quatro morfotipos populacionais, com variações encontradas na forma do cefalotórax, comprimento do rostro e tamanho. Estas alterações podem ser devidas a mudanças para acomodação das gônadas, visto que os camarões estavam em estágios distintos de maturação gonadal, tendo cefalotórax dorsalmente comprimido ou expandido; e a fatores ambientais, como a distância hidrológica, a localização geográfica, clima e o ambiente aquático, já que nas variações morfológicas entre as populações, tiveram o rostro comprimido em ambientes com menor taxa de predação e alongado para defesa. Dentro da espécie *M. jelskii* verificamos variações morfológicas importantes, as quais refletem da maturação das gônadas até adaptações ambientais destes camarões que apresentam grande plasticidade fenotípica.

Palavras-chave: forma; morfometria geométrica; variação; maturação gonadal

Introdução

Os camarões de água doce da família Palaemonidae (Rafinesque, 1815), pertencentes à infraordem Caridea (Dana, 1852), estão amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais. Dentre os palaemonídeos, 246 espécies válidas pertencem ao gênero *Macrobrachium* (Spence Bate, 1868) (Pinheiro e Boos, 2016), das quais 19 ocorrem em diferentes regiões no Brasil (Pileggi e Mantelatto, 2012).

A espécie *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877), é caracterizada por ser uma espécie generalista, habitando ambientes lênticos e lóticos, sendo importantes na cadeia trófica e utilizados no consumo humano (Vera-Silva *et al.*, 2016). Esta espécie possui o desenvolvimento larval abreviado o que limita a sua dispersão e fluxo gênico entre as populações, o que pode acarretar em variabilidade intraespecífica (Vogt, 2012). Vera-Silva *et al.*, (2016), encontraram dois clados dentro da espécie, porém não houve diferenças morfológicas para a consistência do mesmo, sugerindo divergência recente dentro da espécie. A variabilidade encontrada na espécie pode estar sendo perdida devido a atividade de introdução antrópica da mesma.

Macrobrachium jelskii pode ser encontrada por exemplo na bacia do rio de Contas que ocupa uma área de 55.483 km² na região centro-sul do estado da Bahia, abrangendo 76

municípios (INEMA, 2015), esta bacia é uma das seis mais importantes do estado. Ela consiste de um ambiente lótico que possui pelo menos dois domínios morfoclimáticos, o semiárido (caatinga) e o semiúmido (mata atlântica), à medida que se aproxima de sua foz, no oceano Atlântico. A partir destes climas a bacia é dividida em alto, médio e baixo Contas (SRHSH, 1993). Esta bacia tem sido alvo de impactos antrópicos, como efluentes urbanos, resíduos industriais, agrícolas e de mineração, além da presença de barragens (Jesus *et al.*, 2014). Barreto *et al.*, (2016) encontraram divergências em indivíduos do gênero de peixes *Nematocharax* na região do alto Contas, através da análise de morfometria geométrica e DNA mitocondrial, sugerindo uma nova espécie para este gênero monotípico, enfatizando a importância da bacia do rio de Contas como área prioritária para a conservação.

O crescente aumento da degradação e poluição dos ambientes aquáticos contribui para perda de diversidade da sua fauna, limitando o conhecimento das populações e seus padrões biológicos, os quais são fundamentais para a conservação das espécies (Pereira *et al.*, 2017). Atualmente, existem diversas metodologias que permitem verificar a composição de estoques aquáticos. A morfometria geométrica é uma dessas metodologias e vem sendo utilizada em estudos de crustáceos (Konan *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2014; Bissaro *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2012, Moraes *et al.*, 2020) resultando na análise estatística de variação e covariação da forma de estruturas biológicas. Estudos referente a morfometria geométrica da espécie *M. jelskii* são escassos, principalmente na bacia do rio de Contas, e esta abordagem se torna importante permitindo verificar diferenças na forma que podem indicar diferentes papéis funcionais desempenhados pela espécie, como de respostas a diferentes pressões seletivas, indicando padrões de história de vida que variam entre subpopulações, movimento limitado entre grupos e plasticidade fenotípica (Cadrin, 2000).

O conhecimento da biologia da espécie *M. jelskii* em águas interiores do Sul e Sudoeste da Bahia, mais precisamente na bacia do rio de Contas do Estado da Bahia, é de fundamental importância pois irá ajudar na compreensão da estrutura populacional e variabilidade local. Desta forma, no presente estudo analisamos a variação da forma e tamanho corporal de populações do camarão de água doce *M. jelskii*, com o objetivo de inferir e explicar as variações morfológicas populacionais em diferentes ambientes do Estado da Bahia.

Material e Métodos

Área de estudo

As coletas foram realizadas em quatro ambientes aquáticos diferentes da bacia do rio de Contas e da represa Boa Vista, Estado da Bahia, Brasil. Dois locais de amostragem com impactos antrópicos estão nos municípios de Jequié e Ipiaú. O primeiro está localizado na zona de transição entre a região semiárida e semiúmida e o último na região semiúmida. Outro local de amostragem é o rio Santo Antônio, afluente do rio de Contas, no município de Itagi, que apresenta um substrato rochoso e é cercado por pastagens e plantações. Por fim, o quarto local de amostragem fica na represa Boa Vista, município de Jitaúna, um ambiente lântico, cercado por Mata Atlântica e isolado do rio de Contas. Todos os ambientes aquáticos possuem águas escuras e vegetação aquática marginal (Fig. 1).

Delineamento amostral

Espécimes fêmeas de *M. jelskii* foram coletados em diferentes períodos descritos na tabela abaixo com os dados das localidades de amostragem (Tab. 1). As coletas foram realizadas com o auxílio de um puçá na vegetação marginal do rio/represa. Os espécimes coletados foram colocados em frascos etiquetados, separados por localidade, ponto e data de coleta, sendo fixados em etanol 70%.

A identificação morfológica da espécie e sexagem de todos os exemplares foi realizada em microscópio estereoscópio. Os sexos foram diferenciados pelos caracteres sexuais específicos de acordo com a presença (machos) ou ausência (fêmeas) do apêndice masculino, localizado no segundo par de pleópodes (Mejía-Ortíz *et al.*, 2008). A identificação morfológica foi com base em Melo, (2003), Valencia e Campos (2007), Sampaio *et al.*, (2009) e Vera-Silva *et al.*, (2017). Para as estimativas de maturação dos indivíduos foi mensurado o comprimento do cefalotórax (CC = da margem pós-orbital até a margem posterior do cefalotórax) com um paquímetro digital (precisão: 0,01 mm).

Análise da morfometria geométrica

Foram fotografados o lado direito do cefalotórax de 108 indivíduos fêmeas adultas, utilizando uma câmera Canon PowerShot SX240 HS modo automático, com ausência de zoom. O cefalotórax dos camarões foi a região escolhida por ser mais rígida e conservada. A partir das imagens foi criado um arquivo com o formato TPS através do *software* tpsUtil 1.76 (Rohlf, 2015). Posteriormente, foram digitalizados marcos e semimarcos (Tab. 2) e feitas as medidas utilizando o *software* tpsDig 2.30 (Rohlf, 2017), para maior precisão dos marcos foi realizada a calibração do medidor com repetições na digitalização dos marcos por no mínimo 72 horas. Os marcos e semimarcos foram definidos a partir do critério da precisão da localização e da possibilidade de serem visualizados no cefalotórax de todos os indivíduos. Foram inseridos três marcos e sete semimarcos no lado direito do cefalotórax (Fig. 2).

Após a marcação de todos os marcos e semi-marcos, estes foram ajustados de acordo com a sobreposição generalizada de Procrustes (GPA) no *MorphoJ* versão 2.0 (Klingenberg, 2011). Os semimarcos são alinhados através das coordenadas de Procrustes, que remove os efeitos de rotação, translação e escala, analisando apenas a forma através das informações geométricas dos organismos, removendo o tamanho e os efeitos do espaçamento arbitrário. Otimizando a posição dos semimarcos em relação à forma média de toda a amostra (média das coordenadas da forma de Procrustes) (Gunz e Mitteroeckerb, 2013).

Em seguida foi realizada uma Análise de Regressão com 10.000 repetições para verificar se a forma do cefalotórax dos indivíduos varia em função do tamanho, ou seja, verificar o efeito da alometria. Os dados de forma foram tratados com Análise de Variância Multivariada (MANOVA), para verificar as diferenças entre as amostras, utilizando o programa PAST versão 2.17 (Hammer *et al.*, 2001). Posteriormente, foram realizadas a Análise de Componentes Principais (ACP), função discriminante, validação cruzada e a distância de Procrustes calculada com 10.000 permutações para obtenção do p-valor, a partir do programa *MorphoJ* versão 2.0 (Klingenberg, 2011). A partir da distância de Procrustes foi realizada uma análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) no PAST versão 2.17 (Hammer *et al.*, 2001).

O tamanho do cefalotórax de cada indivíduo foi estimado de acordo com os estudos de Barros *et al.*, (2012) e Silva *et al.*, (2019), e posteriormente foi feita a Análise de Variância (ANOVA) para verificar se há diferenças de tamanho entre as populações, e as médias foram comparadas por meio do Teste de Tukey, realizados no programa PAST versão 2.17 (Hammer *et al.*, 2001).

Resultados

Análise do comprimento do cefalotórax

Todos os indivíduos analisados foram identificados como fêmeas adultas de acordo com a ausência do apêndice masculino, presença de maturação gonadal na região dorsal do cefalotórax e comprimento do cefalotórax de acordo com Barros *et al.*, (2012) e Silva *et al.*, (2019). O tamanho do comprimento do cefalotórax foi mensurado para cada localidade, e o comprimento médio e desvio padrão variou entre as populações, sendo que em Jequié foram observados indivíduos menores, e, em Jitaúna, os indivíduos maiores. Todas as populações tiveram presença de fêmeas ovígeras, exceto em Jequié. Os dados do comprimento do cefalotórax (mm) e desvio padrão estão na Tab. 3.

Análise da morfometria geométrica

A análise de regressão demonstrou não haver efeito de alometria ($p > 0.05$). A MANOVA foi estatisticamente significativa ($p < 0.01$), indicando que existe diferenças na forma do cefalotórax entre as populações.

A ACP também indicou diferenças na forma do cefalotórax dos camarões entre as populações analisadas. Os dois primeiros eixos da ACP explicam 65.6% da variação total. O primeiro eixo (PC1) explicou 47.7% e o segundo eixo (PC2) explicou 17.9% da variação entre as populações (Fig. 3-A). O eixo positivo da PC1 foi constituído pelos indivíduos coletados em Itagi. O *outline* (Fig. 3-C) mostra que as diferenças morfológicas dos indivíduos coletados nessa localidade estão associadas ao cefalotórax ser comprimido na região posterior e o rostro alongado. Enquanto o eixo negativo da PC1, foi constituído dos indivíduos de Jitaúna (Fig. 3-B). Pelo *outline* é possível verificar que o cefalotórax é mais expandido posteriormente e rostro mais comprimido em relação as demais localidades (Fig. 3 – B). O eixo positivo da PC2 foi constituído pelos indivíduos de Ipiaú, onde o cefalotórax mais expandido na região dorsal, comprimido posteriormente e rostro alongado (Fig. 3 –D). Enquanto o eixo negativo da PC2 foi formado por indivíduos de Jequié, tendo o cefalotórax expandido posteriormente, com uma compressão dorsal e rostro alongado (Fig. 3 – E).

A validação cruzada revelou que em média 86.90% dos espécimes foram classificados corretamente dentro dos seus respectivos grupos, sendo que os maiores índices de classificação correta (96.86%) foram nos municípios de Ipiaú e Jequié, ressaltando as diferenças entre estes

municípios. O menor índice (70.99%) foi em Itagi e Ipiaú, demonstrando que são os municípios com menores variações morfológicas, mas com 70.99% de possibilidade de serem distintos, corroborando com os dados da ACP.

O teste de distância de Procrustes fortalece a aproximação morfológica entre as populações Ipiaú e Itagi (0.0217), e as populações que ficaram mais distantes foram Jitaúna e Itagi (0.0619), sendo a de Jitaúna com maior variação na forma em relação as demais. Porém, todas as populações foram estatisticamente diferentes na forma do cefalotórax (Tab. 4; Fig. 4).

Podemos observar o mesmo resultado no dendrograma gerado pelo método UPGMA com 1000 permutações e com base na distância de Procrustes, que teve um índice de correlação cofenética de 87.63%, evidenciando a consistência dos agrupamentos. A população mais bem definida com altos valores de suporte (100% de *bootstrap*) foi a de Jitaúna, tendo a forma mais distinguível entre as populações. Em seguida verifica-se as diferenças associadas as populações de Jequié, Ipiaú e Itagi, mas em concordância com os resultados da validação cruzada, as populações com mais similaridade morfológica são Ipiaú e Itagi, mas ainda tendo diferenças no cefalotórax como foi evidenciado na ACP (Fig. 4).

A ANOVA aplicada ao tamanho do cefalotórax foi significativa ($p < 0.01$) revelando diferenças entre os valores médios, e o teste de Tukey demonstrou que os indivíduos coletados em Jequié são menores e os de Jitaúna são maiores. Além disso, não houve diferenças significativas entre Itagi e Ipiaú para o tamanho do cefalotórax (Fig. 5).

Discussão

No presente estudo coletamos apenas indivíduos fêmeas, isso pode ser devido ao fato de que todas as populações foram coletadas na margem dos rios/represa e próximo a vegetações. O local de coleta influencia na proporção de machos e fêmeas capturados, pois as fêmeas buscam abrigo entre a vegetação marginal, e as plantas aquáticas são importantes áreas de desova e viveiro (Lucena *et al.*, 2020). Este padrão de predominância de fêmeas de *Macrobrachium jelskii* também foi relatado nos estudos de Barros-Alves *et al.* (2012) em Minas Gerais e Rocha e Barbosa (2017) em Cruz das Almas, na Bahia. E o maior número de fêmeas na população favorece um maior índice de fertilização (Taddei *et al.*, 2017), sendo importante para *M. jelskii* que possui uma reprodução contínua. Além disso os machos da espécie não são territoriais sendo altamente móveis, o sucesso reprodutivo é de acordo com o número de fêmeas que eles fertilizam, dessa maneira uma proporção maior de fêmeas iria favorecer o número de

fêmeas disponíveis para o acasalamento, o que aumentaria a produção reprodutiva da população (Rocha e Barbosa, 2017).

Além disso, para o gênero *Macrobrachium* a proporção sexual favorável as fêmeas, pode ser devido a predação dos machos, já que as fêmeas se refugiam em locais para se tornarem menos susceptíveis aos predadores. As diferentes condições ambientais e de predação podem atuar de forma distinta na mortalidade de cada sexo (Silva *et al.* 2019).

