



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

**IDENTIFICAÇÃO DE CAMARÕES DE ÁGUA DOCE
COLETADOS NA REGIÃO DO BAIXO AMAZONAS POR
MEIO DE MARCADORES MOLECULARES**

FELIPE FERNANDES DE ÁVILA

Santarém, Pará
Junho, 2017

FELIPE FERNANDES DE ÁVILA

**IDENTIFICAÇÃO DE CAMARÕES DE ÁGUA DOCE
COLETADOS NA REGIÃO DO BAIXO AMAZONAS POR
MEIO DE MARCADORES MOLECULARES**

GABRIEL IKETANI COELHO

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Estudos e Manejos de Ecossistemas Amazônicos.

**Santarém, Pará
Junho, 2017**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Dilson e Fátima.

À minha irmã Dilciane.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof^o Gabriel Iketani, pela ótima orientação e confiança na minha capacidade de executar este trabalho, mesmo ciente das eventuais dificuldades dada minha pouca experiência na área de biologia molecular.

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

A minha Mãe Maria de Fátima Fernandes, por sempre estar ao meu lado me apoiando em todas as decisões e momentos de minha vida sem nunca medir esforços.

Ao meu Pai Dilson Ávila, por todo o esforço empregado para que eu pudesse realizar todos os meus objetivos até aqui.

As minhas filhas Maria Clara e Isabella pela alegria que me proporcionam em todos os dias da minha vida.

A minha amiga e esposa Bruna Leão pelo carinho e dedicação com que se dedica a nossa família e a mim. Por compartilhar comigo as angústias e o entusiasmo que envolveram a execução desta pesquisa.

A minha irmã Dilciane Ávila pelo incentivo, carinho e presença sempre marcante em minha vida. Melhor tia do mundo!

A minha tia e primos/irmãos Nely Ávila, Ana Puala, Luiz Wagner (Billy) e Orlando Rocha.

Ao meu tio Olinto Rocha pelo exemplo de vida e de compromisso com a produção de conhecimento enquanto pesquisador. (*In memoriam*).

Ao meu grande amigo Nery Araújo pelas conversas, conselhos apoio e sobretudo pela amizade desses muitos anos em que nos conhecemos. O Grêmio é copeiro!

Aos amigos Gilberto Alves, Tharlis Alves pela amizade e exemplo de cordialidade aprendidos nestes últimos quase dois anos em que convivemos.

Ao amigo Lucas Haddad pelas muitas conversas entusiasmantes sobre ciência e outros aspectos da vida.

Ao amigo Walter Vidal que mesma forma sempre proporciona reflexões importantes sobre aquilo que escolhi conhecer um pouco. A vida.

Aos colegas e amigos do LGBio Ariane Nicaretta, Ezequias Torres e Layla Sousa pelos auxílio de bancada e pelos momentos alegres compartilhados nestes dois anos em que passamos trabalhando juntos.

A meu grande amigo Alcindo Moisés pelo constante incentivo ao longo de muitos anos de amizade.

A todos meu muito OBRIGADO!

EPÍGRAFE

Eu sei que a gente se acostuma. Mas não devia.

A gente se acostuma a morar em apartamentos de fundos e não ter outra vista que não as janelas ao redor. E porque não tem vista, logo se acostuma a não olhar para fora. E porque não olha para fora, logo se acostuma a não abrir de todo as cortinas. E porque não abre as cortinas, logo se acostuma a acender mais cedo a luz. E porque à medida se acostuma esquece o sol, esquece o ar, esquece a amplitude. [...]

Marina Colasanti

ÁVILA, F. F. **Identificação de camarões de água doce coletados na região do Baixo Amazonas por meio de marcadores moleculares**. 2017. N° de páginas 57. Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Estudos e Manejos de Ecossistemas Amazônicos. Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia: Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA, Santarém, 2017.

RESUMO

Os camarões são artrópodes pertencentes ao subfilo Crustacea, ordem Decapoda, que na Amazônia está representada por 18 espécies distribuídas em 3 famílias (Euryrhynchidae, Palaemonidae e Sergestidae). Mas a diversidade de camarões na região do Baixo Amazonas ainda precisa ser melhor conhecida. Porém, a identificação por uso de chaves taxonômicas é especialmente difícil devido ao alto grau de conservadorismo interespecífico e variação intraespecífica dos principais caracteres analisados. Nos últimos 20 anos o avanço das técnicas de biologia molecular tem contribuído muito para resolução de dúvidas a respeito das variações morfológicas que seriam geradas pela plasticidade fenotípica, daquelas que provavelmente estariam relacionadas a linhagens distintas. O presente estudo teve como objetivo identificar camarões coletados na região do Baixo Amazonas por meio de dois marcadores moleculares mitocondriais e um nuclear. A obtenção do material genético (DNA genômico total) deu-se pelo uso do Kit Wizard Genomic-Promega. Foram obtidas sequências parciais dos genes mitocondriais COI e 16S em ambos os sentidos da fita de DNA, bem como sequências parciais do gene nuclear 28S. As sequências foram alinhadas no programa CodonCode Aligner v7.0.1 (CodonCode Corporatio). A análise da variabilidade genética interespecífica e intraespecífica foi feita por meio do cálculo da distância p com modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros (K2P), para as sequências de COI. Para os marcadores 16S e 28S foi calculada a distância p não corrigida. Em todos os casos foi utilizado o programa MEGA v7.0). Além disso, foram construídas árvores de Agrupamentos de Vizinhos (NJ) também com uso do programa MEGA v7.0. Das 85 sequências obtidas para COI, 39 apresentaram indícios de picos duplos distribuídos entre as espécies *M. amazonicum* e *M. brasiliense*, sendo excluídas da maioria das análises. A análise das distâncias genéticas associadas as análises das árvores filogenéticas obtidas com as sequências sem picos duplos para os três marcadores, revelou novos registros para a região do Baixo Amazonas (PA) e estado do Amazonas, município Nhamundá. Estas análises também sugeriram uma nova espécie em *Macrobrachium* Bate, 1868 e outra em *Palaemon* Weber 1795.

Palavras-chave: Camarões, Genética, Baixo Amazonas.

ÁVILA, F. F. **Identificação de camarões de água doce coletados na região do Baixo Amazonas por meio de marcadores moleculares**. 2017. N° de páginas 57. Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Estudos e Manejos de Ecossistemas Amazônicos. Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia: Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA, Santarém, 2017.

ABSTRACT

The shrimps are arthropods belonging to the subfamily Crustacea, order Decapoda, which in the Amazon are represented by 18 species distributed in 3 families (Euryrhynchidae, Palaemonidae and Sergestidae). But a diversity of prawns in the Lower Amazon region still needs to be better known. However, an identification by use of taxonomic keys is especially difficult due to the high degree of conservatism and intraspecific variation of the main characters analyzed. In the last 20 years, molecular biology techniques have contributed greatly to the resolution of doubts regarding the morphological variations that are generated by phenotypic plasticity, which would be related to distinct lineages. The present study aimed to identify, using mitochondrial and nuclear molecular markers, prawns collected in the Lower Amazon region. Obtaining the genetic material (total genomic DNA) was done by using the Wizard Genomic - Promega Kit. Partial sequences of the mitochondrial COI and 16S genes were obtained in both directions of the DNA strand, as well as partial sequences of the 28S nuclear gene. The sequences were aligned in the program CodonCode Aligner v7.0.1 (CodonCode Corporation). The analysis of inter and intraspecific genetic variability was made by calculating the p distance with evolutionary model Kimura 2 parameters (K2P) for the COI sequences. For the 16S and 28S markers the uncorrected p-distance was calculated. In all cases the MEGA v7.0 program was used. In addition, Neighbor Cluster trees (NJ) were also constructed using the MEGA v7.0 program. Of the 85 sequences obtained for COI, 39 showed signs of double peaks distributed among *M. amazonicum* and *M. brasiliense* species and were excluded from most analyzes. The analysis of the genetic distances associated to the analyzes of the phylogenetic trees obtained with the sequences without double peaks for the three markers, revealed new records for the region of Lower Amazon (PA) and state of Amazonas, Nhamundá municipality. These analyzes also suggested a new species in *Macrobrachium* Bate, 1868 and another one in *Palaemon* Weber 1795.

Key words: Prawns, Genetic, Lower Amazon.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Diversidade dos camarões de água doce no Mundo.....	1
1.1.1 Origem evolutiva dos camarões amazônicos	2
1.1.2 Diversidade dos camarões de água doce na Amazônia	2
1.1.3 Importância econômica dos camarões de água doce na Amazônia	6
1.1.4 Morfologia de camarões de água doce	7
1.1.5 Identificação Molecular	9
2. OBJETIVOS:.....	12
2.1 Objetivo geral:	12
2.2 Objetivos específicos:	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.2. Análises Morfológicas	14
3.2.1.Extração de DNA e Reação em cadeia da polimerase (PCR)	14
3.2.2. Reação de PCR para o sequenciamento.....	15
3.3.Análise dos dados.....	15
4. RESULTADOS	18
4.1 Caracterização dos bancos de dados.....	18
4.1.1 Pesquisa BLAST.....	18
4.1.2 Árvores filogenéticas.....	24
4.1.3 Distâncias genéticas	27
5. DISCUSSÃO	30
5.1 Pesquisa <i>BLAST</i> - Limites da análise	30
5.1.1 Árvores filogenéticas e Distâncias genéticas.....	31
6. CONCLUSÃO	35
7. BIBLIOGRAFIA	36
8. APÊNDICES	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> de COI, 16S e 28S, suas respectivas sequências e autores.....	15
Tabela 2: Sequências de espécies amazônicas obtidas no Genbank usadas na construção da árvore NJ de COI.....	16
Tabela 3: Sequências de espécies amazônicas obtidas no Genbank usadas na construção da árvore NJ de 16S.....	17
Tabela 4: Espécimes de museu para obtenção de sequências e construção da árvore NJ de 28S.....	17
Tabela 5: Resultados da pesquisa <i>BLAST</i> para as sequências de COI no NCBI.....	19
Tabela 6: Resultados da pesquisa <i>BLAST</i> para o 16S no banco de dados do NCBI.....	21
Tabela 7: Resultados da pesquisa <i>BLAST</i> para sequências de 28S.....	22
Tabela 8: Distância média dentro dos grupos e entre os grupos para COI. Parênteses indicam as distância médias dentro dos grupos.....	28
Tabela 9: Distância média dentro dos grupos e entre os grupos para 28S. Parênteses indicam as distância médias dentro dos grupos.....	29

1. INTRODUÇÃO

O subfilo Crustacea forma um dos maiores grupos dentro do filo Arthropoda com mais de 67.000 espécies já descritas. A ordem Decapoda é a que possui maior diversidade, com mais de 14.000 espécies descritas, algumas de grande interesse econômico como caranguejos, siris, lagostas e camarões. Quanto aos camarões, a ordem se divide em duas subordens: Dendrobranchiata, que inclui a infraordem Peneidea (camarões marinhos) e Pleocyemata que engloba outras sete infraordens, entre elas Caridea. A principal família de carídeos, Palaemonidae Rafinesque, 1815, está mundialmente representada por 980 espécies distribuídas em 130 gêneros aproximadamente (DE GRAVE e FRANSEN, 2011). A diferença entre as duas subordens se dá principalmente em razão do cuidado com os ovos. A primeira libera os ovos na água, enquanto a segunda os incuba no abdômen (DE GRAVE *et al.*, 2008).