A análise de morfometria geométrica do cefalotórax realizada no presente estudo revelou variações morfológicas entre as quatro populações. As variações se concentraram na forma do cefalotórax e comprimento do rostro. Esses resultados podem ser devido a maturação gonadal (Ventura *et al.* 2019) e fatores ambientais e geográficos (Konan *et al.*, 2010; Bissaro *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015). Sabe-se que em camarões os efeitos do ambiente e seleção natural podem produzir diferenças morfométricas dentro de uma espécie e entre diferentes áreas geográficas, mesmo quando essas áreas são espacialmente próximas e não são separadas por barreiras físicas, e essas variações como tamanho do corpo e maturidade sexual são influenciadas pelas condições de habitat correlacionadas com a latitude (por exemplo, temperatura da água e suprimento alimentares/nutrientes) (Carvalho *et al.*, 2019). A temperatura exerce grande influência sobre a taxa metabólica e o fluxo de energia e, consequentemente, no crescimento de crustáceos (Montagna, 2011).

A influência sazonal pode ser descartada, visto que em *M. jelskii* estudos afirmam a presença de indivíduos jovens e fêmeas ovígeras ao longo de todo ano, sendo a sua reprodução classificada como contínua, ou seja, se reproduz durante todo o ano, embora possa sofrer influência da precipitação por favorecer a disponibilidade de alimentos e das temperaturas mais altas que estimulam o desenvolvimento gonadal (Barros-Alves *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2015; Rocha e Barbosa, 2017). É importante ressaltar que todas as localidades estudadas no presente estudo tiveram presença de fêmeas ovígeras e não ovígeras, exceto em Jequié (somente não ovígeras, mas em estágio de maturação gonadal).

As análises da forma do cefalotórax realizadas no presente estudo apresentaram separação para todas as populações. Os indivíduos de Jequié, Ipiaú e Itagi apresentaram maior similaridade apesar de serem estatisticamente diferentes quanto a forma do cefalotórax, o que era esperado, pois foram coletados em localidades com relativa proximidade, em rios que pertencem à mesma bacia hidrográfica (Bacia do rio de Contas) e possuem um ambiente lótico. Os indivíduos de Ipiaú e Itagi não tiveram diferenças significativas no tamanho e foram mais próximos morfologicamente, podendo ser pelo fato do rio Santo Antônio desaguar mais próximo de Ipiaú, o que poderia ajudar na conectividade hidrológica (Torres *et al.*, 2014). Mas

a espécie *M. jelskii* possui o desenvolvimento larval abreviado, o qual está associado à redução da dispersão e do fluxo gênico (Vogt, 2012), sendo a distância hidrológica um fator limitante para esta espécie, o que pode reduzir o fluxo gênico proporcionando diferenças entre as características morfológicas dessas populações.

Contra nossas expectativas, indivíduos coletados em locais distintos do mesmo rio (rio de Contas, em Jequié e Ipiaú) ou em um afluente do rio de Contas (rio Santo Antônio, em Itagi), apresentaram diferenças morfológicas. Essas variações podem ser devido ao local de coleta, visto que as populações foram coletadas em ambientes com níveis distintos de preservação. O trecho do rio Santo Antônio em Itagi é uma área com vegetação marginal preservada, substrato rochoso e baixo impacto antrópico, somente pastagens e plantações. Por outro lado, o trecho do rio de Contas em Ipiaú e Jequié recebe efluentes urbanos, industriais, agrícolas e resíduos de mineração, tendo contaminação por metais pesados (Jesus *et al.*, 2014) e são utilizados como área de lazer pelos banhistas.

Os indivíduos coletados em Itagi, apresentaram o rostro mais alongado. Em um estudo com camarão da espécie *Xiphopenaeus kroyeri*, os autores descrevem que o rostro alongado, pode ser uma resposta evolutiva da interação presa-predador no nível morfológico, já que a coluna rostral alongada serviria de proteção contra a deglutição por um predador (Moraes *et al.*, 2018). Em *M. jelskii*, o alongamento do rostro ajudaria na defesa de fêmeas adultas contra predadores, como peixes carnívoros, dentre eles, *Hoplias malabaricus* e *Serrasalmus brandtii* presentes na bacia do rio de Contas (Jesus *et al.* 2014), visto que os camarões são os principais itens alimentares dessas espécies de peixes (Corrêa e Piedras, 2009).

O rio de Contas tem climas diferentes ao longo da bacia, ocorrendo em uma transição do semiárido da Caatinga para o clima semiúmido da Mata Atlântica. Os municípios de Jequié, Ipiaú e Itagi pertencem ao trecho médio Contas, que engloba essa zona de transição, onde o clima de Itagi e Ipiaú fica cada vez mais úmido, e o de Jequié geralmente mais seco (SRHSH, 1993). O clima pode influenciar na temperatura da água, refletindo na morfologia dos camarões. O desenvolvimento dos tecidos gonadais são influenciados pela temperatura da água (Soares *et al.* 2015), e pode influenciar na estrutura do cefalotórax, devido ao processo de muda que ocorre durante a maturação gonadal (Lobão *et al.* 1996).

Assim, a diferença na morfologia do cefalotórax comprimido posteriormente dos indivíduos de Ipiaú e Itagi em relação as demais localidades, também pode ser devida à situação geográfica dos dois rios. O trecho do rio de Contas em Ipiaú e o rio Santo Antônio em Itagi estão localizados na região de Mata Atlântica, portanto, estavam sob a mesma variação climática, tornando os indivíduos mais similares.

O cefalotórax da população de Ipiaú foi mais expandido dorsalmente, essa característica pode ser devido às fêmeas já estarem em seu estágio completo de maturação gonadal (desenvolvido), e com ovários maduros preenchendo toda a cavidade cefalotorácica dorsal (Silva *et al.*, 2007). Maiores dimensões do cefalotórax em fêmeas podem corresponder ao desenvolvimento do ovário e produção de ovócitos, representando o aumento na fertilidade (Bissaro *et al.*, 2013).

A população de Jequié apresentou algumas diferenças na forma, como foi demonstrado em todas as análises, podendo ser devido a maior distância hidrológica e variações na maturação gonadal. A população de Jequié, apresentou o cefalotórax expandido na região posterior e dorsalmente comprimido, além do rostro alongado, e nenhuma fêmea ovígera. A região dorsal do cefalotórax mais comprimida, é a mesma onde são localizadas as gônadas, e esta apresentou estágio de maturação gonadal, sugerindo que se tratam de fêmeas adultas que estão no início da maturação sexual, ou seja, as gônadas não estão maduras o suficiente para que o cefalotórax esteja expandido dorsalmente. Portanto, as variações encontradas no cefalotórax são reflexo do início da maturidade, que nos crustáceos é sinalizado por uma série de transformações morfológicas. Quando estes organismos crescem, algumas de suas dimensões morfológicas aumentam a uma taxa diferente de outras, o que resulta em uma mudança nas proporções corporais conhecida como crescimento relativo (Williner *et al.*, 2014). Ainda, o crescimento dos crustáceos tem a característica de ser descontínuo, ou seja, durante o processo de troca do exoesqueleto, as fêmeas aumentam de tamanho, porém, devido ao processo reprodutivo, utilizam suas reservas energéticas para a maturação das gônadas e, consequentemente reduz a taxa de crescimento (Silva *et al.*, 2007; Montagna, 2011). As diferenças de tamanho no início da atividade reprodutiva também podem estar relacionadas à oferta de itens alimentares ou estresse ambiental (Mascareñas e Torres, 2016).

Além disso, os indivíduos de Jequié apresentaram o menor tamanho médio do cefalotórax (7.4mm) de todos os locais amostrados, podendo ser devido também ao estágio inicial de maturação gonadal e a população não apresentar fêmeas ovígeras, visto que as ovígeras apresentam em média um tamanho maior do cefalotórax (a média varia de 8.21 a 9.21 mm) (Barros *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2019) e a maturidade sexual em fêmeas a jusante de barragem tiveram o cefalotórax em média 8.45 mm (Soares *et al.*, 2015). A obtenção de fêmeas menores nessa localidade pode ser devido ao comportamento reprodutivo dos indivíduos que vivem a jusante da barragem do rio de Contas; sugere-se que em locais que tem presença de barragens as fêmeas maiores e reprodutivamente ativas podem ficar perto da barragem para reproduzir e facilitar a dispersão larval a jusante, este comportamento foi relatado para *M.*

amazonicum no estudo de Rodrigues *et al.*, (2020) no Sudeste do Brasil. Assim, a presença de indivíduos menores na margem do rio, pode ser devido a esta estratégia, que poderia ser utilizada por camarões da espécie *M. jelskii*, pelo fato de sua dispersão ser dificultada pelo seu desenvolvimento larval abreviado (Vogt, 2012).

No presente estudo, os indivíduos de Ipiáu e Jequié foram coletados em um mesmo rio (rio de Contas), mas com diferenças ambientais locais (clima), além disso o período de maturidade gonadal distinto dessas populações refletiram em variações morfológicas no cefalotórax principalmente na região dorsal onde ocorre o desenvolvimento gonadal. Portanto, variações morfológicas como expansão e compressão dorsal do cefalotórax em fêmeas devem ser avaliadas, visto que essas variações são oriundas do estágio gonadal, afim de evitar a superestimação de morfotipos, visto que a maturação influenciou na forma do cefalotórax em fêmeas. Os parâmetros ambientais como temperatura da água podem modificar o período da maturidade nos crustáceos, caracterizando variações entre populações de uma mesma espécie (Soares *et al.* 2015).

Os indivíduos coletados em Jitaúna, na represa Boa Vista, foram os que mais se divergiram dos demais. As diferenças encontradas estão associadas ao fato da população estar isolada em uma represa, sem conexão com o rio de Contas. A barreira geográfica entre o rio e a represa, que impede o fluxo gênico entre as populações, permitindo a diferenciação entre elas (Konan *et al.*, 2010). As principais variações encontradas nestes indivíduos foram o rostro mais comprimido e o comprimento médio do cefalotórax maior que as demais localidades. Estas diferenças podem ser devido ao fato destes indivíduos estarem isolados em região de Mata Atlântica conservada e serem introduzidos no local, passando por um efeito fundador. A represa foi caracterizada visualmente sendo um ambiente lântico, que possui maior disponibilização de alimentos, devido a abundante vegetação marginal que fornecem recursos nutricionais e proteção para as fêmeas ovígeras.

Como estes indivíduos foram introduzidos na represa (comunicação pessoal), e provavelmente habitavam um ambiente lótico de correnteza mais forte. O rostro mais comprimido seria uma característica deste ambiente, Mazancourt *et al.* (2017), relataram que a velocidade da corrente resulta em forças mecânicas mais fortes aplicada ao rostro dessa forma limitando seu crescimento em camarões de água doce *Caridina*. Os diversos parâmetros ambientais que variam de acordo com a velocidade da água, influenciam na forma do cefalotórax. Além disso, diferentes níveis de predação relacionados a diferentes coberturas vegetais podem estimular variação no desenvolvimento do rostro. A forma do cefalotórax também pode variar como uma resposta a plasticidade fenotípica adaptativa, a diferenças nos

níveis de oxigênio em água parada ou em água em movimento (Zimmermann *et al.*, 2012). Espécies de ampla distribuição como a *M. jelskii*, em ambientes heterogêneos ou geograficamente isoladas, podem apresentar variações fenotípicas, pois tendem a apresentar respostas plásticas a diferentes influências ambientais (Rossi e Mantelatto, 2013).

As quatro populações de *M. jelskii* tiveram morfologia distintas, essas variações entre as populações também podem ser oriundas de diferenças genéticas, tendo uma estruturação genética local, visto que estudo com camarões *X. kroyeri* relatou que o fluxo gênico restrito, deriva genética aleatória, novas mutações e seleção natural de subpopulações em diferentes ambientes, podem ser reveladas como variações morfológicas e adaptações locais que mudam as características morfológicas, indicando divergências populacionais (Gusmão *et al.*, 2013).

O estudo da morfologia externa tem sido utilizado por pesquisadores para identificar espécies, descrever estrutura e dinâmica populacional. Diante deste contexto, a morfometria geométrica vem sendo uma ferramenta importante em estudos biológicos, nos informando variações morfológicas que não podem ser estimadas pela taxonomia tradicional e ajudando a compreender a biologia das espécies. Dentro da espécie *M. jelskii* verificamos variações morfológicas importantes, refletindo desde alterações relacionadas a maturação das gônadas dos indivíduos até adaptações ambientais destes camarões que apresentam grande variabilidade morfológica interpopulacional. A compreensão desses parâmetros irá auxiliar em futuras medidas de conservação desta espécie de interesse ecológico e econômico.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por fornecer todas as instalações do laboratório; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fornecer uma bolsa de pesquisa a um de nós (LOB); a Adeilson Sampaio da Silva e Edval Araujo Sobrinho por suas ajudas nas coletas.

Referências

Barreto, S.B. et al. 2016. Is *Nematocharax* (Actinopterygii, Characiformes) a monotypic fishgenus?. *Genome* 59: 851–865.

Barros-Alves, S.P.; Almeida, A.C.; Fransozo, V.; Alves, D.F.R.; Silva, J.C. and Cobo, V.J. 2012. Population biology of shrimp *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1778) (Decapoda, Palaemonidea) at the Grand River at northwest of the state of Minas Gerais, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 24: 266–275.

Bissaro, F.G.; Gomes-JR.J.L.; Beneditto, A.P.M. 2013. Morphometric variation in the shape of the cephalothorax of shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* on the east coast of Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93(3): 683–691.

Cadrin, S.X. 2000. Advances in morphometric identification of fishery stock. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 10: 91-112.

Carvalho, C.; Keunecke, K.A.; Lavrado, H.P. 2019. Morphometric variation in pink shrimp populations at Rio de Janeiro coast (SE Brazil): are they really similar in closer areas?. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 91(2):e20180252

Chen, P.C.; Tzeng, T.D.; Shih, C.H.; Chu, T.J.; Lee, Y.C. 2015. Morphometric variation of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in Taiwan. *Limnologica*. 52: 51-58.

Corrêa, F; Piedras, S.R.N. 2009. Alimentação de *Hoplias* aff. *malabaricus* (Bloch, 1794) e *Oligosarcus robustus* Menezes, 1969 em uma lagoa sob influência estuarina, Pelotas, RS. *Revista Biotemas*, 22 (3): 121-128.

Gunz, P.; Mitteroecker, P. 2013. Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24 (1): 103–109.

Gusmão, J.; Piergiorgio, R.M.; Tavares, C. 2013. The contribution of genetics in the study of the sea-bob shrimp populations from the brazilian coast*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 39(3): 323 – 338.

Hammer, O.; Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Eletrônica*, vol. 4, p. 9.

Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (INEMA). 2015. Comitês de Bacias. Disponível em: <<http://www.inema.ba.gov.br/gestao-2/comites-de-bacias/comites/cbh-contas/>>. Acesso em 29/05/2020

Jesus, I.S.; Medeiros, R.L.S.; Cestari, M.M.; Bezerra, M.A.; Affonso, P.R.A.M. 2014. Analysis of metal contamination and bioindicator potential of predatory fish species along Contas River basin in Northeastern Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 92:551-556.

Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11:353-357.

Konan, K.M.; Adèpo-Gourène, A.B.; Ouattara, A.; Nyingy, W.D.; Gourène, G. 2010. Morphometric variation among male populations of freshwater shrimp *Macrobrachium vollenhovenii* Herklots, 1851 from Côte d'Ivoire Rivers. *Fisheries Research*, 103: 1-8.

Lobão, V.L.; Roverso, V.A.; Lace, M.; Hortencio, E. 1996. Ciclo de muda e crescimento de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1962) e *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) (Decapoda: Palaemonidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, 23:31-45.

Lucena, I.C.; Nascimento, W.N.; Pinheiro, A.P.; Cascon, P. 2020. Ecological responses of two shrimp populations (Palaemonidae) to seasonal abiotic factor variations in a Brazilian semiarid reservoir. *Ethology Ecology & Evolution*.

Martins, J.; Ribeiro, K.; Rangel-Figueiredo, T.; Coimbra, J. 2007. Reproductive cycle, ovarian development, and vertebrate-type steroids profile in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Crustacean Biology*, 27(2): 220–228

Mascareñas, D.R. & Torres A.J. 2016. Carapace shape differences between subterranean and aboveground populations of *Macrobrachium* sp. from Marinduque, Philippines. *ELBA Bioflux*, 8(1):27-33.

Mazancourt, V.; Marquet, G.; Keith, P. 2017. The “Pinocchio-shrimp effect”: first evidence of variation in rostrum length with the environment in *Caridina* H. Milne-Edwards, 1837 (Decapoda: Caridea: Atyidae). *Journal of Crustacean Biology*, 37(3), 249–257.

Mejía-Ortíz, L.M.; Baldari, F.; López-Mejía, M. 2008. *Macrobrachium sbordonii* (Decapoda: Palaemonidae), a new stygobitic species of freshwater prawn from Chiapas Mexico. *Zootaxa*, 1814: 49–57.

Melo, G.A.S. 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. 1 ed. Editora, Loyola. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. p. 429.

Montagna, M.C 2011. Effect of temperature on the survival and growth of freshwater prawns *Macrobrachium borellii* and *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Palaemonidae). *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, 101(3): 233-238.

Moraes, S.A.S.N.; Alencar, C.E.R.D.; Fransozo, A.; Costa, R.C.; Castilho, A.L.; Freire, F.A.M. 2018. Sexual and ontogenetic morphometric variation in *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae): a new approach with linear and angular morphometric data. *Invertebrate Reproduction & Development*.

Moraes, S.A.S.N.; Alencar, C.E.R.D.; Lima, S.M.Q.; Freire, F.A.M. 2020. Shape variation of the prawn *Macrobrachium jelskii* (Palaemonidae: Decapoda) in the Neotropical semiarid drainages: an intra- and inter-basin investigation. *Marine and Freshwater Research*.

Pereira, J.A.; Castro, P.M.; Costa, F.Z.; Santos, M.A.L. 2017. Camarões de água doce (Crustacea: Decapoda) que ocorrem no igarapé Água Boa, municípios de Alto Alegre e Boa Vista, Roraima. *Boletim do Museu Integrado de Roraima*, (2): 39-44.

Pileggi, L.G.; Mantelatto, F.L. 2012. Taxonomic revision of doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, 102(4):426-437.

Rocha, S.S.; Barbosa, R.J. 2017. Population biology of *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Decapoda, Palaemonidae) from an artificial pond in Bahia, Brazil. *Nauplius The Journal of The Brazilian Crustacean Society*. 25: 2358-2936.

Rodrigues, L.R.; Costa, J.R.P.; Passafaro, R.M.; Andrade, L.S. 2020. Do hydroelectric dams affect the abundance and population structure of freshwater shrimps?. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 42: e48928.

Rohlf, F.J. 2015. The tps series of software. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*. ISSN1825-5272.

Rohlf, F.J. 2017. TpsDig version 2.30. New York: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

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.

Sampaio, S. R.; Nagata, J.K.; Lopes, L.O.; Masunari, S. et al. 2009. Camarões de águas continentais (Crustacea, Caridea) da Bacia do Atlântico oriental paranaense, com chave de identificação tabular. *Acta Biológica Paranaense*, 38 (1-2).

Secretaria dos Recursos Hídricos Saneamento e Habitação (SRHSH). 1993. Plano Diretor de Recursos Hídricos Bacia do rio de Contas: diagnóstico do sistema físico. Salvador: SRHSH. 160 p.

Silva, L.N.; Almeida, R.S.A.; Mendes, R.A.S. 2018. Dimorfismo sexual e alometria ontogenética em *Goyazana castelnaui* (Crustacea, Brachyura). *Iheringia, Série Zoologia*, 108: e2018008.

Silva, M.C.N; Frédou, F.L.; Filho, J.S.R. 2007. Estudo do crescimento do camarão *Macrobrachium amazonicum* (heller, 1862) da Ilha de Combú, Belém, Estado do Pará. *Amazônia, Ciência & Desenvolvimento*, Belém, 2: 85-104.

Silva, R.C.; Cunha, M.C.; Mossolin, E.C.; Jacobucci, G.B. 2019. Population structure of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) in Miranda Hydroelectric Plant Reservoir, Araguari river, Minas Gerais, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*. vol. 31, e14.

Soares, M.R.S.; Oshiro, L.M.Y.; Toledo, J. C.; 2015. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium jelskii* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) no Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, 105(3):307-315

Taddei, F.G.; Reis, S.S.; David, F.S.; Silva, T.E.; Fransozo, V.; Fransozo, A. 2017. Population structure, mortality, and recruitment of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae) in the eastern Amazon region, Brazil. *Journal of Crustacean Biology*, 37(2): 131–141.

Torres, M.V.; Giri, F.; Collins, P.A. 2014. Geometric morphometric analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Decapoda: Palaemonidae) at a microgeographical scale in a floodplain system. *Ecological Research*. 29: 959–968.

Valencia, D.M.; Campos, M.R.; 2007. Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of Colômbia. *Zootaxa*, p. 1–4.

Ventura, E; Winick-Silva, A; Shinozaki-Mendes, R.A. 2019. Ovarian development and spawning of *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda). *Iheringia, Série Zoologia*, 109: e2019026.

Vera-Silva, A.L.; Carvalho, F.L.; Mantelatto, F.L. 2016. Distribution and genetic differentiation of *Macrobrachium jelskii* (miers, 1877) (Natantia: Palaemonidae) in Brazil reveal evidence of non-natural introduction and cryptic allopatric speciation. *Journal of Crustacean Biology*, 36(3), 373-383.

Vera-Silva, A.L.; Carvalho, F.L.; Mantelatto, F.L. 2017. Redescription of the freshwater shrimp *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Caridea, Palaemonidae). *Zootaxa*, (1): 044-060.

Vergamini, F.G; Pileggi, L.G.; Mantelatto, F.L. 2011. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Produção Intelectual - BDPI, Universidade de São Paulo. Contributions to Zoology*, 80 (1): 67-83.

Vogt, G. 2012. Abbreviation of larval development and extension of brood care as key features of the evolution of freshwater Decapoda. *Biological Reviews*. p. 1-35.

Williner, V.; Torres, M.V.; Carvalho, D.A.; König, N. 2014. Relative growth and morphological sexual maturity size of the freshwater crab *Trichodactylus borellianus* (Crustacea, Decapoda, Trichodactylidae) in the Middle Paraná River, Argentina. *ZooKeys* 457: 159–170.

Zimmermann, G.; Bosc. P.; Valade, P.; Cornette, R.; Améziane, N.; Debat, V. 2012. Geometric morphometrics of carapace of *Macrobrachium australe* (Crustacea: Palaemonidae) from Reunion Island. *Acta Zoologica (Stockholm)* 93: 492–500.

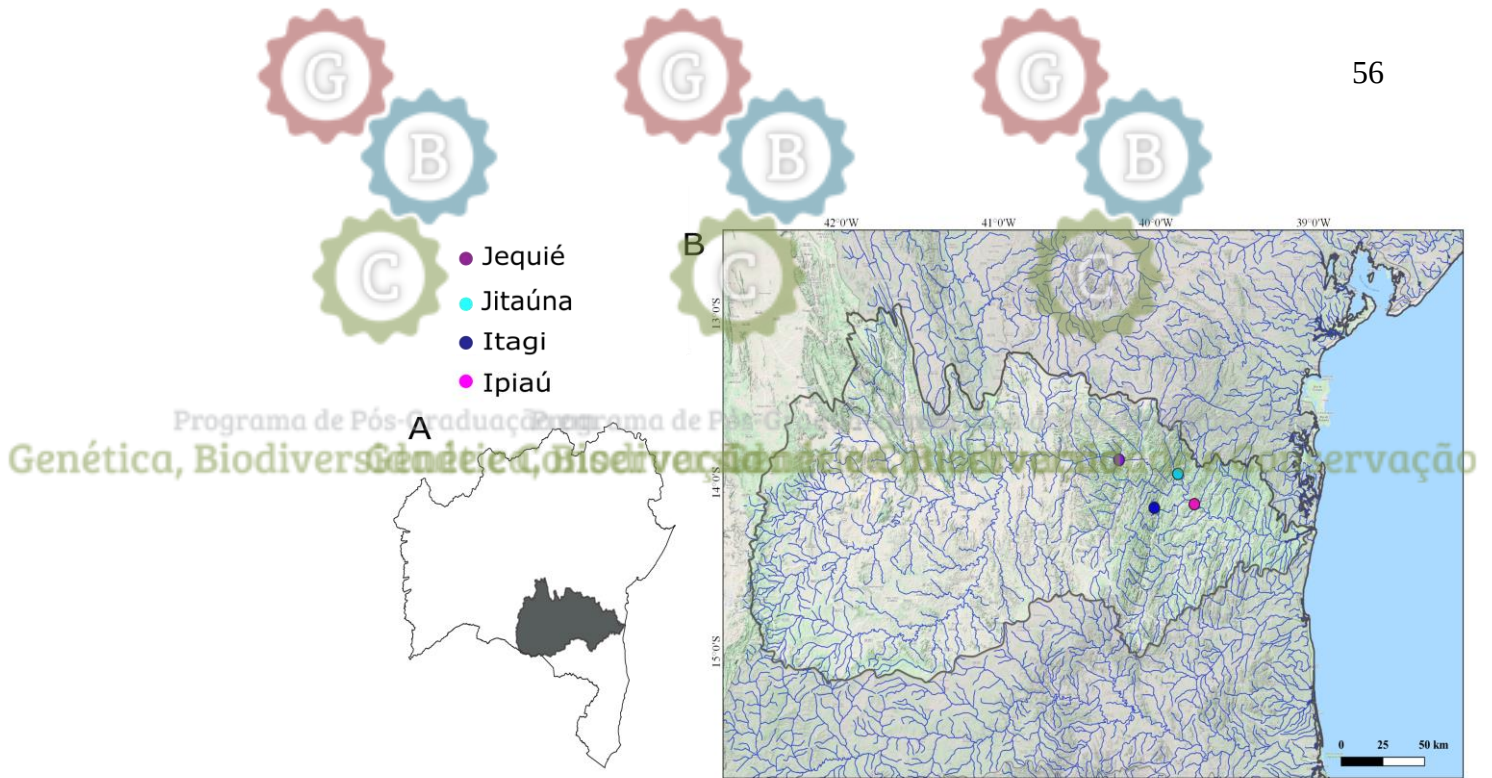


Figura 1. Mapa do Estado da Bahia destacando a bacia do rio de Contas (cinza) (A) elaborado no programa Quantum GIS 3.0.3. Em detalhe, os quatro locais de coleta de *Macrobrachium jelskii* (B).

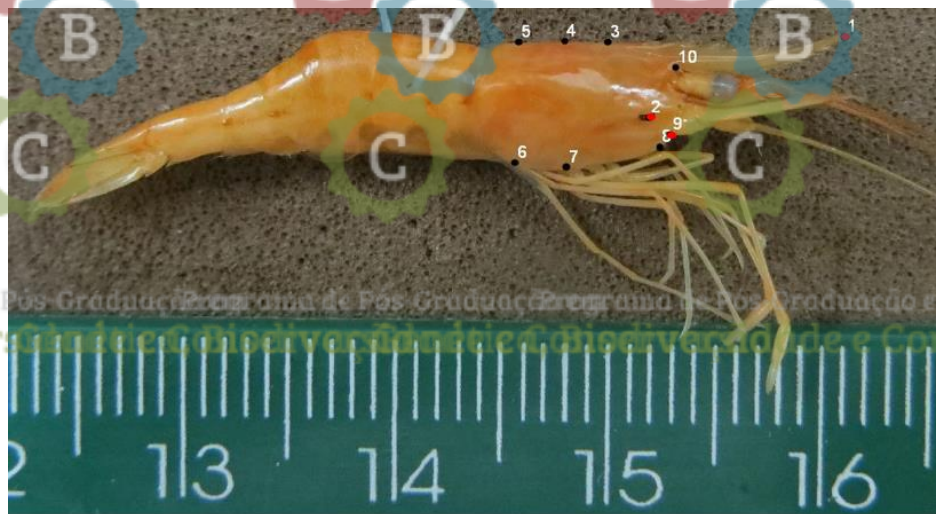


Figura 2. Vista do lado direito do cefalotórax de *Macrobrachium jelskii*. Os pontos vermelhos demonstram os marcos (1) ápice do rostro, (2) espinho hepático, (9) ângulo anterior inferior e os pretos os semimarcos anatômicos (3,4,5,6,7,8,10).