1.1 Diversidade dos camarões de água doce no Mundo

Os camarões habitam uma diversidade de ambientes no mundo. De regiões tropicais e subtropicais a regiões polares, colonizando desde ambientes salinos a estritamente dulcícolas, como cavernas subterrâneas. Possuem, portanto, representantes marinhos e de água doce, com algumas espécies assumindo comportamento anfídromo, em que as fêmeas migram a jusante para depositar os ovos em estuários em razão do desenvolvimento larval depender de água salobra. Tal comportamento é tido como um traço plesiomórfico de clados costeiros e estuarinos invasores de água doce (HOLTHUIS, 1952; BAUER, 2004; ANGER, 2013).

No Brasil, as duas principais famílias de carídeos continentais são Atyidae: gêneros *Atya* Leach, 1816 e *Potimirim* Holthuis, 1954, e Palaemonidae Rafinesque, 1815. Duas subfamílias destacam-se dentro de Palaemonidae: Pontoniinae Kingsley, 1878, cujos membros são predominantemente marinhos e ocasionalmente encontrados em estuários de alta salinidade, e Palaemoninae Rafinesque, 1815, que inclui espécies marinhas a exclusivamente dulcícolas.

1.1.1 Origem evolutiva dos camarões amazônicos

O continente Sul Americano passou por profundas alterações na sua configuração ao longo de sua história: longos períodos de elevações e sucessivas quedas nas temperaturas, orogenia dos andes, alterações do fluxo de correntes dos rios, etc (HOORN, 1993). Mas nenhuma destas, talvez, foi tão significativa para determinação da atual composição e diversidade da fauna aquática amazônica quanto as incursões marinhas do Mioceno (LOVEJOY et al., 2006). Na Amazônia, o alto grau de endemismo de algumas espécies de peixes da família Potamotrygonidae, as quais possuem um único ancestral marinho comum, indicam que o evento mais provável para transição evolutiva de linhagens marinhas para habitats de água doce tenha sido mesmo as incursões do mar durante o Mioceno (LOVEJOY, 1998). O ingresso do mar ao continente ocasionou o surgimento de diversos ambientes aquáticos costeiros e continentais que conectavam-se de maneira intermitente. Essas conexões permitiram gradualmente a transição evolutiva de diversas linhagens marinhas para habitats de água doce (LOVEJOY et al., 2006).

Da mesma forma Anger (2013) sugere que as flutuações no nível do mar foram responsáveis pela “injeção” de linhagens ancestrais de *Macrobrachium* em ambientes interiores, uma vez que tais flutuações causaram inundações continentais, e que eventos tectônicos relacionados a orogenia andina auxiliaram na formação de vastas áreas cobertas por um mar raso onde as linhagens dispersaram e irradiaram. Sucessivamente, estas linhagens invasoras foram aprisionadas em “armadilhas” criadas pela regressão do mar, as quais acabaram por ser extintas ou adaptaram-se a água doce. Nos períodos seguintes, plioceno e pleistoceno, houve a fragmentação das águas interiores, promovendo a diversificação vicariante em diferentes áreas de captação.

1.1.2 Diversidade dos camarões de água doce na Amazônia

Em território brasileiro, há 35 espécies de camarões de água doce pertencentes a 4 famílias (Atyidae, Euryrhynchidae, Palaemonidae e Sergestidae), distribuídas ao longo das bacias hidrográficas continentais, regiões estuarinas e riachos (MELO, 2003; PILEGGI e MANTELLATO, 2012). Na bacia amazônica estes organismos estão distribuídos ao longo de todas as sub-bacias

hidrográficas. Sua diversidade nesta região é bem conhecida graças as revisões taxonômicas feitas por Holthuis (1951, 1952), Omori (1975), Tiefenbacher (1978), Kensley e Walker (1982), Pileggi et al (2013), Pimentel (2003) e Pimentel e Magalhães (2014). O estado do Pará, devido ao seu vasto território, diversidade de habitats e o esforço de coleta incipiente desenvolvido na região, além da falta de especialistas do grupo permanecia com sua fauna de Palaemonídeos insuficientemente estudada até o início dos anos 2000, principalmente porque os estudos se concentravam na região costeira do estado. 18 espécies de camarões de água doce distribuídas nas famílias Euryrhynchidae, Palaemonidae e Sergestidae, foram listadas na Amazônia Oriental, estados do Amapá e Pará, das quais 16 foram reportadas ao Pará (PIMENTEL e MAGALHÃES, 2014), além de *Palaemon yuna*, descrita por Carvalho et al. (2014), conforme destaca em **negrito** o quadro 1.

Quadro 1: Espécies de Carídeos com ocorrência natural no Brasil agrupadas nas suas respectivas Famílias. Em negrito as espécies encontradas no estado do Pará. Segundo Melo (2003); Pillegi et al (2013); Pimentel e Magalhães (2014) e Carvalho (2014).

Família Atyidae De Haan, 1859	
1	<i>Atya gabonensis</i> Giebel, 1875
2	<i>Atya scabra</i> (Leach, 1816)
3	<i>Potimirim glabra</i> (Kinsley, 1878)
4	<i>Potimirim potimirim</i> (Müller, 1881)
Família Euryrhynchidae Holthuis, 1950	
5	<i>Euryrhynchus amazoniensis</i> Tiefenbacher, 1978
6	<i>Euryrhynchus burchelli</i> Calman, 1907
7	<i>Euryrhynchus wrzesniowskii</i> Miers, 1877
Família Palaemonidae Rafinesque, 1815	
8	<i>Cryphiops brasiliensis</i> Corrêa, 1973
9	<i>Macrobrachium acanthurus</i> (Wiegmann, 1836)
10	<i>Macrobrachium amazonicum</i> (Heller, 1862)
11	<i>Macrobrachium aracamuni</i> Rodríguez, 1982
12	<i>Macrobrachium borelli</i> (Nobili, 1896)
13	<i>Macrobrachium brasiliense</i> (Heller, 1862)
14	<i>Macrobrachium carcinus</i> (Linnaeus, 1758)
15	<i>Macrobrachium denticulatum</i> Ostrowski, Fonseca e Ferreira, 1996
16	<i>Macrobrachium depressimanum</i> Pereira, 1993
17	<i>Macrobrachium ferreirai</i> Kensley e Walker, 1982
18	<i>Macrobrachium heterochirus</i> (Wiegmann, 1836)
19	<i>Macrobrachium iheringi</i> (Ortamann, 1897)
20	<i>Macrobrachium inpa</i> Kensley e Walker, 1982
21	<i>Macrobrachium jelskii</i> (Miers, 1877)
22	<i>Macrobrachium nattereri</i> (Heller, 1862)
23	<i>Macrobrachium olfersi</i> (Wiegmann, 1836)
24	<i>Macrobrachium pontiuna</i> (Muller, 1880)
25	<i>Macrobrachium surinamicum</i> Holthuis, 1948
26	<i>Palaemon argentinus</i> Nobili, 1901
27	<i>Palaemon pandaliformis</i> (Stimpson, 1871)
28	<i>Palaemon mercedae</i> (Pereira, 1986)
29	<i>Palaemon carteri</i> (Gordon, 1935)
30	<i>Palaemon ivonicus</i> Holthuis, 1950
31	<i>Palaemon yuna</i> Sp.n.
32	<i>Pseudopalaemon amazonensis</i> Ramos-Porto, 1979
33	<i>Pseudopalaemon chryseus</i> Kensley e Walker, 1982
Família Sergestidae Dana, 1852	
34	<i>Acetes marinus</i> Onori, 1975
35	<i>Acetes paraguayensis</i> Hansen, 1919

Na Amazônia, a família Euryrhynchidae está representada por três espécies pertencentes ao gênero *Euryrhynchus* Miers, 1877 *Euryrhynchus amazoniensis*, *Euryrhynchus burchelli* e *Euryrhynchus wrzesniowskii* (MELO, 2003). *E. amazoniensis*, teve o primeiro registro no rio Amazonas, nas proximidades de Manaus (Ilha do Carreiro) por Tiefenbacher, 1978. Hoje sabe-se que sua distribuição estende-se além da região central da Amazônia, indo até o Peru e Venezuela na parte ocidental, graças a García-Dávila e Magalhães (2003). No estado do Pará sua ocorrência foi ampliada até a região nordeste, bem como registrada pela primeira vez no Amapá pelo trabalho de Pimentel (2003). No mesmo trabalho, *E. burchelli*, que já havia sido antes encontrada no Pará, da região oeste até a nordeste, teve seu registro ampliado para a porção leste do Amapá. *E. wrzesniowskii* ocorre desde as Guianas e Suriname (TIEFENBACHER, 1978) e Amazônia central (KENSLEY e WALKER, 1982) até a Amazônia oriental, desde a região oeste até próximo a região nordeste do Pará (PIMENTEL, 2003).

A família Palaemonidae, maior delas, tem na Amazônia 15 espécies registradas e distribuídas em apenas 3 gêneros: *Palaemon* Weber, 1795, *Macrobrachium* Bate, 1868 e *Pseudopalaemon* Sollaud, 1911. *Palaemonetes* Heller, 1869 é, atualmente, considerado sinônimo júnior de *Palaemon* (DE GRAVE e ASHELBY, 2013).

Palaemon carteri e *Palaemon ivonicus* são espécies morfologicamente muito semelhantes com distribuição geográfica simpátrica na bacia amazônica, no entanto, *P. ivonicus* nunca foi documentada nos estados do Amapá e Pará, na porção oriental da Amazônia. (CARVALHO et al., 2014). *Palaemon mercedae*, assim como *P. carteri* tem registro de ocorrência na porção oriental da Amazônia, mas ao contrário de *P. carteri*, *P. mercedae*, não ocorre no Amapá (PILEGGI et al, 2013). *Palaemon pandaliformis* possui distribuição mais restrita as regiões costeiras da Amazônia oriental, Amapá e Pará (PIMENTEL e MAGALHÃES, 2014). *Palaemon yuna*, foi recentemente descrita por Carvalho et al. (2014) a partir de dados morfológicos e moleculares de amostras coletadas no rio negro, estado do Amazonas.

Pseudopalaemon é um gênero endêmico da América do Sul (KENSLEY e WALKER, 1982) e na Amazônia oriental está representado por duas espécies: *Pseudopalaemon amazonensis* e *Pseudopalaemon chryseus*. A primeira ocorre

em ambientes de águas pretas como as do rio Negro, no estado do Amazonas, e baía de Caxiuanã, estado do Pará. Não muito diferente, *P. chryseus*, já foi assinalada desde a porção oeste até a baía de Caxiuanã, Pará. Além disso, também já foi registrada no estado do Amapá (PIMENTEL, 2003; PIMENTEL e MAGALHÃES, 2014).

Macrobrachium é o gênero mais representativo na bacia amazônica, com muitas espécies distribuídas em diferentes tipos de corpos d'água (Águas brancas, claras e pretas). Na bacia amazônica, *M. amazonicum*, é a espécie mais abundante, distribuindo-se desde rios da região costeira até as porções mais interiores da Amazônia (MACIEL e VALENTI, 2009). A distribuição da espécie estende-se ainda por toda a América do Sul (Bacias do Orinoco, Amazonas, Araguaia-Tocantins, São Francisco e La Plata, todas da vertente Atlântica) e recentemente foi citada na América central (HOLTHUIS, 1952; MELO, 2003; VERGAMINI et al., 2011). *M. brasiliense*, *M. nattereri* e *M. surinamicum* têm padrão de distribuição semelhante. *M. brasiliense* distribuiu-se por todo o estado do Pará e rios próximos a costa no Amapá, além de outros estados da Amazônia como Acre, Amazonas e Maranhão. *M. nattereri* também está amplamente distribuída no Amazonas e Pará, mas não é registrada no Amapá. *M. surinamicum* é registrada apenas em dois estados da região amazônica (Amapá e Pará). *M. acanthurus*, *M. carcinus* e *M. offersii*, na Amazônia, possuem ampla distribuição nas bacias costeiras destes estados. *M. jelskii* está amplamente distribuída na bacia amazônica ocorrendo nos estados do Amapá, Amazonas e Pará (PIMENTEL, 2003; PILEGGI et al., 2013; PIMENTEL e MAGALHÃES, 2014).