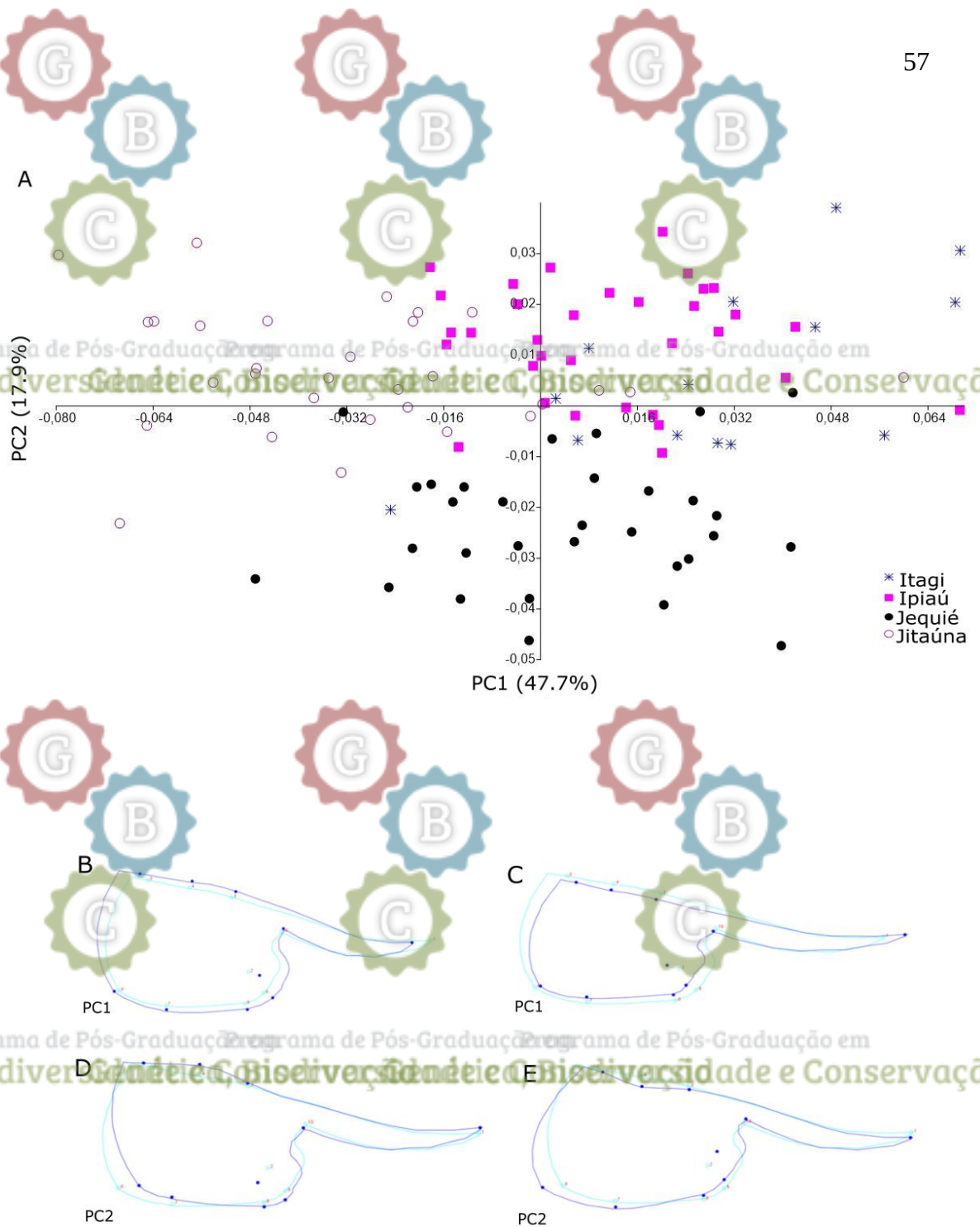


Figura 3. A) Análise de Componentes principais (ACP) para a forma do cefalotórax das fêmeas de *Macrobrachium jelskii*. No gráfico, cada localidade é representada por um símbolo e cor. B, C, D, E) Outlines apresentando as variações na forma dos espécimes. As linhas azuis escuras representam a variação e as linhas azuis claras representam a forma média dos indivíduos. O escore da PC1 (eixo x) positivo está disposto à direita, e o negativo na esquerda, e o escore da PC2 (eixo y) positivo na esquerda e o negativo na direita.

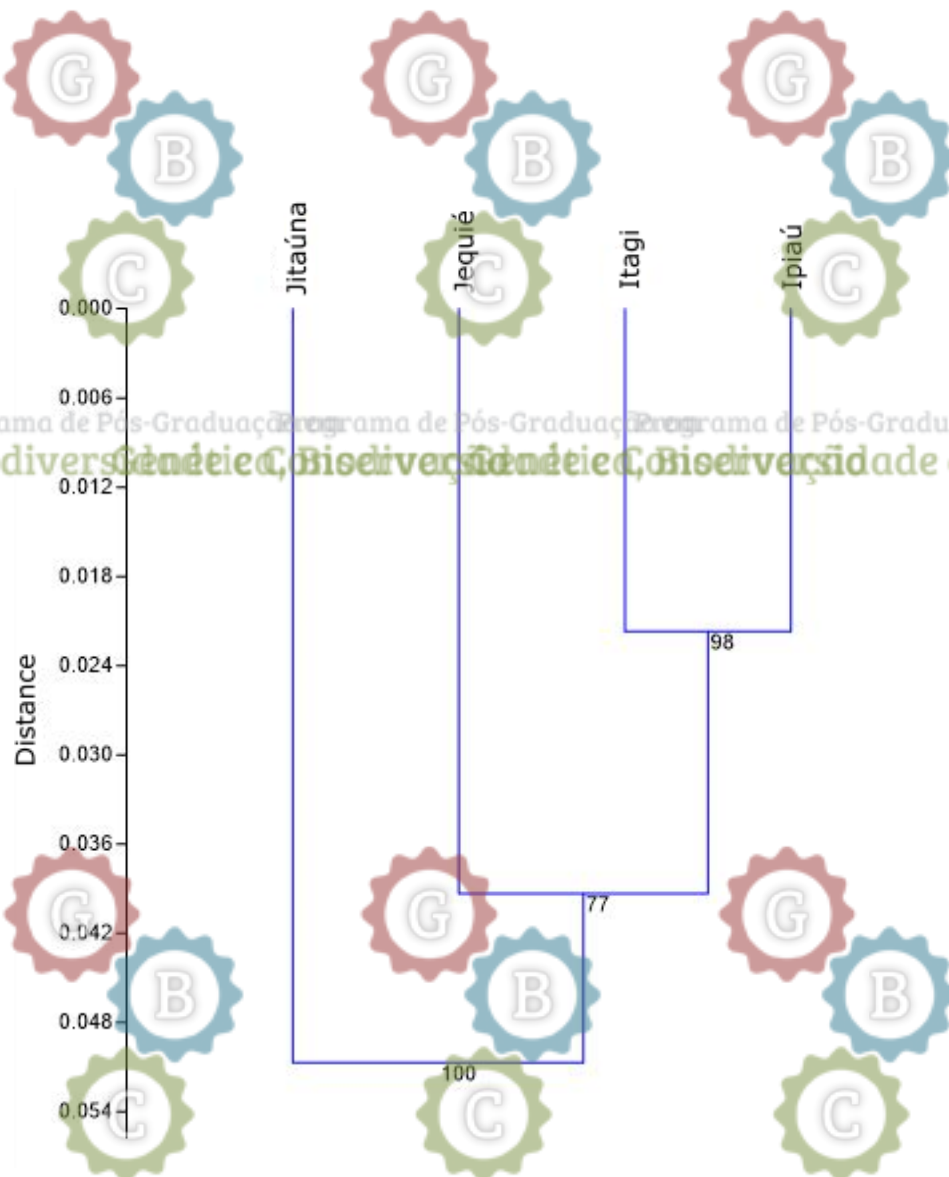


Figura 4. Dendrograma gerado por UPGMA ilustrando as distâncias morfométricas médias entre a forma do cefalotórax de *Macrobrachium jelskii*, oriundas de diferentes localidades do Estado da Bahia, com 1.000 permutações.

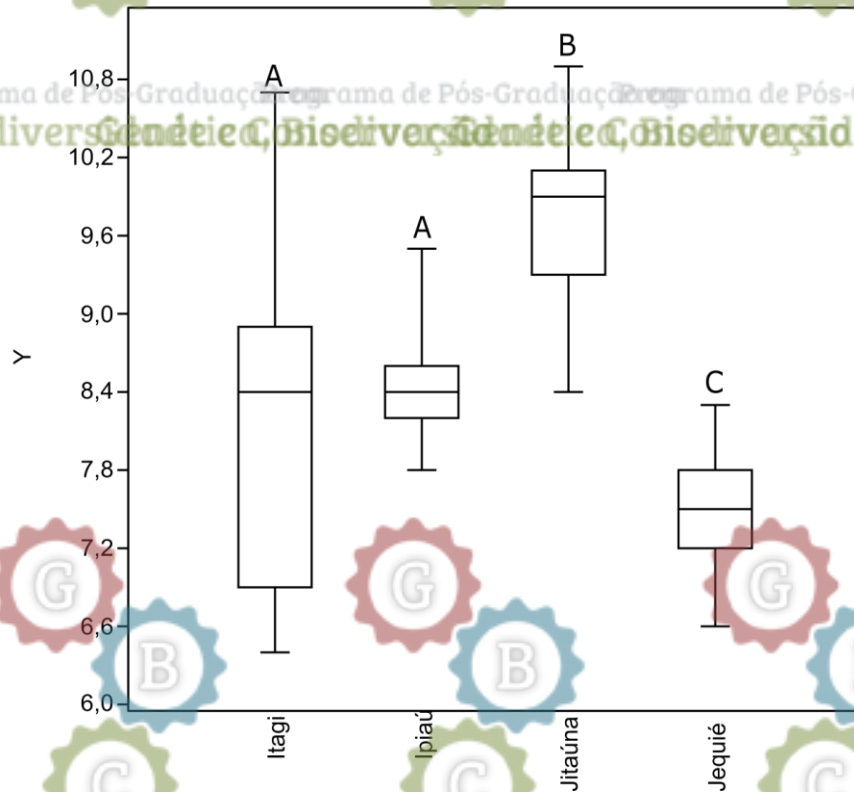


Figura 5. Boxplot do tamanho do cefalotórax obtido para as fêmeas de *Macrobrachium jelskii*. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.01$).

Tabela 1. Dados dos locais de amostragem dos municípios em que foram realizadas as coletas.

Bacias Hidrográficas	Coordenadas Geográficas	Data de Coleta	Localidade
Rio Santo Antônio	14°8' 57"S ; 40°0' 45"W	22/09/2018	Itagi/BA
Rio de Contas	14°7'40,04"S ; 39°45'28,64"W	30/06/2019	Ipiaú/BA
Represa Boa Vista	13°56'56,69"S ; 39°51'44,98"W	01/07/2019	Jitaúna/BA
Rio de Contas	13°51'56,07"S ; 40°14'10,19"W	14/03/2020	Jequié/BA

Tabela 2. Descrição da localização de cada marco e semimarco anatômico implementado no cefalotórax da espécie *Macrobrachium jelskii*.

Número dos marcos e semimarcos no cefalotórax	Marco (<i>Landmarks</i> - LM) ou semimarco (<i>Semilandmarks</i> - SLM)
1	LM: Ápice do rostro
2	LM: Espinho hepático
3	SLM: ponto dorsal anterior
4	SLM: ponto médio dorsal
5	SLM: ponto dorsal posterior
6	SLM: ponto ventral posterior
7	SLM: ponto médio ventral
8	SLM: ponto ventral anterior
9	LM: ângulo anterior inferior
10	SLM: ângulo anterior orbital

Tabela 3. Classes e valores médios do comprimento do cefalotórax (CC) e desvio padrão (SD) de fêmeas de *Macrobrachium jelskii* por localidade de coleta.

Município	Min e Max CC (mm)	Média±SD do CC (mm)	Maturação	Nº de fêmeas ovíferas	Nº de fêmeas não ovíferas
Ipiaú	7.8 – 9.5	8.4±0.36	Adulto	13	20
Itagi	6.4 – 10.7	8.2±1.25	Adulto	2	12
Jequié	6.6 – 8.3	7.4±0.45	Adulto	0	31
Jitaúna	8.4 – 10.9	9.7±0.60	Adulto	19	11

Tabela 4. Teste da distância de Procrustes com 10.000 permutações entre as formas do cefalotórax das populações. Destacado em negrito a menor e maior distância.

Municípios	Ipiaú	Itagi	Jequié	Jitaúna
Ipiaú	-	0.0113	0.0001	0.0001
Itagi	0.0217	-	0.0001	0.0001
Jequié	0.0378	0.0408	-	0.0001
Jitaúna	0.0435	0.0619	0.0466	-

O triângulo inferior esquerdo indica as distâncias entre os locais e o triângulo superior direito fornece os valores de p do teste de permutação para as distâncias entre as formas da população.

7. Capítulo 2: Pseudogenes mitocondriais na espécie *Macrobrachium jelskii* (Decapoda: Palaemonidae) e suas implicações na superestimação da biodiversidade

Leticia O. Barbosa¹, Somira S. de Souza¹, Ana K. de Francisco², Marcelo Cervini¹

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, Universidade

¹Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Avenida José Moreira Sobrinho, S/N. 45205-490, Jequié, Bahia, Brasil

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Avenida José Moreira Sobrinho, S/N. 45205-490, Jequié, Bahia, Brasil

Correspondência; L.O. Barbosa; email: let94sp@gmail.com

Resumo

Os camarões da espécie *Macrobrachium jelskii* são amplamente distribuídos no Brasil, sendo importante tanto para a manutenção da cadeia trófica quanto para o comércio e consumo humano. A identificação dessa espécie baseada na morfologia é dificultada pela sua semelhança morfológica com espécies sintópicas do gênero, principalmente no estágio juvenil. Por esse motivo, utilizamos o DNA *barcoding* (COI) para a identificação molecular, além de estimar a variabilidade genética dentro da referida espécie. As estimativas na variabilidade genética foram superestimadas devido à amplificação de pseudogenes mitocondriais nucleares (Numts). Os pseudogenes foram caracterizados através da presença de picos duplos nos cromatogramas do sequenciamento, códons de parada na tradução e 12 haplótipos com 42 sítios variáveis (polimórficos) e 43 mutações. As sequências de pseudogene tiveram divergência intraespecífica de 2.6% e, quando comparadas com sequências dos bancos de dados, a divergência interespecífica foi de 140.9% em relação as sequências de *M. jelskii* obtidas do BOLD e 135.1% em relação as sequências de *M. rosenbergii* do GenBank. As árvores de *neighbor-joining* (NJ), máxima verossimilhança e inferência bayesiana, apresentaram a mesma topologia, e o pseudogene de *M. jelskii* formou um clado independente nos dois bancos de dados com alto suporte (NJ - 95% e 100% de *bootstrap*). No presente estudo, apresentamos evidências de que os pseudogenes podem acarretar em superestimação da biodiversidade. Esses resultados podem ajudar em futuros estudos taxonômicos e filogenéticos usando genes mitocondriais em camarões de água doce. Dentro dessa perspectiva torna-se importante a utilização de genes nucleares e de outras ferramentas integrativas, como morfológicas e ecológicas, para reduzir a superestimação de espécies.