1.1.3 Importância econômica dos camarões de água doce na Amazônia

A ampla distribuição destes organismos nas regiões tropicais e subtropicais fez com que se tornassem alvos da exploração comercial em muitos países (NEW, 2014). Dentre os Paleomonídeos os principais gêneros de interesse econômico são *Cryphiops* Dana, 1852, *Macrobrachium* Bate, 1868, *Palaemon* Weber, 1795 e *Pseudopalaemon* Sollaude, 1911 (MELO, 2003; KOU et al., 2013). O gênero *Macrobrachium*, na Amazônia, é o que abriga as espécies com maior potencial pesqueiro. *M. amazonicum*, popularmente conhecida como camarão-da-Amazônia, é a espécie mais abundante na região, com grande

potencial para a pesca e aquicultura (MACIEL e VALENTI, 2009). *M. rosenbergii*, também conhecida como “camarão gigante da Malásia”, é uma espécie de água doce de ocorrência natural na região do indo-pacífico e que foi introduzida em muitos países com propósito a aquicultura, chegando ao Brasil nos anos de 1970, sendo hoje facilmente encontrada em ambientes selvagens, como na região costeira da Amazônia, mais precisamente no estado do Pará (SILVA-OLIVEIRA et al., 2011; IKETANI et al, 2016). Sua produção mundial girou em torno de 216.856t, em 2014 (FAO, 2016).

1.1.4 Morfologia de camarões de água doce

A principal diferença em relação aos Dendrobranchiata está na expansão da pleura do segundo somito abdominal, que recobre as pleuras do primeiro e terceiro somitos conforme ilustra a figura 1, uma sinapomorfia deste grupo considerado monofilético (PEREIRA, 1997).

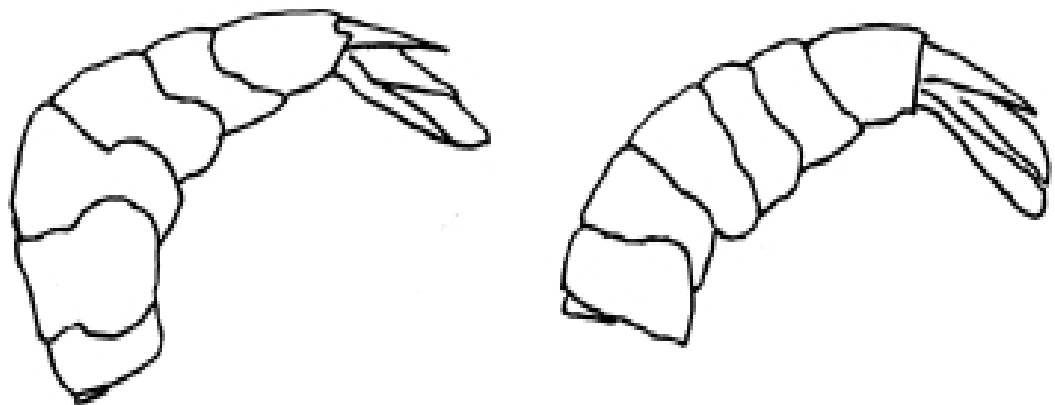


Figura 1: Vista lateral da pleura do segundo somito (segmento) abdominal de um camarão Carídeo e de um Peneídeo, respectivamente (New, 2002).

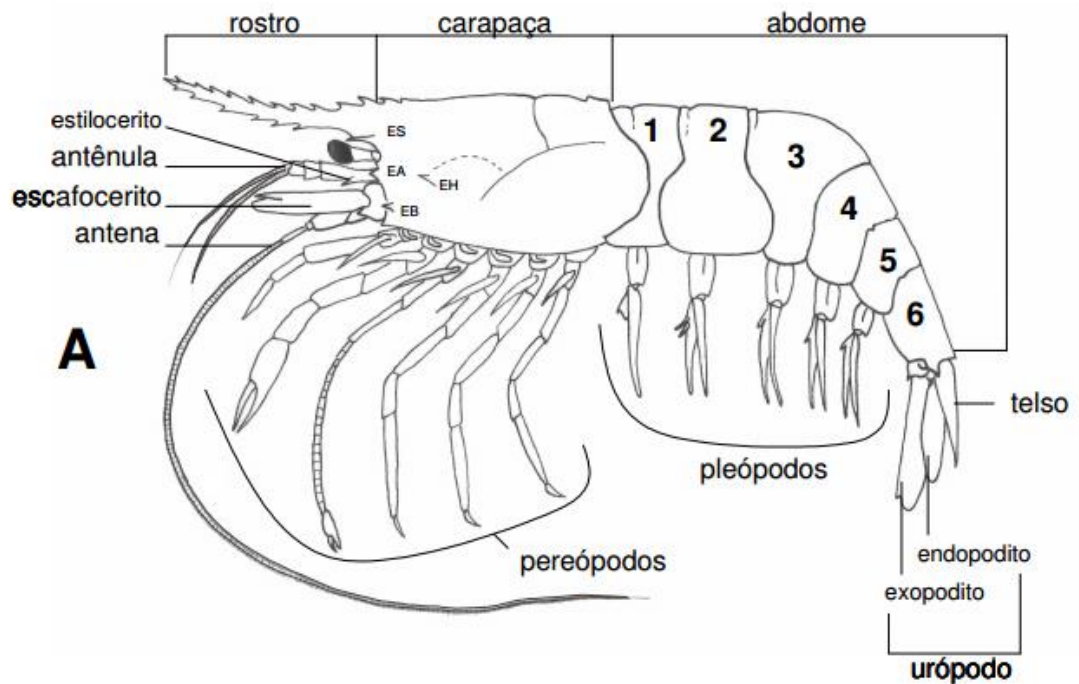


Figura 2: Desenho esquemático de um camarão carídeo, com destaque para as principais estruturas. Fonte: (adaptado por Ferreira, 2009 de Crosnier e Forest, 1973).

As análises morfológicas com fins taxonômicos concentram-se nas variações de três caracteres principais: rostró, segundo par de pereópodos e telso (Figura 2). No entanto, estas estruturas mudam de acordo com o crescimento do animal e variam muito entre fêmeas e machos adultos. Além disso, a semelhança morfológica interespecífica e a alta variabilidade intraespecífica torna esta análise ainda mais dificultosa (HOLTHUIS, 1952; MELO, 2003). Por exemplo, em *Macrobrachium*, o segundo par de pereópodos possui alto nível de variação ao longo do crescimento do animal e o rostró torna-se menor de acordo com este crescimento (HOLTHUIS, 1952), sendo que nos machos o desenvolvimento de algumas estruturas é alométrico (SHORT, 2004), o que sugere haver um problema na descrição correta do que seriam machos adultos totalmente desenvolvidos e jovens em desenvolvimento. Erros na descrição de espécies reportadas para o Brasil já ocorreram (PILEGGI et al., 2013). Além disso, a questão da dominância social relacionada a morfologia dos machos ainda gera muitas dúvidas. Em geral, verifica-se que os machos dominantes são maiores e suas estruturas marcantes são mais desenvolvidas, como o segundo par de pereópodos, mas já se observou casos em que a

dominância é exercida por indivíduos menores em relação a indivíduos maiores com o segundo par de pereópodos menos desenvolvidos (SHORT, 2004).

Para as espécies do gênero *Macrobrachium*, as mais abundantes na região, a dificuldade de resolução taxonômica está no reduzido número de caracteres morfológicos analisados, sendo que os principais são de difícil visualização por conta do pequeno tamanho dos indivíduos, que quando jovens e imaturos estas estruturas são ainda menores e, como dito antes, pelas espécies do gênero possuem morfologia bastante semelhante e conservada (MELO, 2003). Problema semelhante ocorre em espécies do gênero *Palaemon* (CARVALHO et al, 2014).

1.1.5 Identificação Molecular

O aprimoramento dos métodos para obtenção de sequências de nucleotídeos nos últimos 20 anos tem facilitado não só a identificação de novos táxons, como tem resultado no aumento da disponibilidade de dados moleculares, os quais tem colaborado para resolução de dúvidas a respeito das variações morfológicas que seriam geradas pela plasticidade fenotípica, daquelas que provavelmente estariam relacionadas a linhagens distintas (VERGAMINI et al., 2011; BUENO-SILVA, 2012; PILEGGI et al., 2012; CARVALHO, 2014). O gene mitocondrial Citocromo Oxidase C Subunidade I (COI) possui cerca 648 pares de base (pb) quando amplificado, e se popularizou devido sua aplicação como DNA *barcode*. O DNA *barcode* consiste em identificar ou discriminar espécies a partir de um pequeno fragmento ou sequência de DNA mitocondrial, como a COI. As divergências intraespecíficas menores que as interespecíficas são o pressuposto fundamental para o uso efetivo deste marcador (HEBERT et al., 2003).

As principais características que qualificam o DNA mitocondrial (mtDNA) em estudos taxonômicos e filogenéticos populacionais foram inicialmente demonstradas no final da década de 1980, as quais seriam: obtenção com facilidade em face do grande número de mitocôndrias existentes nas células dos tecidos animais, ser encontrado em qualquer organismo eucarioto, de maneira que é possível fazer comparações entre os homólogos de várias espécies, possuir estrutura genética simples sem elementos móveis ou DNA repetitivo, pseudogenes ou íntrons e possuir padrão de herança predominantemente

materna, o que reduz em até quatro vezes o tamanho efetivo populacional (AVISE et al., 1987).

Sabe-se agora que existem limitações relacionadas a estes marcadores, as quais podem ser citadas: análise de locus único, apresentar efeitos de introgressão, heteroplasmia, não separar de maneira completa as linhagens por conta da herança materna (LEFÉBURE et al., 2006) e haver ocorrência de cópias nucleares de DNA mitocondrial (Numts) ou pseudogenes (LOPEZ et al., 1994). O último problema em questão tem sido relatado em mamíferos, insetos e em crustáceos, ocorrendo com maior frequência nos Decapoda, dado relacionado a maior quantidade de estudos utilizando sequências de COI nestes últimos (RAUPACH e RADULOVICI, 2015).

Ao analisar sequências da COI mitocondrial de *M. amazonicum*, Iketani (2012), observou a presença de picos duplos em sítios recorrentes, o que pode caracterizar a presença de cópias nucleares da COI contaminando as sequências de DNA mitocondrial (Numts). Segundo Iketani, 2012, picos duplos em COI podem produzir dados e resultados enviesados em estudos populacionais. Para o efetivo uso deste marcador como DNA *barcode*, o problema pode ser contornado com a obtenção de DNA mitocondrial enriquecido por meio de protocolos específicos (SUNNUCKS e HALES, 1996; ALJANABI e MARTINEZ, 1997), ou por meio da obtenção de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA com auxílio da enzima transcriptase reversa.

O gene 16S tem sido um dos genomas mitocondriais mais utilizados em reconstruções filogenéticas em crustáceos (CHEN et al., 2009). Este gene possui função estrutural (small subunit ribosomal RNA), não sendo, portanto, codificador de proteínas. A ampla utilização deste gene em filogenias animais justifica-se por nele haver regiões conservadas e variáveis (VERGAMINI, 2009). No entanto, baixas resoluções topográficas em filogenias de crustáceos de água doce já foram relatadas (MURPHY e AUSTIN, 2005).

O 28S é um gene nuclear do segmento ribossomal que tem uma taxa de evolução semelhante ou menor que 16S (CHEN et al., 2009). Ainda que possa ser um gene que sofre recombinação genética, o 28S é menos suscetível a tais variações devido ao eficiente mecanismo de reparo de replicação do DNA nuclear. O 28S apresenta menores índices de transições e transversões em

relação ao 16S ribossomal, resultando em menor convergência de taxa, apresentado melhor resolução topológica nas análises (CHEN et al.,2009).

A complementação da análise por um sistema de marcadores nuclear e mitocondrial é uma escolha razoável, pois aumenta a confiabilidade nas análises (MONAGHAN et al., 2005; LEFÉBURE et al., 2006). Raupach et al. (2010) ao combinar a região *barcode* COI com três segmentos nucleares ribossômicos: 18S rDNA: V4, 18S rDNA: V7 e 28S rDNA, para identificar espécies de besouros (Coleoptera: Carabidae) obteve resultados excelentes com 95% de identificação das espécies analisadas. Os resultados confirmam que as expansões de segmentos ribossômicos nucleares em combinação com fragmentos mitocondriais, constituem um complemento valioso e eficaz para DNA *barcode* e evita potenciais armadilhas quando apenas dados mitocondriais são utilizados (RAUPACH et al., 2010).

O relatado impedimento taxonômico -progressiva redução dos taxonomistas morfologistas- (BUENO-SILVA, 2012), a imprecisão ou baixa resolução no delineamento das espécies na família Palaemonidae devido ao conservadorismo morfológico interespecífico e a variação intraespecífica dos caracteres analisados travam o conhecimento a respeito da biodiversidade, ora superestimando, ora subestimando o verdadeiro número de espécies. Contudo, a metodologia *barcode* tem permitido a rápida identificação de espécies, inclusive de espécies crípticas, auxiliando na conservação destas (HEBERT et al.,2004).

2. OBJETIVOS:

2.1 Objetivo geral:

Identificar camarões coletados na região do Baixo Amazonas por meio de marcadores moleculares mitocondriais e nuclear.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a eficiência de marcadores moleculares na identificação de camarões de água doce.
- Estimar os níveis de variação genética inter e intraespecífica para os diferentes marcadores utilizados.
- Avaliar possíveis indícios de cópias nucleares da Citocromo C Oxidase subunidade I nas diferentes espécies identificadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da área de estudo

As coletas de camarões ocorreram em municípios da mesorregião do Baixo Amazonas, oeste do Pará. A região possui uma ampla extensão fluvial e está situada na bacia de sedimentação da planície amazônica, sendo área de confluência dos rios Amazonas e Tapajós e deste último com o rio Arapiuns, na região de Santarém. A região do Baixo Amazonas, por conta de sua localização na paisagem geomorfológica pode ser distinguida em áreas de várzea e de terra firme, com diferentes tipos de cobertura vegetal (Relatório analítico do território do Baixo Amazonas, 2012).

Os pontos de coleta estão situados ao longo dos rios Amazonas, Arapiuns e Tapajós, e em igarapés destas bacias e subbacias. Foram 9 pontos na calha norte do rio Amazonas, distribuídos entre os municípios de Alenquer, Monte Alegre, Nhamundá, AM, Óbidos e Oriximiná; 2 pontos no Rio Arapiuns; 1 no Rio Tapajós (Apêndice A, figura 3).

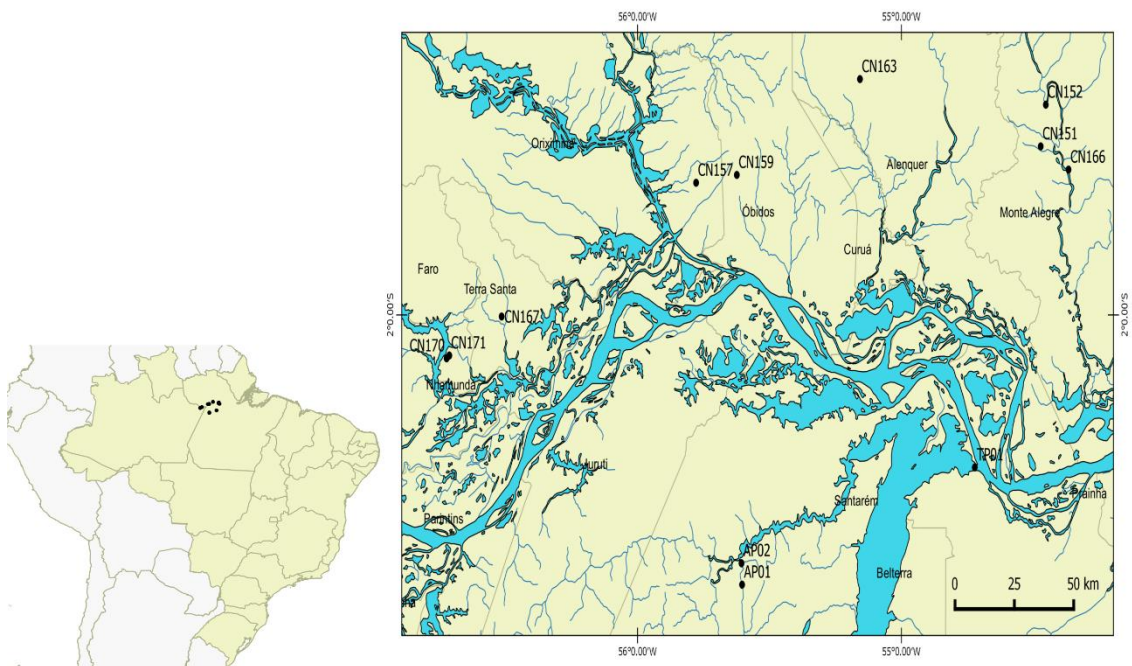


Figura 3: Pontos de coleta na região do baixo Amazonas, oeste do estado do Pará.

Nos igarapés, a coleta foi realizada por meio de arrasto com rede e puçá, com duas pessoas no manuseio, sendo uma pessoa em cada extremidade da rede fazendo o arrasto no substrato a partir do leito do igarapé até sua margem. Nos rios a coleta foi feita utilizando armadilhas de pesca artesanais, próprias para a captura de camarões (Matapis). Todos os animais coletados foram acondicionados em potes e/ou sacos plásticos furados para serem mergulhados em barris contendo álcool etílico 70% ainda em campo. Cada recipiente foi etiquetado com informações da localidade, cada localidade representando um lote, variando de muitos a poucos indivíduos.

3.2. Análises Morfológicas

Antes de proceder com as extrações de DNA, uma triagem com base na morfologia foi realizada de acordo com as chaves taxonômicas propostas por Holthuis (1952); Melo (2003); Pimentel (2003).

3.2.1. Extração de DNA e Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a triagem morfológica dos lotes, todo ou parte dele foi utilizado na obtenção do DNA genômico total, obtido do tecido muscular abdominal ou dos pleópodos usando o Kit Wizard Genomic-Promega. Os critérios para obtenção dos dados moleculares foram:

- Lotes com menos de 20 indivíduos: todos foram sequenciados;
- Lotes com mais de 20 indivíduos, mas menos de 50: 20 indivíduos foram selecionados aleatoriamente, mas abrangendo todos os grupos morfológicos observados na triagem;
- Lotes com mais de 50 indivíduos procurou-se selecionar aleatoriamente 10 indivíduos de cada grupo morfológico.

A partir destes extraídos, foi isolada e amplificada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* A e F (PALUMBI e BENZIE, 1991) parte do gene da COI. O gene 16S foi amplificado com os *primers* “ar” e “br” (PALUMBI et al., 1991) (Tabela 1). As melhores condições para amplificação testadas para estes marcadores foram as seguintes: desnaturação inicial por 3 min a 94°C; Anelamento por 35 ciclos (45s a 94°C; 45s a 51,1°C e 1 min a 72°C); extensão final 7 min a 72°C.

Além deste, o marcador 28S foi amplificado com os *primers* “a” e “b” (WHITING et al., 1997) (Tabela 1). As melhores condições para amplificação deste foram as seguintes: desnaturação inicial por 3 min a 94°C; Anelamento por 35 ciclos (30s a 94°C; 30s a 51°C e 1 min a 72°C); extensão final 5 min a 72°C.

Tabela 1: *Primers* de COI, 16S e 28S, suas respectivas sequências e autores.

PRIMERS	SEQUÊNCIA	AUTOR
COI A	5'-AGTATAAGCTGG GTAGTC-3'	Palumbi & Benzie, 1991
COI F	5'- CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC-3'	Palumbi & Benzie, 1991
16Sar	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	Palumbi <i>et al.</i> , 1991
16Sbr	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	Palumbi <i>et al.</i> , 1991
28Sa	5'-GACCCGTCTTGAAGCACG-3'	Whiting et al., 1997
28Sb	5'-TCGGAAGGAACCAGCTAC-3'	Whiting et al., 1997

Para avaliar a qualidade do DNA extraído e do amplificado após a PCR foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% com aplicação do *GelRed* para corar o DNA. Em ambos, as bandas foram visualizadas e aquelas com melhor resolução foram sequenciadas a fim de se obter as sequências.

3.2.2. Reação de PCR para o sequenciamento

A reação de sequenciamento destas amostras foi realizada no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems) usando o kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas em ambas as direções com os mesmos *primers* descritos na tabela 1.

3.3. Análise dos dados

As sequências obtidas foram alinhadas no programa CodonCode Aligner v7.0.1 (CodonCode Corporation) para visualização e edição, quando necessário.

As sequências COI foram inspecionadas visualmente quanto à presença de sítios ambíguos (picos duplos). Estes foram considerados verdadeiros quando o pico menor atingiu, no mínimo, 60% da altura do pico maior em ambas as direções sequenciadas (IKETANI, 2012). As sequências que apresentaram estas ambiguidades foram contabilizadas e submetidas ao *BLAST*. Para reduzir o banco e simplificar a análise, apenas uma sequência foi colhida quando os retornos foram acima de 90% e E-value próximo ou igual a zero. Quando os

retornos estavam abaixo de 90% mas acima de 80%, pelo menos três retornos foram obtidos.

O programa DnaSP v5.10.01 (LIBRADO e ROZAS, 2009) foi usado para a determinação dos haplótipos. Os haplótipos diferentes foram submetidos a pesquisa *BLAST* (MegaBlast) disponível no site “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificação das espécies mais similares.

A análise da variabilidade genética inter e intraespecífica foi feita por meio do cálculo da distância p com modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros (K2P), (KIMURA, 1980) para as sequências de COI. Para os marcadores 16S e 28S foi calculada a distância p não corrigida. Em todos os casos foi utilizado o programa MEGA v7.0 (TAMURA et al., 2011). Além disso, foram construídas árvores de Agrupamentos de Vizinhos (NJ) também com uso do programa MEGA v7.0 com significância dos agrupamentos estimada através da análise de *bootstrap*, a partir de 1000 pseudoréplicas para os bancos de dados. Ao banco de COI e 16S foram inseridas sequências *Genbank* de espécies amazônicas já sequenciadas, para servir de referência na construção e posterior análise da árvore NJ (Tabela 2 e 3). Ao banco de 28S foram somadas sequências de espécimes depositadas em museu previamente identificadas morfologicamente (Tabela 4). Estas sequências foram obtidas no laboratório de genética e biodiversidade da UFOPA (LGBio).

Tabela 2: Sequências de espécies amazônicas obtidas no Genbank usadas na construção da árvore NJ de COI.