Palavras-chave: COI, divergência, pseudogene

Introdução

O gênero *Macrobrachium* (Spence Bate, 1868) (Decapoda: Palaemonidae) é compreendido com 246 espécies válidas que habitam regiões tropicais e subtropicais. Inúmeras espécies, possuem interesse comercial e são importantes para a manutenção da cadeia trófica (Zimmermann *et al.*, 2012). Os estudos taxonômicos deste gênero 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 (Lopes, 2014). Isso é observado principalmente em espécies sintópicas e que apresentam muitas semelhanças morfológicas conservadas (principalmente no estágio juvenil), como *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) e *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). De fato, alguns estudos evidenciam uma alta proximidade entre essas espécies, tanto morfolologicamente e geneticamente (Lopes, 2014; Guerra *et al.*, 2014). Vera-Silva *et al.*, (2017) fizeram a redescrição da espécie *M. jelskii*, destacando caracteres morfológicos para identificação da espécie, afim de evitar identificação errônea com espécies similares, como a *M. amazonicum* e *M. acanthurus* (Wiegmann, 1836).

Os camarões da espécie *Macrobrachium jelskii* são endêmicos da América do Sul. São exclusivamente dulcícola e de desenvolvimento larval abreviado (três estágios larvais), sendo que os dados genéticos existentes são incipientes na região de estudo. Vale ressaltar que a taxonomia alfa correta é essencial para a organização do conhecimento da diversidade biológica, principalmente na região Neotropical, onde a fauna de camarão de água doce é subestimada (Magalhães *et al.*, 2016).

Devido às limitações existentes na identificação morfológica, referente ao estado de preservação do material biológico e desenvolvimento, a taxonomia associada a dados de sequências de DNA tem sido frequentemente utilizada, principalmente com os marcadores moleculares baseados em genes mitocondriais. O fragmento mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade I (COI), foi proposto como uma ferramenta padronizada para a taxonomia e identificação molecular da diversidade de diversos animais (Galtier *et al.*, 2009), sendo conhecida como DNA *barcoding* (Hebert *et al.*, 2003).

Essa metodologia é baseada no sequenciamento dessa região do DNA e vem sendo utilizada em diversos estudos com crustáceos com eficiência (Qing-yi *et al.*, 2009; Vergamini *et al.*, 2011; Thanh *et al.*, 2015; Vera-Silva *et al.*, 2016).

Vera-Silva *et al.*, (2016), analisaram a espécie *M. jelskii* utilizando os genes mitocondriais COI e 16S, e identificaram a presença de dois clados (clado amazônico e costeiro) com maior divergência genética entre os mesmos, porém com ausência de sinapomorfia

morfológica consistente para sugerir uma espécie críptica para *M. jelskii*. E a distribuição atual da espécie é devido a introdução antrópica o que pode acarretar em perda da diversidade e homogeneização da espécie.

Entretanto apesar da identificação taxonômica eficaz do DNA *barcoding*, a variabilidade genética dentro das espécies estudadas utilizando essa metodologia pode ser superestimada devido a possibilidade de amplificação de pseudogenes, também conhecidos como DNA mitocondrial nuclear (Numts), os quais representam cópias não funcionais das sequências mitocondriais que foram incorporadas ao genoma nuclear (Leite, 2012). A transferência do gene mitocondrial para o núcleo, faz com que a função do gene seja perdida, acumulando mutações (Gerstein & Zheng, 2006).

A análise baseada somente no DNA *barcoding* (Hebert *et al.*, 2003), foi criticada por Song *et al.* (2008), pelo fato da amplificação de pseudogenes utilizando iniciadores universais descrito por Hebert *et al.* (2004), terem resultado em uma superestimação de espécies. As sequências originadas através do gene COI devem ser verificadas detalhadamente, principalmente no que se refere a qualidade do sequenciamento, códons de parada e similaridade com outras sequências do gene COI de banco de dados (Song *et al.*, 2008), visto que os pseudogenes não reconhecidos em estudos filogenéticos ou populacionais podem revelar delimitação errônea da biodiversidade, como observados em alguns estudos com camarões (Williams & Knowlton, 2001; Moraes, 2017). E as análises taxonômicas devem ser realizadas de forma integrativa, incluindo dados morfológicos, fisiológicos, ecológicos e comportamentais (Dayrat, 2005).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é analisar a possibilidade de pseudogenes na espécie *M. jelskii* do Estado da Bahia, e suas implicações em estudos que visam inventariar à biodiversidade por meio do gene mitocondrial COI.

Material e métodos

Obtenção do material biológico

No total 165 espécimes fêmeas de *Macrobrachium jelskii* foram coletados entre os meses de Setembro de 2018 e Março de 2020. As coletas foram realizadas com o auxílio de um puçá na vegetação marginal do rio/represa (Tab. 1).

A identificação morfológica e sexagem de todos os exemplares foi realizada em microscópio estereoscópio, diferenciando os sexos pelos caracteres sexuais específicos de

acordo com Mejía-Ortíz *et al.* (2008). A identificação morfológica dos camarões foi com base em Melo, (2003), Valencia & Campos (2007), Sampaio *et al.* (2009) e Vera-Silva *et al.* (2017). As amostras de tecido muscular abdominal foram retiradas de cada indivíduo coletado, armazenadas em álcool etílico à 99.5% e estocadas em freezer a -20°C, e posteriormente os indivíduos foram armazenados em álcool 70%.

Extração do DNA genômico

Foi realizada extração do DNA (ácido desoxirribonucléico) utilizando o kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA) de acordo com o fabricante com algumas modificações. A integridade e qualidade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0.8% e corado com azul de bromofenol e GelRed® (Invitrogen) na proporção 3:1.

Amplificação e sequenciamento do gene Citocromo C oxidase subunidade I (COI)

Para identificação molecular da espécie foi amplificado fragmentos do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I (COI). Foram testados os seguintes iniciadores descritos na Tab. 2.

Os parâmetros de desnaturação inicial foram de 60 segundos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 52°C e 60 segundos a 72°C, com extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1.2 %.

Após a amplificação, foi realizado a purificação dos fragmentos com polietilenoglicol 20%. Em seguida foram sequenciados bidireccionalmente pelo método de dideoxirribonucleotídeos terminais (ddNTPs) (Sanger *et al.*, 1977) usando o Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems/Life Technologies, USA).

Para a reação de sequenciamento foi utilizado 2.5 µl de água ultrapura, 2 µl de tampão BigDye, 1 µl do mix BigDye terminator, 1 µl de *primer* (20 µM) e 5 µl do produto de PCR purificado. Os parâmetros utilizados foram: 1 minuto a 96°C; 25 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 52°C e 4 minutos a 60°C. Em seguida as amostras foram precipitadas utilizando-se 80µl de isopropanol 75% e 200µl etanol a 70% e depois foram enviadas para leitura na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) de Salvador, Bahia.

Análise dos dados do DNA mitocondrial

As sequências *forward* e *reverse* obtidas foram editadas e utilizadas para a construção de uma sequência consenso no programa *DNA Baser Sequence Assembler* v. 4.16 (Heracle BioSoft, 2013). Em seguida, as sequências foram traduzidas no programa *MEGA* v.6 (Tamura *et al.*, 2013) a fim de verificar possíveis códons de parada. O alinhamento final das sequências foi realizado com a ferramenta *Clustal W Multiple Alignment* (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.1.9 (Hall, 1999). Cada sequência do presente estudo foi testada para a saturação de substituições utilizando gráficos de transições e transversões contra distância F84 no *DAMBE5* (Xia, 2013).

As distâncias intra e interespecífica entre grupos foram obtidas no *MEGA* v.6 (Tamura *et al.*, 2013) e a árvore de *Neighbor-Joining (NJ)* (Saitou & Nei, 1987) baseada no método de substituição nucleotídica Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) com 1000 réplicas de *bootstrap*.

Para confirmar a confiabilidade dos ramos foram realizadas as análises probabilística de máxima verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (BI), utilizando os *softwares* *RaxML-HPC BlackBox* v.8 e *MrBayes on XSEDE* v. 3.2.7, ambos implementados na plataforma *online* *CIPRES Science Gateway* (<https://www.phylo.org/portal2>). Na ML os valores de suporte dos ramos foram estimados pelo teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1000 pseudoréplicas.

Os modelos selecionados na BI foram: no primeiro banco de dados (BD1) foi o modelo HKY+G e no segundo bando de dados (BD2) foi TPM2uf+G obtidos no *jModelTest* (Posada, 2008). As árvores geradas foram editadas nos programas *FigTree* v.1.4.4 (Rambaut, 2014) e a construção da árvore resumo foi realizada no *Inkscape* v. 1.0.

Os cálculos da estatística sumária (diversidade haplotípica – H_d e diversidade nucleotídica – π) e a caracterização do polimorfismo das sequências, número de mutações e sítios variáveis foram realizados com o programa *DNA Sequence Polymorphism* (*DnaSP* v.6). Foi construído uma rede de haplótipos com o programa *DnaSP* v.6 com o parâmetro *Midian Joining Network* (Bandelt *et al.* 1999) a partir do cálculo dos vetores medianos, implementado no programa *PopArt (Population Analysis with Reticulate Trees)* (<http://popart.otago.ac.nz>).

Obtenção do banco de dados

Para efeitos comparativos foram adicionadas ao banco de dados do presente estudo, sequências obtidas das plataformas gratuitas (*Barcode of Life Data Systems* - BOLD) e GenBank (Tab. 4). As análises foram realizadas em dois bancos de dados de sequências. O primeiro (denominado de BD1) incluiu 21 sequências do gene COI de *M. jelskii* do BOLD e do presente estudo (13 sequências obtidas através dos iniciadores COIa e COIf). As sequências do BOLD foram utilizadas para validar a região amplificada como gene COI, devido a confiabilidade das sequências depositadas na plataforma, as quais passam por um processo criterioso de qualidade, sendo analisadas quanto a presença de códons de parada e atribuídas a um *Barcode Index Numbers* (BIN), procedimento previsto pelo sistema BOLD depois de validar as sequências depositadas como *barcode tags*. Este sistema BIN divide as sequências de COI em unidades taxonômicas operacionais moleculares. Todas as sequências de *M. jelskii* do BOLD utilizadas no conjunto de dados são referentes aos BINs ADK1112 e ADK1113.

O segundo banco de dados (denominado BD2) foi constituído por 95 sequências do gênero *Macrobrachium* do GenBank selecionadas utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Alignment Search Tool*) juntamente com 4 sequências de *M. amazonicum* de pseudogene do GenBank e do presente estudo (13 sequências obtidas através dos iniciadores COIa e COIf) (Tab. 4). O grupo externo utilizado em todas as análises foi a espécie *Exopalaemon orientis* (Palaemonidae) obtida da mesma plataforma.

Resultados

Foram realizados testes de amplificação do fragmento do gene COI de acordo com Bilgin *et al.*, (2014) com modificações, os que tiveram maior qualidade nos fragmentos amplificados foram descritos na Tab. 3.

Os iniciadores que tiveram melhores fragmentos amplificados foram os COIa e COIf, os outros iniciadores os fragmentos tiveram baixa qualidade. Fizemos o sequenciamento de amostras do conjunto CrustF2 e HCO2198 e a maioria das sequências teve abaixo de 250pb, somente uma sequência *reverse* (primer HCO2198) e uma sequência *forward* (primer Crust F2) teve entre 690 a 700pb. Para confirmar os fragmentos amplificados e para a identificação molecular das espécies das amostras, as sequências consensos foram submetidas e comparadas com sequências referências depositadas no banco de dados GenBank através da ferramenta

BLAST (*Basic Alignment Search Tool*) e a taxa de similaridade foi de 85% a 92,47% com as sequências da espécie *Macrobrachium jelskii* disponíveis no banco de dados, porém a similaridade foi baixa para concluir a identificação da espécie.

Realizamos o sequenciamento do conjunto de iniciadores COIa e COIf e a validação da qualidade das sequências obtidas, analisando 13 sequências do gene COI obtidas com estes iniciadores devido a melhor qualidade durante a amplificação por PCR e sequenciamento. As mesmas foram submetidas a ferramenta BLAST para identificação molecular da espécie. As sequências apresentaram maior taxa de similaridade de 95.60% a 98.60% para a espécie *Macrobrachium jelskii*, corroborando com a identificação morfológica. Portanto selecionamos as 13 sequências para as análises posteriores.

Apesar da eficiente identificação molecular da espécie *M. jelskii* através do gene COI, os cromatogramas das 13 sequências apresentaram em alguns pontos picos duplos (sobreposição dos sinais de fluorescência de dois nucleotídeos em um mesmo sítio) e ruídos (Fig. 1). Além da presença de códons de parada após a tradução e troca no quadro de leitura (inserções/deleções) baseadas no BLAST (GenBank) através da pesquisa de similaridade, com possibilidade de amplificação de pseudogenes mitocondriais.

O gráfico de transições e transversões versus a distância F84, não demonstrou substituição saturada dentro das 13 sequências do presente estudo (Fig. 2).

A rede de haplótipos das sequências revelou, para cada sequência, um haplótipo exclusivo, exceto as sequências MjIp149 e MjJe235 que compartilharam o mesmo haplótipo. Pudemos observar que para a maioria dos haplótipos variaram a quantidade de passos mutacionais, de 1 a 9 (Fig. 3).

Para fins comparativos fizemos uma análise de diversidade haplotípica, polimorfismos de DNA e variabilidade nucleotídica, analisamos separadamente as 13 sequências do presente estudo de *M. jelskii* pseudogene, e posteriormente as sequências de *M. jelskii* do BOLD (BINs - ADK1112; ADK1113) de Vera-Silva *et al.*, (2016) e as de *M. amazonicum* pseudogene de Iketani *et al.*, (2019) (Tab. 5).

As árvores de *Neighbor-joining* (NJ) com 1000 réplicas de *bootstrap* (Fig. 4 e 5) apresentaram topologias semelhantes as obtidas por Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI), diferindo ligeiramente em seus valores de suporte em ambas as análises.

No BD1 foi observado a formação de dois clados altamente suportados. Pode ser observado a divergência das sequências de *M. jelskii* do BOLD (BINs - ADK1112; ADK1113) das sequências do presente estudo (pseudogenes, destacadas com um *) com suporte de 100% e 100% de *bootstrap* e 1 de probabilidade posterior (Fig. 4).

A distância genética intraespecífica usando a distância K2P e com base nos agrupamentos mostrados na árvore (Fig. 4) variou de 0% (*M. jelskii* do BOLD - BIN ADK1113) a 2.6% (*M. jelskii* pseudogene) e a média foi 1.5%. A distância genética interespecífica variou de 9.5% *M. jelskii* do BOLD (BINs – ADK1112 x ADK1113) a 140.9% (*M. jelskii* pseudogene x BIN ADK1113) e a média 119% (Tab. 6), desconsiderando a distância com o grupo externo.

O BD2 as sequências de pseudogenes do presente estudo estão relacionadas as espécies do gênero *Macrobrachium*, mas ficaram em um clado independente (95% e 100% de *bootstrap*; 1 de probabilidade posterior) das demais sequências de *Macrobrachium* do GenBank, exceto a sequência do GenBank de *M. jelskii* (código GU929469) (Fig. 5).