Espécies	Localidade	Genbank (COI)	Autores
<i>M. acanthurus</i>	Costa Rica	KM101537	Pileggi et al., 2014
<i>M. amazonicum</i>	Itacoatiara-AM	GU929545	Vergamini et al., 2011
<i>M. amazonicum</i>	Santarém-341 PA	-	Iketani, 2012
<i>M. amazonicum</i>	Santa Bárbara-PA	-	Iketani, 2012
<i>M. amazonicum</i>	Bela vista –GO	-	Iketani, 2012
<i>M. amazonicum</i>	Aquidauana-MS	-	Iketani, 2012
<i>M. jelskii</i>	São Paulo-BRA	GU929469	Vergamini et al., 2011
	Guyana Francesa-		Van Wormhoudt, 2014
<i>M. brasiliense</i>	FRA	KJ155596	
<i>M. ferreirai</i>	Manaus-AM	HM352483	Pileggie e Mantelatto, 2010
<i>M. surinamicum</i>	Icangui-PA, BRA	KM101565	Pileggi et al., 2014
	Guyana Francesa-		Van Wormhoudt, 2014
<i>E. amazoniensis</i>	FRA	KJ155598	

Tabela 3: Sequências de espécies amazônicas obtidas no Genbank usadas na construção da árvore NJ de 16S.

Espécies	Localidade	Genbank	Autores
<i>P. ivonicus</i>	Itacoatiara-AM	KF923728	Carvalho et al.,2014
<i>P.yuna</i>	Manaus-AM	KF923716	Carvalho et al.,2014
<i>E. wrzesniowskii</i>	-	EU868654	Bracken et al.,2009
<i>M.brasiliense</i>	Serra Azul-SP	GU929446	Vergamini et al.,2011
<i>M.amazonicum</i>	Itacoatiara-AM	GU929460	Vergamini et al.,2011
<i>M.acanthurus</i>	Guaraquecaba-SP	HM352445	Pileggie e Mantelatto, 2010
<i>M.jelskii</i>	Planura-MG	HM352436	Pileggie e Mantelatto, 2010
<i>M.nattereri</i>	Manaus-AM	HM352428	Pileggie e Mantelatto, 2010
<i>M.ferreirai</i>	Manaus-AM	HM352427	Pileggie e Mantelatto, 2010
<i>M.inpa</i>	Manaus-AM	HM352433	Pileggie e Mantelatto, 2010
<i>P.carteri</i>	Belem-PA	KF923730	Carvalho et al.,2014
<i>P.carteri</i>	Amapá-AP	KF923727	Carvalho et al.,2014
<i>P.pandaliformis</i>	Panama	JN674341	Ashelby et al.,2012
<i>P.pandaliformis</i>	México	JF491340	Botello e Alvarez, 2013
<i>P.pandaliformis</i>	São paulo-BRA	KF923713	Carvalho et al.,2014
<i>P.cryseus</i>	Brasil	JF491342	Botello e Alvarez, 2013

Tabela 4: Espécimes de museu para obtenção de sequências e construção da árvore NJ de 28S.

Espécies	Localidade	Abreviatura	Nº do Catálogo	Museu
<i>Macrobrachium jelskii</i>	Fiona de Caxiuanã, Melgaço, Pará	Mjel16	731	MPEG
<i>Pseudopalaemon chryseus</i>	Monte Dourado, Reserva Genética Felipe, Pará	Pchry01	749	MPEG
<i>Palaemonetes carteri</i>	Mocambo, Belém, Pará	Pcart10	644	MPEG
<i>Palaemon pandaliformis</i>	Furo do Taici, Bragança, Pará	Ppanda13	196	MPEG
<i>Macrobrachium surinamicum</i>	Lomeiro do Ajiru, Marajó-Pa	Msuri29	520	MPEG
<i>Macrobrachium brasiliense</i>	Igaraé do Braço	Mbra84	537	IEPA
<i>Macrobrachium sp1</i>	Igaraapé Baliza - Acampamento	Msp1-131	869	IEPA
<i>Macrobrachium nattereri</i>	Rio Cupixi	Mnat137	893	IEPA
<i>Macrobrachium nattereri</i>	Rio Uatumã, na cachoeira do Miriti	Mnat66	279	INPA
<i>Macrobrachium sp.</i>	AMCEL- Ponte	Msp-125	326	IEPA
<i>M. amazonicum</i>	Aquidauana-MS	M.amaAq103	-	-
<i>M. amazonicum</i>	Santa Bárbara-PA	M.amaStB02	-	-
<i>M. amazonicum</i>		M.amaME	-	-

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos bancos de dados

Para o gene COI foram obtidas sequências com 540 pares de base (pb) provenientes de 85 indivíduos coletados na região do Baixo Amazonas, estas sequências foram distribuídas em 57 haplótipos (APÊNDICE B). Das 85 sequências, 39 apresentaram picos duplos ao longo do cromatograma e foram excluídas da maioria das análises. As 46 sequências restantes (sem picos duplos) formaram 16 haplótipos. A este banco foram inseridas as sequências *Genbank*, formando um banco final com 59 sequências.

O banco de 16S obteve 12 sequências originais. A este, mais 15 sequências obtidas no *Genbank* foram somadas com o mesmo objetivo citado no banco de COI. Com relação aos picos duplos, sete sequências apresentam algum tipo. Já para o banco de 28S foram obtidas 28 sequências com 447 pb, que se distribuíram em 16 haplótipos. A este banco foram somadas as sequências de museu, formando um banco final com 42 sequências.

4.1.1 Pesquisa BLAST

COI

A pesquisa *BLAST* do banco contendo sequências com picos duplos revelou que estes se distribuíram em duas espécies: *M. amazonicum* e *M. brasiliense*. As demais sequências resultaram em baixas identidades (menores que 90%), muitas vezes revelando espécies não condizentes com registro sobre espécies brasileiras e amazônicas (APÊNDICE B). Do mesmo modo, a maioria das sequências livres de picos duplos não obtiveram retornos confiáveis através do *BLAST*, com apenas 16 sequências tendo a identidade revelada entre os haplótipos 09 e 15 como sendo *M. amazonicum*. A mostra Msp04AP01 foi identificada como *M. acanthurus* com valor de similaridade igual 99.267% (Tabela 3).

Tabela 5: Resultados da pesquisa *BLAST* para as sequências de COI no NCBI.

Haplótipo	GenBank	Similaridade %	E-value	Bit Score	Identificação
HAP01: 01CN170	AB235257	85.1	9.26e-142	514	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	KX151843	85.2	9.32e-137	497	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
	KX151842	85.2	9.32e-137	497	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
HAP02: 13CN170, 01CN167, 02CN167, 03CN167, 04CN167, 05CN167, 06CN167	AB235257	83.8	4.78e-155	558	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	KX151843	83.3	6.23e-149	538	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
	KX151842	83.3	6.23e-149	538	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
HAP03: 01Ap01, 03Ap01, 18Ap01, 19Ap01	AB235287	85.3	1.34e-175	627	<i>Macrobrachium nipponense</i>
	AB235288	84.8	1.35e-170	610	<i>Macrobrachium nipponense</i>
	AB235301	84.7	1.74e-169	606	<i>Macrobrachium sp CD1</i>
HAP04: 12Ap01, 09Ap01, 06Ap01, 02Ap01, 16Ap01, 04Ap01, 10Ap01, 11Ap01, 13Ap01	AB235287	85.3	1.34e-175	627	<i>Macrobrachium nipponense</i>
	AB235288	84.8	1.35e-170	610	<i>Macrobrachium nipponense</i>
	AB235301	84.7	1.74e-169	606	<i>Macrobrachium sp CD1</i>
HAP05: 01CN163, 03CN163	HQ830201	85	1.32e-170	610	<i>Macrobrachium nipponense</i>
	AB235287	85.2	1.70e-169	606	<i>Macrobrachium nipponense</i>
	AB235263	85.1	2.20e-168	603	<i>Macrobrachium inflatum</i>
HAP06: 10CN170	KJ155596	81.8	4.44e-165	592	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
	KY224525	71.7	8.50e-68	268	<i>Macrotermes sp.</i>
	KY224573	72.8	1.84e-64	257	<i>Macrotermes sp.</i>

Tabela 5: continuação

Haplótipo	GenBank	Similaridade %	E-value	Bit Score	Identificação
HAP07: 07CN170, 06CN170, 05CN170	AB235278	86.2	7.50e-173	617	<i>Macrobrachium latimanus</i>
	AB235277	86.2	7.50e-173	617	<i>Macrobrachium latimanus</i>
	AB235276	86.2	7.50e-173	617	<i>Macrobrachium latimanus</i>
HAP08: Msp04Ap01	KM101537	99.2	0.0	987	<i>Macrobrachium acanthurus</i>
HAP09: 29TP01	GU929544	98.1	0.0	948	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP10: TP01MA32, M10TP01, 10CN166, 06CN166	GU929545	99.8	0.0	1046	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP11: M07TP01, 08TP01, 30TP01, M09TP01	GU929545	100	0.0	1051	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP12: 14CN166	GU929545	99.6	0.0	1026	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP13: M04TP01, 38TP01	GU929545	99.6	0.0	1040	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP14: M03TP01	GU929542	100	0.0	1051	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP15: M01Ap02, M05TP01, 33TP01, 39TP01	GU929542	100	0.0	1051	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP16: 09CN170, Msp02Ap01, Msp03Ap01	KM978918	83.8	3.79e-161	579	<i>Macrobrachium bullatum</i>
	AB235242	83.4	2.95e-157	566	<i>Macrobrachium asperulum</i>
	AB235240	83.4	2.95e-157	566	<i>Macrobrachium fukienense</i>

16S

Das 12 sequências geradas para este banco, 5 foram identificadas como *M. brasiliense*, com similaridade na identificação variando de 89% a 91%. Duas amostras (11AP02 e Msp04AP01) foram mais próximas de *Macrobrachium potiuna*, com valores de similaridade iguais a 86% e 87%, respectivamente. Outras duas (20AP01 e 12AP01) foram identificadas como *Euryrhynchus wrzesniowskii*, no entanto, uma delas, 12AP01, apresentou identidade baixa, 84%. As demais sequências foram identificadas como *M. amazonicum* (05TP01) com 99% de similaridade, *Macrobrachium nattereri* (02CN157) com 90% e *Palaemon ivonicus* (01CN167) com 91% de similaridade. A tabela 6 resume os resultados do *BLAST* e apresenta outras possíveis identidades.

Tabela 6: Resultados da pesquisa *BLAST* para o 16S no banco de dados do NCBI.

Sequência	GenBank	Similaridade %	E-value	Bit Score	Identificação
20AP01	EU868654	92	3e-166	595	<i>Euryrhynchus wrzesniowskii</i>
12AP01	EU868654	84	3e-147	532	<i>Euryrhynchus wrzesniowskii</i>
	JX1844903	83	6e-134	488	<i>Alvinocaris chelys</i>
	JQ035657	83	1e-131	481	<i>Opaepele loihi</i>
15CN152	GU929446	91	0.0	682	<i>M.brasiliense</i>
11CN152	GU929446	90	3e-145	532	<i>M.brasiliense</i>
Msp04AP01	JX466940	86	9e-152	547	<i>M.potiuna</i>
	JX466930	86	9e-152	547	<i>M.potiuna</i>
	JX466929	86	9e-152	547	<i>M.potiuna</i>
02CN157	HM352428	90	2e-177	636	<i>M.nattereri</i>
04CN152	GU929446	90	2e-177	632	<i>M.brasiliense</i>
01CN167	KF923728	91	0.0	747	<i>P.ivonicus</i>
16CN152	GU929446	91	5e-179	638	<i>M.brasiliense</i>
11AP02	JX466940	87	5e-139	503	<i>M.potiuna</i>
	JX466930	87	2e-138	503	<i>M.potiuna</i>
	JX466929	87	2e-138	503	<i>M.potiuna</i>
05TP01	GU929460	99	0.0	898	<i>M.amazonicum</i>
02CN152	AY377839	89	2e-142	516	<i>M.brasiliense</i>
	JX466943	89	1e-139	507	<i>M.potiuna</i>
	GU929446	89	4e-139	505	<i>M.brasiliense</i>

28S

Das 28 sequências deste banco, absolutamente todas não apresentaram resultados de pesquisa *BLAST* condizentes com a fauna de Palaemonideos da

Amazônia. O que se verificou foram retornos com baixas similaridades relacionadas, principalmente, a espécies de *Macrobrachium* asiáticas, conforme indica a tabela 5.

Tabela 7: Resultados da pesquisa *BLAST* para sequências de 28S.

Haplótipo	GenBank	Similaridade %	E-value	Bit Score	Identificação
Hap1: 01CN170, 08AP02, 05AP02, 11AP02, 15AP02, 18AP02, 14AP02, 02AP02, 03AP02, 12AP02, 13AP02, 16AP02, 01AP02, 17AP02, Pchry	DQ079785	84.4	1.49e-98	370	<i>C. caementarius</i>
	FM986508	84.2	5.37e-98	368	<i>M. Pilimanus</i>
	FN995634	84.2	1.93e-97	366	<i>M. tolmerum</i>
Hap 2: 02CN157, 03CN159, 05CN157, 09AP02, 06AP02	DQ079797	88.6	5.59e-138	501	<i>M. potiuna</i>
	FM986543	83.9	7.59e-102	381	<i>Macrobrachium urayang</i>
	FM986528	83.5	1.64e-98	370	<i>Macrobrachium urayang</i>
Hap 3: 15AP01, 17AP01	EF540846	84.5	5.50e-103	385	<i>Anchistus miersi</i>
	EU920971	83.3	1.20e-94	357	<i>Anchistioides antiguensis</i>
	DQ079784	83.1	2.01e-92	350	<i>Creaseria morleyi</i>
Hap 4: 17CN152, MBRA84	DQ079797	89	9.26e-141	510	<i>Macrobrachium potiuna</i>
	FM986543	84.1	5.86e-103	385	<i>Macrobrachium urayang</i>
	FM986528	83.6	1.27e-99	374	<i>Macrobrachium malayanum</i>
Hap 5: 04AP02	FN995634	84.2	1.93e-97	366	<i>Macrobrachium tolmerum</i>
	FM986508	84	2.50e-96	363	<i>Macrobrachium aff. Pilimanus</i>
	EF540848	83.9	2.50e-96	363	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>
Hap 6: 09TP01, 07CN166, 16TP01	FM986508	87	9.08e-121	444	<i>Macrobrachium aff. pilimanus</i>
	FM986523	85.8	1.18e-114	424	<i>Macrobrachium latidactylus</i>
	FM986545	85.9	1.98e-112	416	<i>Macrobrachium yui</i>
Hap 7: MNAT137 Mnat66	DQ079797	89.6	7.18e-106	394	<i>Macrobrachium potiuna</i>
	FM986543	95.5	1.60e-82	316	<i>Macrobrachium urayang</i>
	FM986528	95.5	1.60e-82	316	<i>Macrobrachium malayanum</i>

Tabela 7: continuação

Haplótipo	GenBank	Similaridade %	E-value	Bit Score	Identificação
Hap 8: 08CN166	FM986508	86.3	1.75e-97	366	<i>Macrobrachium aff. Pilimanus</i>
	FM986523.1	95.7	1.37e-88	337	<i>Macrobrachium latidactylus</i>
	FM986545.1	84.2	2.30e-86	329	<i>Macrobrachium yui</i>
Hap 9: 03AP02-2	FM986508.1	84	6.95e-97	364	<i>Macrobrachium aff. Pilimanus</i>
	FN995634.1	84.	8.99e-96	361	<i>Macrobrachium tolmerum</i>
	kdjkDQ079795.1	83.2	7.00e-92	348	<i>Macrobrachium sp. MLP123_2</i>
Hap 10: 01TP01	FM986508.1	86.8	1.17e-119	440	<i>Macrobrachium aff. Pilimanus</i>
	FM986545.1	85.8	7.10e-112	414	<i>Macrobrachium yui</i>
	FM986523.1	85.2	9.18e-111	411	<i>Macrobrachium latidactylus</i>
Hap 11: Msuri29	FN995634	87.2	1.47e-118	436	<i>Macrobrachium tolmerum</i>
	FM986508	85.7	1.15e-109	407	<i>Macrobrachium aff. Pilimanus</i>
	EU920971	85.5	5.37e-108	401	<i>Anchistioides antiguensis</i>
Hap 12: Pcart10	FN995634	81.1	2.03e-77	300	<i>Macrobrachium tolmerum</i>
	FM986532	80.9	2.62e-76	296	<i>Macrobrachium niphanae</i>
	FM986508	80.7	1.22e-74	291	<i>Macrobrachium aff. Pilimanus</i>
Hap 13: Ppanda	FN995634	82.8	4.31e-89	339	<i>Macrobrachium tolmerum</i>
	FM986532	82.6	1.55e-88	337	<i>Macrobrachium niphanae</i>
	FM986508	82.4	7.21e-87	331	<i>Macrobrachium aff. pilimanus MB-2009</i>
Hap 14: MJEL16	FM986508	86.2	1.15e-109	407	<i>Macrobrachium aff. Pilimanus</i>
	EF540848	86.1	1.15e-109	407	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>
	FM986511	85.8	1.49e-108	403	<i>Macrobrachium dacqueti</i>
Hap 15: MSP1-131	DQ079797	88.1	4.20e-129	472	<i>Macrobrachium potiuna</i>
	FM986543	83.7	2.64e-96	363	<i>Macrobrachium urayang</i>
	FM986528	83.7	2.64e-96	363	<i>Macrobrachium malayanum</i>
Hap 16: MSP125	FM986508	86.8	3.14e-115	425	<i>Macrobrachium aff. pilimanus MB-2009</i>
	FM986523	85.2	6.85e-107	398	<i>Macrobrachium latidactylus</i>
	FM986532	84.8	4.12e-104	388	<i>Macrobrachium aff. pilimanus MB-2009</i>

4.1.2 Árvores filogenéticas

A árvore filogenética de NJ para COI foi construída a partir do banco contendo apenas sequências sem picos duplos e revelou a existência de seis grupos distintos, fortemente suportados por valores de *bootstrap*. Os agrupamentos revelaram claramente a existência de duas espécies: *M. amazonicum* e *M. acanthurus*, grupos 1 e 2, respectivamente (Figura 4).

Os demais grupos (3, 4, 5 e 6) não agruparam com as sequências de referência *Genbank*, necessitando apoio das outras duas árvores e análise de distância genética para terem suas identidades, possivelmente, reveladas.

espécies de *Palaemon*, estando mais próxima de *P. yuna*. Caso semelhante ocorre com as sequências 12AP01 e 20AP01 em relação a *E. wrzesniowskii*.

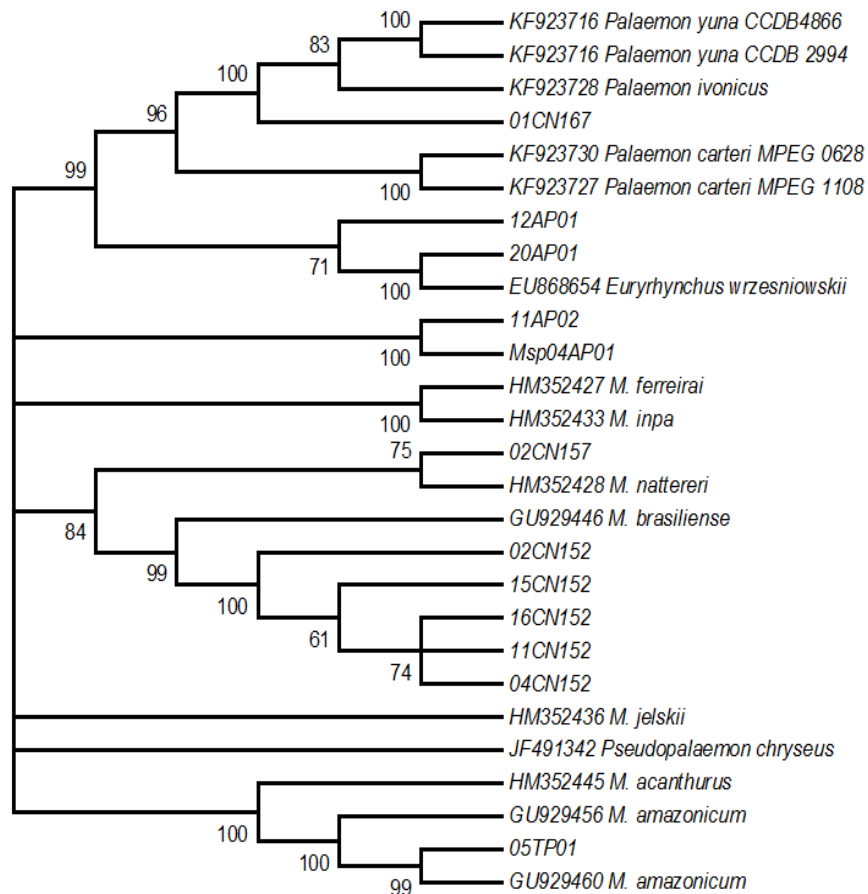


Figura 5: Árvore de Agrupamento de Vizinho (NJ) obtida a partir das sequências do marcador 16S, usando o modelo de distância p não corrigida com análise de *bootstrap*.

A árvore baseada em sequências do 28S, formou cinco grupos distintos com altos valores de *bootstrap*, onde em três deles foi possível identificar claramente as espécies contidas nos lotes AP02 (Cachoeira do Mentai, Rio Arapiuns), TP01 (Rio tapajós, Santarém), CN157 (Oriximiná), CN159 (Óbidos), CN166 (Igarapé na fazenda da Brama, Alenquer) e CN170 (Igarapé Cangu, Nhamundá). O primeiro grupo contendo amostras do lote AP02 e uma única amostra do lote CN170, foi identificado como *Pseudopalaemon chryseus*. De maneira semelhante, as amostras dos lotes TP01 e CN166 foram identificadas como *M. amazonicum*. Duas sequências do lote AP02 (06 e 09), duas de CN157, uma de CN159 e outra do lote CN152, agruparam junto a *M. brasiliense*. As

amostras 15AP01 e 17AP01 não se corresponderam com nenhuma sequência de referência neste banco (Figura 6).