A distância genética intraespecífica usando a distância K2P e com base nos agrupamentos mostrados na árvore (Fig. 5) variou de 0.2% (*M. striatum*) a 2.6% (*M. jelskii* pseudogene e *M. jelskii* GU929469) e a média 1.2%. A distância genética interespecífica variou de 2.6% (*M. amazonicum* (baixo suporte) x *M. amazonicum* 96% *bootstrap*; 0.87 de probabilidade posterior) a 135.1% (*M. rosenbergii* x *M. jelskii* pseudogene e *M. jelskii* GU929469) e a média 41.8% (Tab. 7), desconsiderando a distância do grupo externo.

Com base nesses resultados de alta divergência genética nas sequências da espécie *M. jelskii*, estas foram caracterizadas como pseudogenes mitocondriais originários do gene COI.

Discussão

Apesar do gene COI ser eficiente na identificação molecular de espécies, foi observado um alto índice de variabilidade entre as sequências do presente estudo, sendo que a maioria (84.6%) apresentou haplótipos exclusivos. As sequências da espécie *Macrobrachium jelskii* obtidas no presente estudo na maioria das análises foram alocadas em um clado distinto com alto suporte quando comparadas com sequências do banco de dados do gênero *Macrobrachium* (BD2) e da espécie *M. jelskii* do BOLD (BD1).

O gene COI vem sendo utilizado na técnica de DNA *barcoding* em muitos estudos com crustáceos, porém a utilização de iniciadores universais em inferências filogenéticas deve ser avaliada de forma criteriosa, devido a possível amplificação de pseudogenes.

A presença de pseudogenes em crustáceos são mais comuns que em outros invertebrados aquáticos (Venera-Pontón *et al.*, 2020), podendo interferir nos resultados e inferências decorrentes de suas análises.

Broussard & Neigel, (1997), relataram a presença de pseudogenes em crustáceos pela primeira vez em duas espécies de caranguejo *Menippe mercenaria* e *M. adina*.

Williams & Knowlton, (2001), verificaram a presença de pseudogenes em camarões do gênero *Alpheus* utilizando os iniciadores universais descritos por Knowlton *et al.* (1993) e Baldwin *et al.* (1998). Kim *et al.* (2013), em caranguejos do gênero *Austinograea*, utilizando os iniciadores universais descritos por Folmer *et al.* (1994).

A utilização dos iniciadores universais COIa e COIf resultou em sequenciamento com presença de picos duplos e ruídos em nossos eletroferogramas, além dos códons de parada na tradução, sugerindo a amplificação de diferentes sequências e por conseguinte pseudogene mitocondrial (Numts) na espécie *M. jelskii*.

Smith, Kelley & Patton, (1992) ao analisarem o gene mitocondrial Citocromo b observaram a presença de códons de parada em uma sequência, que impediriam a tradução e a produção de uma proteína funcional, deduzindo que a sequência não era de origem mitocondrial. Esses dados são importantes pois indicam que, em certas situações onde essas características citadas acima são encontradas nas sequências, recomenda-se o desenvolvimento de iniciadores táxons específicos, para evitar a amplificação de Numts, que pode levar a superestimação de unidades taxonômicas operacionais (OTUs).

Moraes, (2017), analisaram a espécie *M. jelskii* utilizando os iniciadores universais COIa e COIf, e também tiveram a presença de pseudogenes. Estes iniciadores amplificaram pseudogenes em *M. jelskii* podendo ser explicado pelo fato destes ter afinidade mais alta pela região do pseudogene do que o próprio gene COI (Kim *et al.*, 2013).

Foi possível a identificação da espécie utilizando estes iniciadores, visto que pseudogenes podem coamplificar com a sequência alvo mitocondrial (Gíslason *et al.*, 2013), mas estes iniciadores não são ideais para estudos filogenéticos da espécie *M. jelskii*. Entretanto, estes iniciadores foram eficientes para a amplificação da região COI com ausência de pseudogenes em outras espécies do gênero *Macrobrachium*, sendo utilizados em diversos estudos populacionais e filogenéticos (Vergamini *et al.*, 2011; Rossi & Mantelatto, 2013; Guerra *et al.*, 2014; Udayasuriyan *et al.*, 2015; Maidin *et al.*, 2017; Udayasuriyan *et al.*, 2017).

Segundo Schubart, (2009), em uma célula normal teremos muitas cópias do genoma mitocondrial em comparação ao nuclear. No entanto, se utilizarmos iniciadores universais que teriam maior afinidade ao pseudogene nuclear do que o mtDNA, estes iniciadores iriam preferencialmente se hibridizar ao DNA nuclear, apesar do grande número de cópias de mtDNA, podendo resultar em uma amplificação com a interferência dos produtos ou sequências de pseudogene. Ele afirma que a ocorrência de pseudogenes diminui fortemente ao usar iniciadores

específicos para táxons, e afirma que os iniciadores universais, como HCO2198 e LCO1490 de Folmer *et al.* (1994) apresentam baixa eficiência em obtenção do gene COI em crustáceos, porque estes resultaram frequentemente em sequências que possuem artefatos nas análises das sequências ou que não representam o produto mitocondrial.

Rossi & Mantelatto, (2013), analisaram 45 espécimes da espécie *Macrobrachium olfersii* de diferentes Estados brasileiros, além da Costa Rica e Panamá, utilizando o gene COI e os iniciadores COIa e COIf (os mesmos utilizados no presente estudo). Foi observado 28 haplótipos, sendo 3 polimórficos, tendo assim um polimorfismo menor do que o observado em nosso estudo com *M. jelskii*.

De acordo com os resultados da análise dos haplótipos e polimorfismos de DNA das sequências de *M. jelskii* pseudogene (presente estudo) e dos pseudogenes de *M. amazonicum* de Iketani *et al.*, (2019), podemos concluir que as mutações são devido principalmente o número de transições, como foi demonstrado no gráfico (Fig. 1) das sequências de *M. jelskii* pseudogene, que podem causar mutações de sentido trocando podendo alterar trinca de bases.

Nos dados do BD1 a distância intraespecífica foi maior nas sequências de *M. jelskii* pseudogene (2.6%) e a maior interespecífica foi entre sequências de *M. jelskii* do BOLD (BIN ADK1113) e *M. jelskii* pseudogene (140.9%). Quando analisamos BD2 também foi observado uma distância interespecífica elevada (135.1%) entre a espécie *M. rosenbergii* e o agrupamento de *M. jelskii* pseudogene com a *M. jelskii* do GenBank (código GU929469).

Dessa forma, sem as análises detalhadas das sequências, as distâncias seriam interpretadas erroneamente e poderiam ser classificadas como espécies distintas, visto que uma das premissas do DNA *barcoding* é baseada em um limiar de identificação, onde o valor de divergência genética superior a 2% é utilizado para identificação/separação de espécies (Hebert *et al.*, 2003).

Jose *et al.*, (2015), distinguiu duas espécies morfologicamente semelhantes do gênero *Macrobrachium* utilizando marcadores mitocondriais, considerando o valor de divergência genética interespecífica 13.8% a 21.0% alto para as espécies *M. striatum* e *M. equidens*. Portanto, o alto índice de divergência genética obtido nas comparações intraespecíficas e interespecíficas (maior que 100% entre espécies do gênero *Macrobrachium* e *M. jelskii* pseudogene) nos permitiu concluir que as sequências obtidas neste estudo seriam pseudogenes mitocondriais.

O pseudogene pode ter se originado de uma linhagem mitocondrial divergente daquela estabelecida para o gênero, devido a alta divergência encontrada em nossos dados (Gerstein & Zheng, 2006). Williams & Knowlton (2001) afirmam que em camarões há uma alta taxa de

transferência de genes mitocondriais para o genoma nuclear, sendo que geralmente acontecem duplicações de uma parte do mtDNA e subsequentes eventos de transferência horizontal para o genoma nuclear. As treze sequências do presente estudo foram alocadas em um clado separado (100% de *bootstrap* na NJ e ML; 1 de probabilidade posterior na BI) da sequência do mtDNA de *M. jelskii* do BOLD (Fig. 3), enfatizando que essas sequências seriam possivelmente pseudogenes mitocondriais da espécie *M. jelskii*. Esses resultados poderiam nos levar a assumir a existência de uma linhagem distinta dentro de *M. jelskii*.

O estudo taxonômico utilizando o DNA *barcoding* é baseado principalmente pelas similaridades entre as sequências e divergências genéticas, a alta variabilidade pode sugerir a presença de uma nova espécie ou complexo de espécies, e isso se torna um problema quando sequências de pseudogenes altamente divergentes são confundidas com sequências mitocondriais funcionais (Buhay, 2009).

Para evitar essas interferências na interpretação dos dados entre gene mitocondrial e pseudogenes mitocondriais, deve-se ter um controle na qualidade das sequências para submissão, usar iniciadores específicos em genes que apresentam essas características nas análises, e realizar a comparação das sequências obtidas com outras sequências de banco de dados, para reduzir o erro na construção de filogenias e delimitação de novas espécies (Leite, 2012).

Outro mecanismo que pode interferir na qualidade das sequências é a ocorrência de heteroplasma, levando a estimativas com alto nível de divergência haplotípica. A heteroplasma é caracterizada pela presença de mais de um haplótipo mitocondrial em um indivíduo/organismo (Magnacca *et al.*, 2010). Estudos em crustáceos verificaram a presença de heteroplasma (Williams *et al.*, 2017; Koolkarnkhaia *et al.*, 2019; Rodriguez *et al.*, 2020).

Os resultados do presente estudo demonstram que o gene COI foi eficiente na identificação molecular da espécie. Os pseudogenes certamente não afetam a eficácia de uma abordagem de DNA *barcoding* na identificação de amostras desconhecidas por meio de comparações com sequências de banco de dados de DNA (Venera-Pontón *et al.*, 2020). Porém a amplificação de pseudogenes pode ser um problema em estudo de filogenia e filogeografia usando esse gene de mtDNA.

Sendo assim, a utilização somente de um gene e as possíveis presenças de pseudogenes podem causar futuras confusões taxonômicas, resultando na superestimação da biodiversidade dos organismos do estudo. A utilização de genes nucleares e de outras ferramentas integrativas, como morfológicas e ecológicas, pode favorecer uma delimitação correta de espécies (Song *et*

al., 2008). As seqüências de possíveis pseudogenes não devem ser descartadas, mas devem ser incluídas em bancos de dados de DNA *barcoding*, como recurso potencialmente informativo.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por fornecer todas as instalações e equipamentos do laboratório; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fornecer uma bolsa de pesquisa a um de nós (Leticia O. Barbosa); a Adeilson Sampaio da Silva e Edval Araujo Sobrinho por suas ajudas nas coletas.

Referências

Buhay, JE. 2009. “COI-LIKE” Sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology*, 29(1): 96–110 [doi:10.1651/08-3020.1].

Costa, F. O.; Carvalho, G. R. 2007. The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of Fish. *Genomics, Society and Policy*, 3 (2): 29–40 [doi: 10.1186/1746-5354-3-2-29].

Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85:407–415 [doi: 10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x].

Folmer, O., Michael, BB. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5): 294-9.

Galtier, N., Nabholz. B., Glémin, S., Hurst, GDD. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, vol. 18, p. 4541-4550 [doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x].

Gerstein, M., Zheng, D. 2006. The Real Life of Pseudogenes. *Scientific American*, p. 49-55.

Gíslason, ÓS.; Svavarsson, J.; Halldórsson, HP.; Pálsson, S. 2013. Nuclear mitochondrial dna (Numt) in the atlantic rock crab *irroratus* say, 1817 (decapoda, Cancridae). *Crustaceana*, 86 (5) 537-55 [doi: 10.1163/15685403-00003191].

Guerra, AL.; Lima, AVB.; Júnior, RVL.; Chiachio, MC.; Taddei, FG.; Castiglioni, L. 2014. Genetic variability and phylogenetic aspects in species of the genus *Macrobrachium*. *Genetics and Molecular Research* p. 3646-3655 [doi: 10.4238/2014.May.9.7].

Hall, TA. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Hebert, PDN.; CYWINSKA, A.; BALL, SL.; DEWAARD, JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, vol. 270, n. September 2002, p. 313–321 [doi: 10.1098/rspb.2002.2218].

Jose, D., Nidhim, B., Kumar, KPA., Pradeep, PJ., Harikrishnan, M. 2015. A molecular approach towards the taxonomy of fresh water prawns *Macrobrachium striatum* and *M. equidens* (Decapoda, Palaemonidae), using mitochondrial markers. *Mitochondrial DNA*, 1-9 [doi: 10.3109/19401736.2015.1041].

Kim, SJ., Lee, KY., Ju, SJ. 2013. Nuclear mitochondrial pseudogenes in *Austinograea alayseae* hydrothermal vent crabs (Crustacea: Bythograeidae): effects on DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 13, 781–787 [doi: 10.1111/1755-0998.12119].

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, vol. 16, nº. 2, p.111–120 [doi: 10.1007/BF01731581].

Koolkarnkhai, P.; Intakhama, C.; Sangthong, P.; Surat, W.; Wonnapijit, P. 2019. *Portunus pelagicus* mtDNA heteroplasmy inheritance and its effect on the use of mtCR and mtCOI sequence data. *Mitochondrial DNA*, p. 848–860 [doi: 10.1080/24701394.2019.1693549].

Leite, LAR. 2012. Mitochondrial pseudogenes in insect DNA barcoding: differing points of view on the same issue. *Biota Neotropica*, (12), 3.

Lopes, AG. 2014. Análises isoenzimáticas, moleculares e ultraestruturais em camarões dulcícolas do gênero *Macrobrachium*. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética do Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, p. 127.

Lorenz, TC. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, p. 1-14 [doi:10.3791/3998].

Magalhães, PS.; Simões, NR.; Sonoda, SL. 2016. Limnologia de rios intermitentes: a bacia hidrográfica do rio Jequezinho como estudo de caso. In: MORAES, MEB., and LORANDI, R., orgs. *Métodos e técnicas de pesquisa em bacias hidrográficas* [online]. Ilhéus, BA: Editus, p. 163-181.

Magnacca, KN.; Brown, MJF. 2010. Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in *Hawaiian Hylaeus (Nesoprosopis)* bees (Hymenoptera: Colletidae). 10:74 [doi: 10.1186/1471-2148-10-174].

Melo, G.A.S. 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. 1 ed. Editora, Loyola. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, p. 429.

Moraes, SASN. 2017. Variabilidade fenotípica e genotípica do camarão *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) das bacias do nordeste brasileiro: uma abordagem de sistemática integrativa. Dissertação do Programa de Pós-graduação em Sistemática e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, p. 98.

Palumbi SR.; Benzie J. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1:27-34 [doi: 10.1016/j.ympev.2008.10.026].

Qing-yi, Z.; Qi-qun, C.; Wei-bing, G. 2009. Mitochondrial COI Gene Sequence Variation and Taxonomic Status of Three *Macrobrachium* Species. *Zoological Research*, 30(6):613-619 [doi: 10.3724/SP.J.1141.2009.06613].