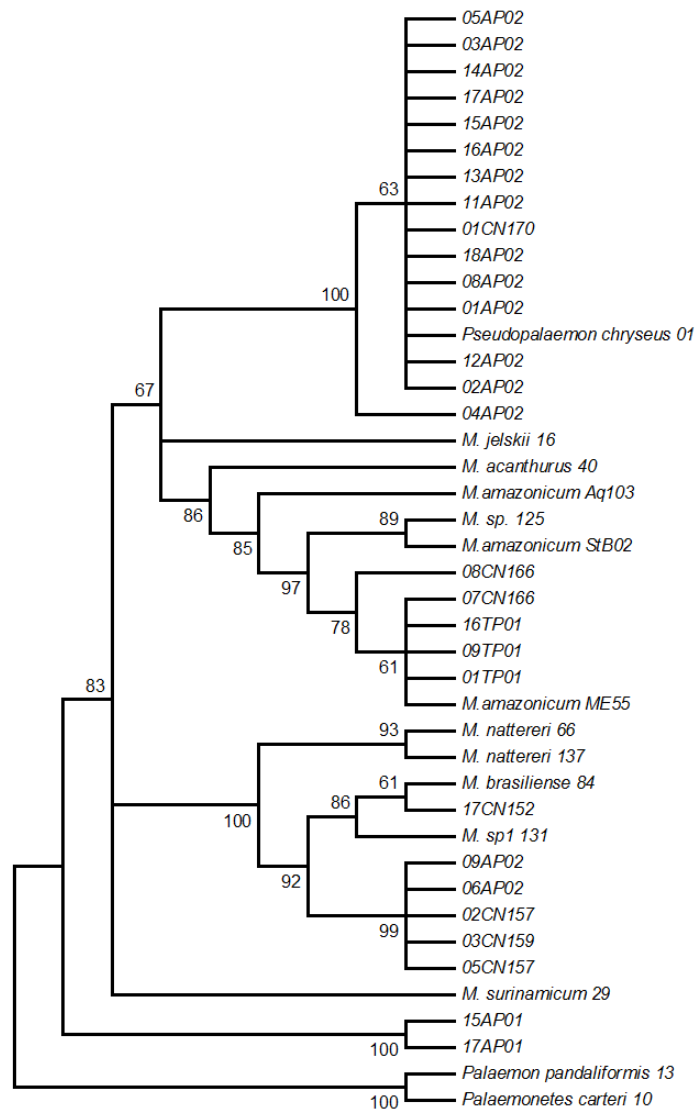


Figura 6: Árvore de Agrupamento de Vizinho (NJ) obtida a partir das sequências do marcador 28S, usando o modelo de distância p não corrigida com análise de *bootstrap*.

4.1.3 Distâncias genéticas

A árvore obtida a partir de sequências de COI mostrou a formação de 6 grupos (figura 4). Assim, agrupando essas sequências e calculando as distâncias genéticas médias dentro dos grupos, observou-se que estas foram

inferiores a 2 % em todos, exceto no grupo 6, onde foi observada uma distância de 4,9%. Entre os grupos, todas as distâncias médias ultrapassaram a 15% (Tabela 8).

Tabela 8: Distância média dentro dos grupos e entre os grupos para COI. Parênteses indicam as distâncias médias dentro dos grupos.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Gp. 1 <i>M.amazonicum</i>	(1,3)					
Gp. 2 <i>M.acanthurus</i>	16,3	(0,06)				
Gp. 3	18,2	19	(0,0)			
Gp. 4	22,2	27,1	21	(0,0)		
Gp. 5	23,6	23,3	24,9	27,8	(0,0)	
Gp. 6	21,8	24,7	22,4	25,3	21	(4,9)

Ainda para COI, a menor distância intraespecífica (0%) foi observada entre sequências de *M. amazonicum*. Já a maior distância intraespecífica (3,4%) também foi registrada nesta espécie ao comparar a sequência *Genbank* de Aquidauana (Matogrosso do Sul), e as sequências da Calha Norte (06CN166,10CN166) e rio Tapajós (M10TP01 e 32TP01). Também foram obtidas as menores e maiores distâncias interespecíficas dentro de *Macrobrachium*, onde a menor distância, 15%, foi registrada entre *M. jelskii* e *M. amazonicum* STM341 e a maior, 24,6%, entre *M. ferreirai* e *M. carcinus*.

A menor distância observada para as sequências do 16S foi de 0% entre *M. amazonicum* e a amostra 05TP01. Já a maior distância foi observada entre *M. brasiliense* e a amostra 11CN152, 10,4% de divergência. A menor distância entre a amostra 01CN167 e as sequências de *Palaemon* foi de 6,1% em relação a *P. yuna*. As sequências 12AP01 e 20AP01 apresentaram uma distância genética de 17,5% e 8,6%, respectivamente em relação a *E. wrzesniowskii*. A amostra 02CN157 apresentou distância de 10,5 % em relação a *M. nattereri* e de 11,7% em relação a *M. brasiliense*.

O grupo formado pela sequência referência de 28S de *P. chryseus* apresentou baixas distâncias entre suas sequências, sendo que uma única amostra (4AP02) apresentou valores acima de 0%. O grupo de *M. amazonicum* apresentou menor distância entre as amostras 09TP01 e *M. amazonicum* ME55, com 0% de divergência, e maior distância entre *M. amazonicum* Aq103 (coletada em Aquidauana/MS) e *M. amazonicum* Stb02 (coleta em Santa Barbara/PA), 3,7%. Já no grupo *M. brasiliense* a maior distância, 2,4%, foi entre *M. sp1* 131 e as sequências 06AP02, 09AP02, 02CN157, 05CN157 e 02CN159. Estas amostras apresentam a mesma distância em relação a *M. nattereri*.

As sequências do 28S também foram analisadas com intuito de se conhecer as distâncias médias entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9: Distância média dentro dos grupos e entre os grupos para 28S. Parênteses indicam as distância médias dentro dos grupos.

	G1	G2	G3	G4
Gp. 1 <i>Pseudopalaemon</i>	(0,01)			
Gp. 2 <i>Macrobrachium</i>	12,9	(8,2)		
Gp. 3 <i>Palaemon</i>	20,6	18,9	(6,1)	
Gp. 4 <i>Euryrhynchus*</i>	17,2	15,6	18,6	(0,0)

5. DISCUSSÃO

5.1 Pesquisa *BLAST*- Limites da análise

A maior parte das espécies conhecidas de camarões da região amazônica possui sequências depositadas no banco de dados do NCBI para os marcadores COI e 16S, de modo que se esperava a precisa identificação das amostras, sobretudo, daquelas pertencentes ao gênero *Macrobrachium*, que na região está representado por 11 espécies, todas sequenciadas para estes marcadores. *P. carteri*, *P. ivonicus*, *P. pandaliformis* e *P. yuna* representam o gênero *Palaemon* na Amazônia, todas sequenciadas apenas com o 16S. *E. amazoniensis* é a única espécie do gênero *Euryrhynchus* sequenciada para a COI, bem como *E. wrzesniowski* só foi sequenciada para 16S e 18S.

No entanto, para o banco de COI sem picos duplos, os únicos retornos válidos da pesquisa *BLAST* se limitaram as identificações de *M. amazonicum*, onde houve respaldo estatístico ($E\text{-value} = 0$) e valores de *bitscore* consideravelmente altos. A sequência Msp04AP01 de COI foi identificada como *M. acanthurs*, porém a análise conjunta dos bancos mostrou resultados diferentes quando a mesma amostra foi submetida a pesquisa *BLAST* para o 16S (Tabela 4). Isso em si demonstra a fragilidade desta identidade, uma vez que era esperado o mesmo resultado para os dois marcadores. Mas é importante dizer que esta amostra, embora não tenha atendido ao critério de definição de picos duplos (isto é, picos duplos em ambas as direções sequenciadas), apresentou este tipo de pico em um dos sentidos sequenciados.

Por serem sequências mitocondriais, tanto COI quanto 16S estão sujeitos a ocorrência de pseudogenes (*Numts*) e/ou heteroplasmia, cujos os principais indícios são a presença de picos duplos em sítios recorrentes, ocorrência de indels e/ou códons de parada (apenas para regiões codificadoras), sendo que os *Numts* se caracterizam pela presença de genes mitocondriais em regiões nucleares que durante o processo de obtenção do material genético para as análises moleculares são amplificados junto ao fragmento alvo devido a utilização de *primers* universais (LOPEZ et al., 1994; COLLURA e STEWART, 1995), de maneira que o princípio da ortologia acaba sendo violado

(SORENSEN e QUINN, 1998; BENSASSON *et al.*, 2001; IKETANI, 2012). As amostras dos lotes CN151 e CN152 foram detectadas com muitos picos duplos e quando submetidas ao *BLAST*, foram identificadas como *M. amazonicum* e *M. brasiliense*. Iketani (2012) já havia demonstrado a ocorrência de pseudogenes em *M. amazonicum*, mas este é o primeiro indício em *M. brasiliense*.

Quanto as identidades incongruentes geradas pela pesquisa *BLAST* vistas para as sequências sem picos duplos, pode-se inferir que tratam-se de *Numts* não detectados nas sequências *Genbank* (BUUHAY, 2009) ou nas sequências do banco utilizado neste trabalho por tratarem-se de *Numts* crípticos (BERTHEAU *et al.*, 2011). Se levarmos em consideração esta última hipótese, o que se está refletindo a partir dos retornos *BLAST* é a amplificação da região nuclear anterior a mutação (PERNA e THOMAS, 1996) que separou as linhagens antigas de *Macrobrachium*, visto que todas as espécies deste gênero derivam de um único ancestral comum (ANGER, 2013). Outra hipótese é a de que estes retornos incongruentes seriam por conta destas sequências de entrada representarem espécies novas. Também existe a possibilidade destas sequências serem de espécies ainda não sequenciadas para COI, como algumas dos gêneros *Euryrhynchus*, *Palaemon* e *Pseudopalaemon*.

E. wrzesniowskii (20AP01) e *P. ivonicus* (01CN167), identificadas pelo *BLAST* de 16S, necessitam de mais análises antes de serem confirmadas, devido às incertezas quanto a relevância do valor de similaridade acima de 90%, mas abaixo 100%, ser fiável para tal marcador. Todas estas espécies conhecidas da Amazônia, até o presente momento não possuem sequências de 28S no *Genbank*, o que de imediato explica os retornos tão incongruentes da pesquisa *BLAST* para este banco.

5.1.1 Árvores filogenéticas e Distâncias genéticas

A construção das árvores NJ para cada marcador permitiu a análise conjunta dos dados, onde as identidades de alguns agrupamentos não identificados *a priori* pôde ser obtida e, em alguns casos, sustentada ou não, através da correspondência entre o posicionamento das sequências nas diferentes árvores e a verificação da distância genética.

A amostra Msp04AP01, que se comportou de maneira distinta nas árvores de COI e 16S, levantou dúvidas com relação a sua real identidade (Figuras 4 e 5). Como citado anteriormente, esta amostra apresentou picos duplos em um dos sentidos sequenciados, mas que não foram considerados no alinhamento final. Portanto, é provável que este agrupamento não corresponda a realidade. Soma-se a isso o fato de que *M. acanthurus* é uma espécie predominantemente costeira e seu registro continental é pontual e com baixa precisão. Assim, a amostra foi identificada finalmente como *P. cryseus*, quando verificado o seu agrupamento junto a amostra 11APA02 na árvore de 16S, que por sua vez foi identificada como tal na árvore de 28S (Figura 6). A sequência *Genbank* referente a *P. cryseus* na árvore de 16S possivelmente é produto de um erro taxonômico, uma vez que se verifica sua forte relação com *M. tustlaense* e *C. luscus* (BOTELLO e ALVAREZ, 2013).

A árvore de COI, que produziu seis agrupamentos, necessitava esclarecimento a respeito dos quatro grupos não identificados (grupos 3, 4, 5 e 6) (Figura 4). O terceiro grupo, formado pelas amostras 05,06 e 07, todas do lote CN170, foi identificado por extrapolação como pertencente ao gênero *Pseudopalaemon*, dada a presença da amostra 01CN170, que agrupou junto a *P. cryseus* na árvore de 28S (Figura 6). Ainda que outras amostras deste mesmo lote tenham se posicionado em outros grupos (09CN170, 10CN170: Gp5; 12CN170, 13CN170: Gp4), as diferenças morfométricas não permitem equívocos quanto a determinação das morfoespécies, uma vez que as diferenças entre *Pseudopalaemon* e outras possíveis identidades propostas aqui (*Palaemon* e *Euryrhynchus*) são marcantes (MELO, 2003).