Rodriguez, F., Albornoz, J., Dominguez, A. 2007. Cytochrome b Pseudogene Originated from a Highly Divergent Mitochondrial Lineage in Genus *Rupicapra*. *Journal of Heredity*, 98(3):243–249 [doi.org/10.1093/jhered/esm013].

Rodriguez-pena, E.; Verísimo, P.; Fernández, L.; González-Tizón, A.; Bárcena, C.; Martínez-Lage, A. 2020. High incidence of heteroplasmy in the mtDNA of a natural population of the spider crab *Maja brachydactyla*. *PLOS ONE*, p. 1-20 [doi.org/10.1371/journal.pone.0230243].

Rossi N, Mantelatto FL. 2013. Molecular analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) supports the existence of a single species throughout its distribution. *PLoS ONE*; 8(1):e54698 [doi.org/10.1371/journal.pone.0054698].

Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, vol.4, n°. 4, p. 406–425 [doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454].

Sampaio, S. R.; Nagata, J.K.; Lopes, L.O.; Masunari, S. et al. 2009. Camarões de águas continentais (Crustacea, Caridea) da Bacia do Atlântico oriental paranaense, com chave de identificação tabular. *Acta Biológica Paranaense*, 38 (1-2).

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R. 1997. DNA sequencing with chain -terminating inhibitors. *PNAS*, 74 (12) 5463-5467.

Schubart, CD. 2009. Mitochondrial DNA and decapod phylogenies; The importance of pseudogenes and primer optimization. *ResearchGate*, p.48-65.

Song,H., Buhay, JE., Whiting, MF., Crandall,KA. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *PNAS*, v. 105 [doi: 10.1073/pnas.0803076105].

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology Evolution*, Dec; 30(12): 2725–2729 [doi: 10.1093/molbev/mst197].

Thanh. HN.; Liu, Q.; Zhao, L.; Zhang, H.; Liu, J.; Hai, DN. 2015. Genetic diversity of cultured populations of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in China using mtDNA COI and 16S rDNA markers. *Biochemical Systematics and Ecology* p. 261-269 [doi: 10.1016/j.bse.2015.09.011].

Thompson, JD., Higgins, DG., Gibson, TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673–4680 [doi: 10.1093/nar/22.22.4673].

Udayasuriyan, R; Saravana, PB., Kalpana, R. 2017. DNA Barcoding of Freshwater Prawn Species of Two Genera *Macrobrachium* and *Caridina* Using mt-COI Gene. *Journal of Genes and Proteins*, 1:1-12.

Udayasuriyan, R; Saravana, PB; Vadivalagan, C; Rajkumar, G. 2015. Efficiency of different COI markers in DNA barcoding of freshwater prawn species. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. p. 98-110.

Valencia, D.M.; Campos, M.R.; 2007. Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of Colombi. *Zootaxa*, p. 1–4 [doi: 10.5281/zenodo.176325].

Venera-Pontón, DE.; Driskell, AC.; De Grave, S.; Felder, DL.; Scioli, JA.; Colli, R. 2020. Documenting decapod biodiversity in the Caribbean from DNA barcodes generated during field training in taxonomy. *Biodiversity Data Journal* 8: e47333 [doi: 10.3897/BDJ.8.e47333].

Vera-Silva, A.L.; Carvalho, F.L.; Mantelatto, F.L. 2016. Distribution and genetic differentiation of *Macrobrachium jelskii* (miers, 1877) (Natantia: Palaemonidae) in Brazil reveal evidence of non-natural introduction and cryptic allopatric speciation. *Journal of Crustacean Biology*, 36(3), 373-383 [doi: 10.1163/1937240X-00002425].

Vera-Silva, A.L.; Carvalho, F.L.; Mantelatto, F.L. 2017. Redescription of the freshwater shrimp *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Caridea, Palaemonidae). *Zootaxa*, (1): 044-060 [doi: 10.11646/zootaxa.4269.1.2].

Vergamini, F.G; Pileggi, L.G.; Mantelatto, F.L. 2011. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Produção Intelectual - BDPI, Universidade de São Paulo. Contributions to Zoology*, 80 (1): 67-83 [doi: 10.1163/18759866-08001003].

Williams, EP.; Feng, X.; Place, AR. 2017. Extensive Heteroplasmy and Evidence for Fragmentation in the *Callinectes sapidus* Mitochondrial Genome. *Journal of Shellfish Research*. 36(1): 263-272 [doi: 10.2983/035.036.0129].

Williams, ST., Knowlton, N. 2001. Mitochondrial Pseudogenes Are Pervasive and Often Insidious in the Snapping Shrimp Genus *Alpheus*. *Molecular Biology and Evolution*, p. 1484-1493 [doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003934].

Xia, X. 2013. DAMBE5: A Comprehensive Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Molecular Biology and Evolution*. p. 1720-1728 [doi: 10.1093/molbev/mst064].

Zimmermann, G.; Bosc, P.; Valade, P.; Cornette, R.; Améziane, N.; Debat, V. 2012. Geometric morphometrics of carapace of *Macrobrachium australe* (Crustacea: Palaemonidae) from Reunion Island. *Acta Zoologica (Stockholm)* 93: 492-500 [doi: 10.1111/j.1463-6395.2011.00524.x]

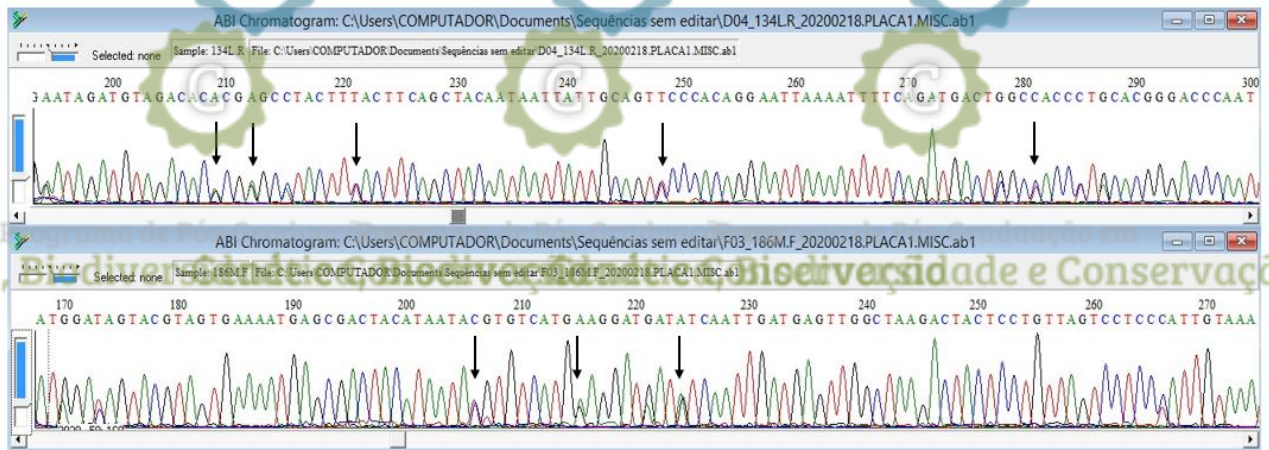


Figura 1. Cromatogramas das sequências MjIp134 e MjJi186 obtidas com os iniciadores COIa e COIf visualizados no programa BioEdit. As setas estão evidenciando a sobreposição de “picos”.

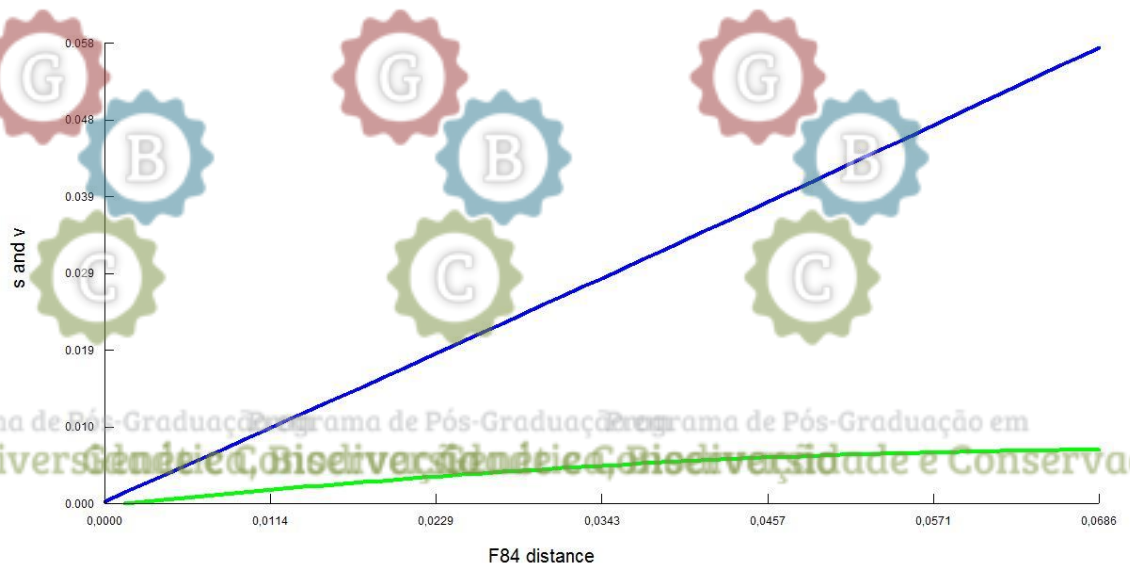


Figura 2. Gráfico indicando as taxas de transições (azul) e transversões (verde) versus distância F84 para as sequências de *Macrobrachium jelskii*.

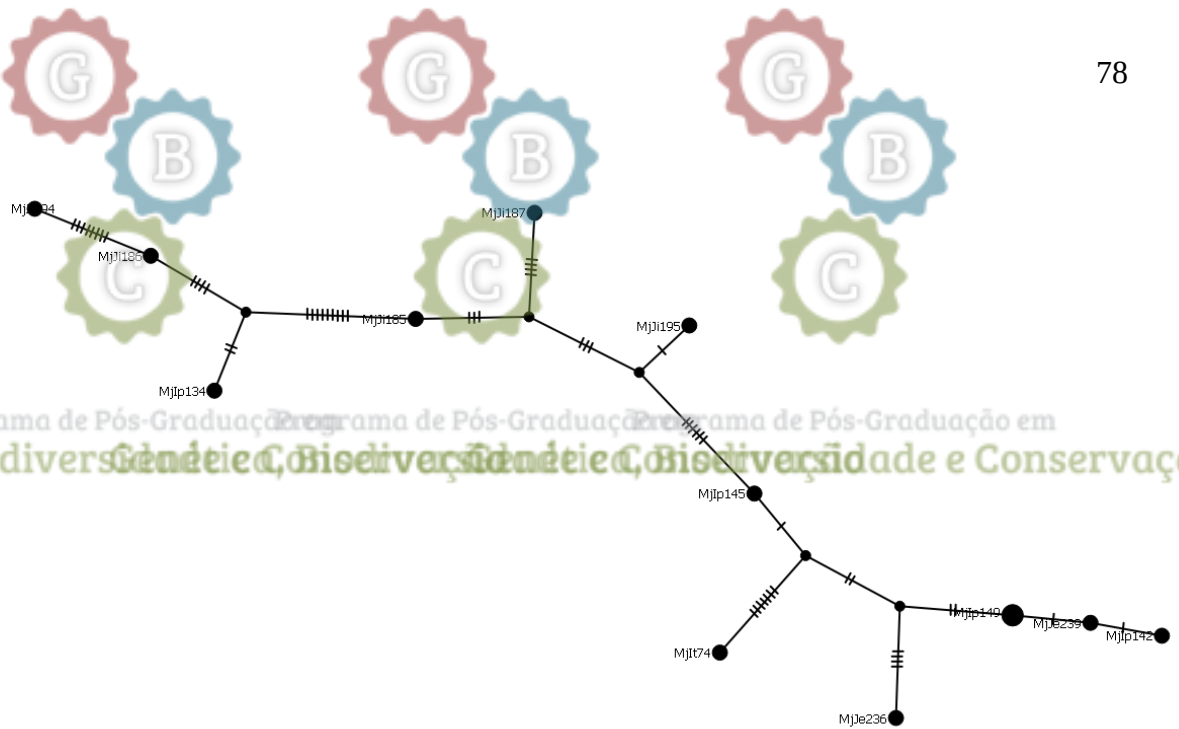


Figura 3. Rede haplotípica do gene mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade I de 13 sequências da espécie *Macrobrachium jelskii*. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de sequências que compartilham cada haplótipos (em frente de cada círculo possui o código da sequência). Os traços entre os ramos estão representando o número de eventos mutacionais entre os pseudogenes.



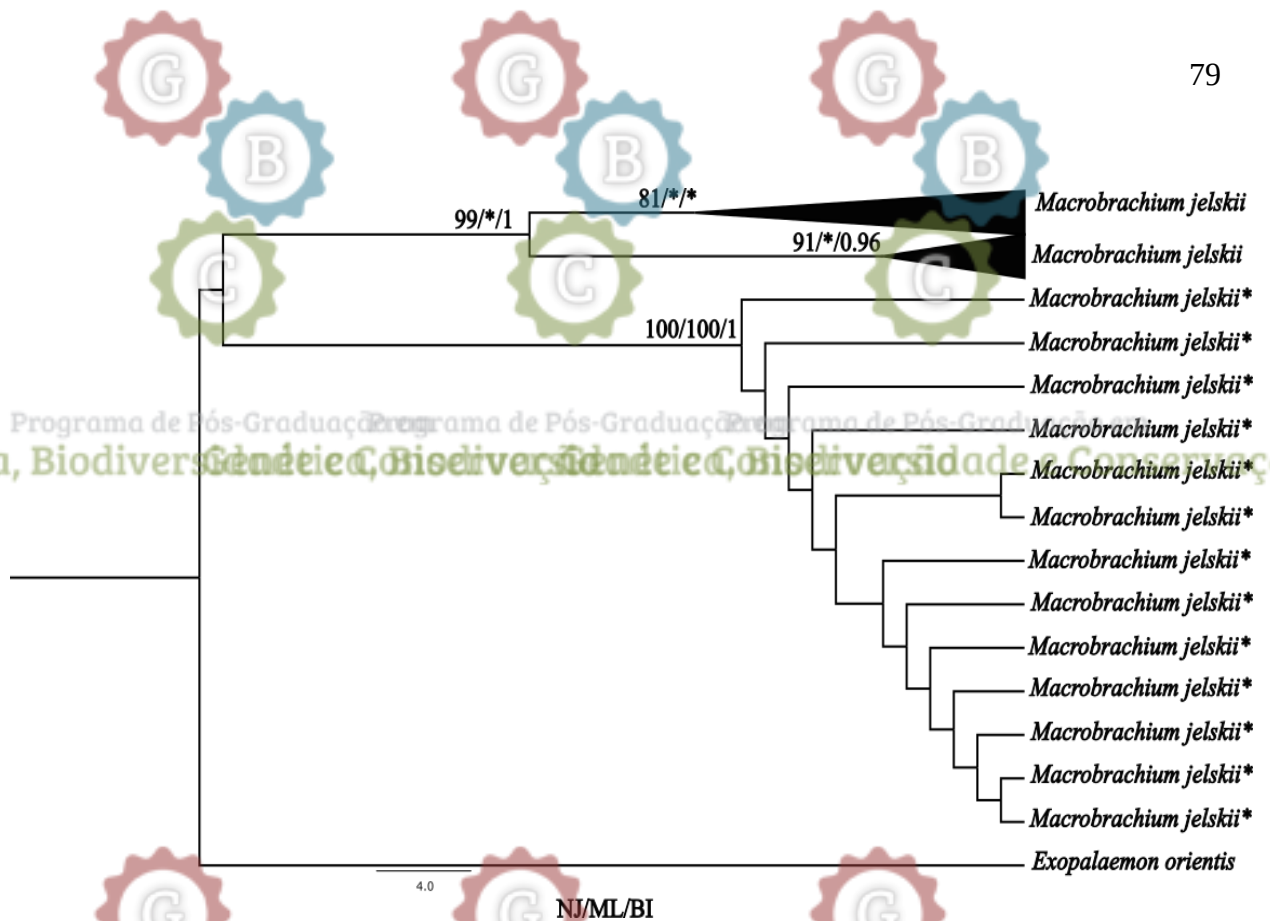


Figura 4. Árvore representativa baseada em NJ das sequências do COI de *Macrobrachium jelskii* BOLD e sequências de *M. jelskii* pseudogene marcadas com (*) do presente estudo. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade (>80%) e os valores de probabilidade a posteriori (BI) acima de 0,8 e valores abaixo foram representados pelo (*).

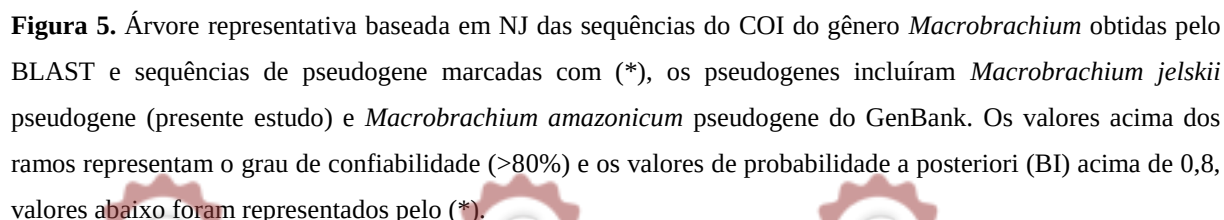


Figura 5. Árvore representativa baseada em NJ das seqüências do COI do gênero *Macrobrachium* obtidas pelo BLAST e seqüências de pseudogene marcadas com (*), os pseudogenes incluíram *Macrobrachium jelskii* pseudogene (presente estudo) e *Macrobrachium amazonicum* pseudogene do GenBank. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade (>80%) e os valores de probabilidade a posteriori (BI) acima de 0,8, valores abaixo foram representados pelo (*).

Tabela 1. Lista dos locais de amostragem e coordenadas geográficas dos municípios em que foram realizadas as coletas.

Bacias Hidrográficas	Coordenadas Geográficas	Localidade	Nº de espécimes
Rio Santo Antônio	14°8' 57"S ; 40°0' 45"W	Itagi/BA	16
Rio de Contas	14°7'40,04"S ; 39°45'28,64"W	Ipiaú/BA	49
Represa Boa Vista	13°56'56,69"S ; 39°51'44,98"W	Jitaúna/BA	40
Rio de Contas	13°51'56,07"S ; 40°14'10,19"W	Jequié/BA	60

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação do gene mitocondrial COI na espécie *Macrobrachium jelskii* e suas respectivas sequências.

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Autores
COIa	F: 5' AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC-3'	Palumbi & Benzie, (1991)
COIf	R: 5' CCTGCAGGAGGAGGAGACCC 3'	
LCO1490	F: 5' GGTCACAAATCATAAAGATATTGG 3'	Folmer <i>et al.</i> , (1994)
HCO2198	R: 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	
Crust F1	F: 5' TTTTCTACAAATCATAAAGACATTGG 3'	Costa <i>et al.</i> , (2007)
Crust F2	F: 5' GGTTCT TCTCCACCAACCACAARGAYATHGG 3'	

Tabela 3. Descrição dos protocolos testados para amplificação do gene COI na espécie de camarão de água doce *Macrobrachium jelskii*.

Iniciadores	Descrição do Protocolo de Amplificação	Nº de amostras amplificadas/Nº de amostras testadas
LCO1490 e HCO2198	1 µL de DNA molde em 14µL contendo 0.05 mM de dNTP, tampão 1x (Invitrogen 10x PCR/200mM Tris-HCl (pH 8.4), 2.2 mM de MgCl ₂ , 0.10µM de <i>primer</i> , 1.5 U de <i>Taq polymerase</i> e H ₂ O ultrapura.	1/1
CrustF1, CrustF2, LCO1490 e HCO2198	1 µL de DNA molde em 14µL contendo 0.05 mM de dNTP, tampão 1x (Invitrogen 10x PCR/200mM Tris-HCl (pH 8.4), 2.2 mM de MgCl ₂ , 0.10µM de <i>primer</i> , 1.5 U de <i>Taq polymerase</i> e H ₂ O ultrapura.	1/2
CrustF2 e HCO2198	1 µL de DNA molde em 14µL contendo 0.25 mM de dNTP, tampão 1x (Invitrogen 10x PCR/200mM Tris-HCl (pH 8.4), 3.5 mM de MgCl ₂ , 0.20µM de <i>primer</i> , 1.5 U de <i>Taq polymerase</i> e H ₂ O ultrapura.	3/3
COIa e COIf	2 µL de DNA molde em 12.5µL contendo 0.25 mM de dNTP, tampão 1x (Invitrogen 10x PCR/200mM Tris-HCl (pH 8.4), 3.0 mM de MgCl ₂ , 0.20µM de <i>primer</i> , 1.5 U de <i>Taq polymerase</i> e H ₂ O ultrapura.	21/21

Tabela 4. Sequências obtidas do presente estudo e dos bancos de dados BOLD e GenBank usadas nas análises moleculares.

Espécies	GenBank	Autores	BOLD	Autores	Presente estudo
	GU929532 GU929524 GU929515 GU929499	Vergamini	-	-	-
<i>M. amazonicum</i>	GU929481 GU929474 GU929480 GU929471	<i>et al.</i> , 2011			
	MK936500 MK936502 MK936503 MK936504	Iketani <i>et</i>	-	-	-
<i>M. amazonicum</i>	MK936505 MK936507 MK936508 MK936509	<i>al.</i> , 2019			
	MK936510 MK936513 MK936512 MK936514				
	MK936518 MK936517 MK936516 MK936519				
	MK936520 MK936521 MK936522 MK936523				
	MK936524 MK936526 MK936527 MK936530				
	MK936531 MK936532 MK936533 MK936534				
	MK936487 MK936499 MK936491				
	MK936535 MK936536	Iketani <i>et</i>			
<i>M. amazonicum</i> pseudogene	MK936537 MK936538	<i>al.</i> , 2019			
<i>M. amazonicum</i>	HM352486 HM352487	Pileggi <i>et</i> <i>al.</i> , 2010	-	-	-
<i>M. amazonicum</i>	KM101542	Pileggi <i>et</i> <i>al.</i> , 2014	-	-	-
<i>M. edentatum</i>	AB235247	Liu <i>et al.</i> , 2006	-	-	-

M. jelskii

GU929469

Vergamini
et al.,

2011

KP054316 KP054317 KP054318 KP054319
 KP054320 KP054321 KP054322 KP054323
 KP054324 KP054325 KP054326 KP054328
 KP054329 KP054330 KP054331 KP054332
 KP054335 KP054336 KP054334 KP054337
 KP054333

Vera-
Silva et
al. 2016

MjIt74 MjIp134
 MjIp142 MjIp145
 MjIp149
 MjJi185
 MjJi186
 MjJi187
 MjJi194
 MjJi195
 MjJe235
 MjJe236
 MjJe239

M. jelskii

HM352484

Pileggi *et al.*, 2010

-

-

-

M.

MK792413 MK792414 MK792415 MK792416

Saravana

-

-

-

malcolmsonii

MK792417

et al.,

2019

MK782960 MK782961 MK782962 MK782963

-

-

-

M.

MK782964 MK782965 MK782966 MK782967

Jose *et al.*,

2019

malcolmsonii

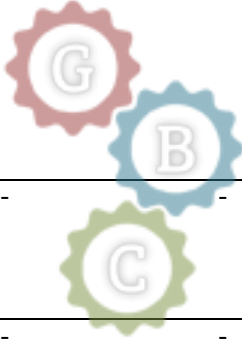
MK782968 MK782969

KR703252 KR703253 KR703254 KR703255

KR703256 KR703257 KR703259 KR703260

KR703261





<i>M. malcolmsonii</i>	MF838938	Udayasuriyan <i>et al.</i> , 2017	-	-	-
<i>M. naso</i>	AB235285	Liu <i>et al.</i> , 2006	-	-	-
<i>M. neglectum</i>	AB235286	Liu <i>et al.</i> , 2006	-	-	-
<i>M. rosenbergii</i>	KX151823 KX151824 KX151827 KX151829 KX151831 KX151834 KX151835 KX151836 KX151837	Maidin <i>et al.</i> , 2017	-	-	-
<i>M. striatum</i>	KM236789 KM236790 KM236792 KM236794 KM236795 KM236797 KM236799 KM236800	Jose <i>et al.</i> , 2015	-	-	-
<i>M.sp.</i>	AB235299	Liu <i>et al.</i> , 2006	-	-	-

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Tabela 5. Dados de polimorfismos de DNA de *M. jelskii* pseudogene (presente estudo), *M. amazonicum* pseudogene e *M. jelskii* do BOLD para fins comparativos.

Sequências	<i>M. jelskii</i> pseudogene	<i>M. amazonicum</i> pseudogene	<i>M. jelskii</i> (BOLD) BINs - ADK1112; ADK1113
Análises			
Composição nucleotídica	(A) 32.3%	(A) 27.8%	(A) 28.5%
Adenina (A)	(C) 16.2%	(C) 21.4%	(C) 26.4%
Citosina (C)	(G) 22.6%	(G) 18.4%	(G) 17.1%
Guanina (G)	(T) 28.9%	(T) 32.4%	(T) 28.0%
Timina (T)			
Nº de sequências	13	4	21
Sítios polimórficos	42	72	39
Sítios monomórficos	593	470	385
Mutações	43	72	39
Sítios variáveis <i>singletons</i>	9	70	1
Nº de haplótipos	12	4	12
Diversidade haplotípica (Hd)	0.9872	1.000	0.881
Diversidade nucleotídica (π)	0.02518	0.06704	0.04313

Tabela 6. Matriz de distância genética da espécie *M. jelskii* do BOLD (BINs) e *M. jelskii* pseudogene (presente estudo), com base no modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros (K2P).

Espécies	Distância intraespecífica	Distância interespecífica		
		1	2	3
<i>M. jelskii</i> pseudogene	0.026			
<i>Exopalaemon orientis</i>	-	1.907		
BIN ADK1112	0.019	1.359	1.248	
BIN ADK1113	0	1.409	1.178	0.095

Tabela 7. Matriz de distância genética de *M. jelskii* pseudogene do presente estudo e sequências de *Macrobrachium* obtidas pelo BLAST no GenBank, com base no modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros (K2P).

Espécies	Distância intraespecífica	Distância interespecífica														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>M. jelskii</i> GenBank e pseudogene	0.026															
<i>M. amazonicum</i>	0.019	0.155														
<i>M. jelskii</i>	-	1.208	1.192													
<i>M. amazonicum</i>	0.019	1.116	1.101	0.152												
<i>M. edentatum</i>	-	1.211	1.227	0.169	0.194											
<i>M. rosenbergii</i>	0.016	1.351	1.336	0.201	0.177	0.188										
<i>M. amazonicum</i>	0.012	1.155	1.136	0.162	0.027	0.203	0.179									
<i>M. neglectum</i>	-	1.231	1.215	0.158	0.149	0.185	0.183	0.151								
<i>M. amazonicum</i>	-	1.124	1.108	0.162	0.028	0.207	0.174	0.037	0.153							
<i>M.sp.</i>	-	1.145	1.168	0.174	0.197	0.140	0.190	0.196	0.154	0.198						
<i>M. amazonicum</i>	0.005	1.180	1.165	0.157	0.026	0.209	0.184	0.034	0.149	0.033	0.212					
<i>M. naso</i>	-	1.229	1.236	0.194	0.184	0.198	0.184	0.191	0.205	0.187	0.195	0.184				
<i>E. orientis</i>	-	1.374	1.383	0.221	0.215	0.208	0.230	0.208	0.215	0.220	0.197	0.208	0.227			
<i>M. striatum</i>	0.002	1.273	1.253	0.166	0.143	0.165	0.201	0.149	0.141	0.149	0.164	0.144	0.177	0.217		
<i>M. malcolmsonii</i>	0.004	1.226	1.199	0.194	0.191	0.182	0.137	0.199	0.208	0.185	0.182	0.198	0.241	0.209	0.198	
<i>M. amazonicum</i> pseudogene	0.004	1.218	1.249	0.215	0.143	0.223	0.193	0.143	0.188	0.149	0.227	0.153	0.217	0.249	0.203	0.226

8. CONCLUSÕES GERAIS

- Os camarões de água doce da espécie *Macrobrachium jelskii* do Sul e Sudoeste da Bahia apresentaram variações morfológicas com o ambiente influenciado na forma do cefalotórax e tamanho dos mesmos.
- As variações morfológicas foram relacionadas a maturação gonadal e adaptações ambientais, demonstrando a variabilidade morfológica interpopulacional dessa espécie, mesmo em ambientes próximos ou isolados, com diferentes estados de preservação.
- Essas variações morfológicas demonstram como o ambiente aquático reflete na adaptação e desenvolvimento dos camarões de água doce.
- A técnica de DNA *barcoding* foi eficiente na identificação molecular da espécie de *M. jelskii*.
- A amplificação do gene mitocondrial COI utilizando iniciadores universais resultou na amplificação de possíveis pseudogenes mitocondriais na espécie *M. jelskii*.
- As informações morfológicas e genéticas obtidas são importantes para a conservação e delimitação adequada da espécie. Agregando conhecimento biológico e enfatizando as implicações dos pseudogenes na superestimação de espécies na taxonomia molecular. Estes dados favorecerão em futuras medidas de manejo e conservação desta espécie de interesse ecológico e econômico.