O grupo 4 foi o identificado como *Palaemon* verificada a presença da amostra 01CN167 entre as sequências do grupo. Esta amostra foi identificada pelo *BLAST* como *P. ivonicus*, porém, verificada a distância *p* entre as amostras de 16S, 01CN167 apresentou menor distância em relação a *P. yuna*, 6,1%. Carvalho et al. (2014) obteve 4,1-4,3% entre *P. ivonicus* e *P. yuna*, já entre “*carteri*” e “*ivonicus/yuna*” encontrou valores de distância variando entre 10,6 e 13,7%. Portanto, o menor valor obtido aqui (6,1%) é bem superior aos obtidos por Carvalho quando verificadas as variações intraespecíficas. Isso leva a crer que, possivelmente, 01CN167 e as demais sequências do lote representam uma nova espécie de *Palaemon*. Se levado em consideração que 16S possui baixa

taxa de variação entre os marcadores mitocondriais, este valor é demasiado alto para ser considerado como produto apenas de uma divergência ao nível intraespecífico.

O grupo 6, dada a correspondência de sequências do lote AP01 em relação a *E. wrzesniowskii* tanto no *BLAST* quanto na árvore de 16S (Tabela 6, Figura 5) e ausência da mesma em 28S para as sequências 15AP01 e 17AP01 (Figura 6), foi tratado como *Euryrhynchus* Miers, 1877. Além disso, a aplicação da chave taxonômica proposta por Melo (2003) não deixa dúvidas quanto a classificação pelo menos ao nível de gênero. Dados sobre limites genéticos dentro deste gênero são praticamente inexistentes. Porém, verificada a média da distância p genética dentro do grupo (4,9% para COI), é possível inferir a existência de pelo menos duas populações de *Euryrhynchus*.

As distâncias genéticas estimadas entre as espécies de *Macrobrachium* neste estudo não divergem significativamente das encontradas por Pileggi e Mantelatto (2010), exceto entre *M. carcinus* e *M. ferreirai* (24,6%). No entanto, o modelo de evolução utilizado aqui, Kimura-2-parâmetros, foi diferente do adotado por Pileggi e Mantelatto, neste caso, o modelo de distância p não corrigida. Assim, era esperada uma diferença mínima entre os resultados da distância genética. Em relação as distâncias intraespecíficas, estas também estão de acordo com as médias verificadas por Pileggi e Mantelatto (2010). Sendo que a maior distância registrada (3,4%) em *M. amazonicum*, entre as populações de Aquidauana (Matogrosso do Sul) e as da região da Calha Norte e Tapajós, corroboram com Vergamini et al. (2011), onde se verifica uma progressiva diferenciação genética entre as populações do Pantanal em relação as populações amazônicas.

A posição de *M. nattereri* na filogenia de 28S (Figura 6) rejeitam a possibilidade de erro taxonômico, uma vez que as amostras provenientes de diferentes museus da região (*M. nattereri* 66 e *M. nattereri* 137) agruparam fortemente. *M. brasiliense* e *M. nattereri* são morfologicamente muito semelhantes e poderiam ser facilmente confundidas uma com a outra (PILEGGI et al., 2013). O dado de distância genética obtido para 28S (2,4%) confirma a grande proximidade entre *M. brasiliense* e *M. nattereri*. Além disso, pode também representar um exemplo do poder limitado de sequências de DNA na identificação de espécies que divergiram recentemente, já que nestes casos as

novas espécies irmãs ainda podem compartilhar alelos e mutações em genes de lenta evolução (TAUTZ et al., 2003).

Por outro lado, nesta filogenia foi possível verificar a formação de três grupamentos bem suportados (um de *M. nattereri*, um de *M. brasiliense* e outro com as demais amostras). Neste último grupo temos a amostra 02CN157. Esta amostra agrupou junto a *M. nattereri* na árvore de 16S (Figura 5), com uma distância de 10,5%, superior ao limiar intraespecífico de 5,1% obtido por Pileggi et al. (2010) e próximo ao interespecífico proposto pelo mesmo autor em relação a *M. brasiliense* e *M. nattereri* de 9,1%. Assim, o grupo formado por 02CN157, 05CN157, 03CN159, 06AP02 e 09AP02 na árvore de 28S pode representar uma nova espécie.

Os próximos passos deste trabalho envolvem a resolução de algumas questões não esclarecidas aqui, como a identidade do grupo 5 da árvore de COI, a confirmação de novas espécies, sinonímias ou erros taxonômicos, por meio da obtenção de mais dados moleculares em confronto com dados morfológicos.

6. CONCLUSÃO

A partir da obtenção de dados moleculares de camarões coletados no presente estudo, pode-se concluir:

-Três espécies puderam ser facilmente identificadas: *M. amazonicum* (COI); *M. brasiliense* (COI e 28S); e *P. cryseus* (28S).

- *M. brasiliense* teve seu registro ampliado na região da calha norte, para o município de Monte Alegre, especificamente.

- *P. cryseus* têm seu registro confirmado para o estado do Amazonas, município de Nhamundá. No oeste do Pará é pela primeira vez registrado na região do rio Arapiuns.

- Três identificações ao nível genérico puderam ser obtidas na árvore COI: *Euryrynchus*, *Palaemon* e *Pseudopalaemon*.

- A identificação por meio da pesquisa *BLAST* para as sequências de COI e 16S mostrou-se limitada por conta de possíveis casos de heteroplasmia e/ou pseudogenes.

- A associação de marcadores mitocondriais e nucleares permite a identificação ao menos a nível genérico de espécies ainda não sequenciadas ou descritas.

- Os valores estimados de distância genética para os diferentes marcadores permitiu inferir a ocorrência de duas novas espécies para região. Sendo, possivelmente, uma em *Macrobrachium* (16S e 28S) e outra em *Palaemon* (COI e 16S).

- *M. brasiliense* apresentou indícios de cópias nucleares na COI.

7. BIBLIOGRAFIA

ALJANABI, Salah M.; MARTINEZ, Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

ANGER, Klaus. Neotropical Macrobrachium (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. **Journal of Crustacean Biology**, v. 33, n. 2, p. 151-183, 2013.

AVISE, John C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual review of ecology and systematics**, p. 489-522, 1987.

BAUER, Raymond T. **Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the carideans**. University of Oklahoma Press, 2004.

BENSASSON, Doua et al. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends in ecology & evolution**, v. 16, n. 6, p. 314-321, 2001.

BERTHEAU, Coralie et al. Hit or miss in phylogeographic analyses: the case of the cryptic NUMTs. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 6, p. 1056-1059, 2011.

BOTELLO, Alejandro; ALVAREZ, Fernando. Phylogenetic relationships among the freshwater genera of palaemonid shrimps (Crustacea: Decapoda) from Mexico: evidence of multiple invasions?/Relaciones filogenéticas entre los géneros de camarones palaemónidos de agua dulce (Crustacea: Decapoda) de México:¿ evidencia de invasiones múltiples?. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 4, p. 773, 2013.

BUENO-SILVA, Marlus. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de biologia**, v. 34, n. 83, p. 157-163, 2012.

BUHAY, Jennifer E. "COI-like" sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n. 1, p. 96-110, 2009.

CARVALHO, Fabrício Lopes; MAGALHÃES, Célio; MANTELATTO, Fernando Luis. Molecular and morphological differentiation between two Miocene-divergent lineages of Amazonian shrimps, with the description of a new species (Decapoda, Palaemonidae, Palaemon). **ZooKeys**, n. 457, p. 79, 2014.

CHEN, Rung Tsung; TSAI, Chu Fa; TZENG, Wann Nian. 16S and 28S rDNA sequences in phylogenetic analyses of freshwater prawns (*Macrobrachium* Bate, 1868) from Taiwan. **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n. 3, p. 400-412, 2009.

COLLURA, Randall V.; STEWART, Caro-Beth. Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids. **Nature**, v. 378, n. 6556, p. 485, 1995.

DE GRAVE S, CAI Y E ANKER A (2008) Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater. **Hydrobiologia** 595: 287-293

DE GRAVE, S; FRANSEN, C.H.J.M. Carideorum catalogus: the recent species of the dendrobranchiate, stenopodidean, procarididean and caridea shrimps (Crustacea: Decapoda). **Zoologische Mededelingen**, v.85, n.9, p.195-589. 2011.

DE GRAVE, Sammy; ASHELBY, Christopher W. A re-appraisal of the systematic status of selected genera in Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). **Zootaxa**, v. 3734, n. 3, p. 331-344, 2013.

FAO (2016) <http://www.fao.org/fishery/species/2608/en>

FERREIRA, S.R. Taxonomia e padrões distribucionais dos camarões marinhos e estuarinos da família Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Caridea) do litoral brasileiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande. p. 1-169. 2009.

GARCÍA-DÁVILA, Carmen Rosa; MAGALHÃES, Célio. Revisão taxonômica dos camarões de água doce (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae, Sergestidae) da Amazônia Peruana. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 4, p. 663-686, 2003.

HEBERT, Paul DN et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HEBERT, Paul DN et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004.

HOLTHUIS, L.B. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae.

Occasional Paper of the Allan Hancock Foundation, Los Angeles, v. 12, p.1-369, 1952.

HOLTHUIS, Lipke Bijdeley. **A general revision of the Palaemonidae (crustacea Decapod Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemonidae.** 1951-1952.

HOORN, Carina. Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia: results of a palynostratigraphic study. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 105, n. 3-4, p. 267-309, 1993.

IKETANI, G. Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores Moleculares Mitocondriais em Camarões de Água Doce do Gênero Macrobrachium (Decapoda: Palaemonidae). 2012. 140 (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém.

IKETANI, Gabriel et al. Successful invasion of the Amazon Coast by the giant river prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: evidence of a reproductively viable population. **Aquatic Invasions**, v. 11, n. 3, p. 277-286, 2016.

KENSLEY, Brian Frederick; WALKER, Ilse. **Palaemonid shrimps from the Amazon Basin, Brazil (Crustacea: Decapoda: Natantia).** Smithsonian Institution Press, 1982.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KOU, Qi et al. Molecular phylogeny of the superfamily Palaemonoidea (Crustacea: Decapoda: Caridea) based on mitochondrial and nuclear DNA reveals discrepancies with the current classification. **Invertebrate systematics**, v. 27, n. 5, p. 502-514, 2013.

LEFÉBURE, T. et al. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 40, n. 2, p. 435-447, 2006.

LIBRADO, Pablo; ROZAS, Julio. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LOPEZ, Jose V. et al. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, n. 2, p. 174-190, 1994.

LOVEJOY, Nathan R.; ALBERT, James S.; CRAMPTON, William GR. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 21, n. 1, p. 5-13, 2006.

LOVEJOY, Nathan R.; BERMINGHAM, Eldredge; MARTIN, Andrew P. Marine incursion into South America. **Nature**, v. 396, n. 6710, p. 421-422, 1998.

MACIEL, Cristiana Ramalho; VALENTI, Wagner C. Biology, fisheries, and aquaculture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, v. 17, n. 2, p. 61-79, 2009.

MELO, G.A.S. Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. Manula de Identificação dos Crustácea Decápoda de Água Doce do Brasil. São Paulo: Editora Loyola, 2003 p. 289-415.

MONAGHAN, Michael T. et al. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1925-1933, 2005.

MURPHY, Nicholas P.; AUSTIN, Christopher M. Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. **Zoologica Scripta**, v. 34, n. 2, p. 187-197, 2005.

NEW, Michael B. **Farming freshwater prawns: a manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)**. Food & Agriculture Org., 2014.

NEW, Michael B. **Farming freshwater prawns: a manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)**. Food & Agriculture Org., 2002.

ŌMORI, Makoto. **The systematics, biogeography, and fishery of epipelagic shrimps of the genus *Acetes* (Crustacea, Decapoda, Sergestidae)**. Ocean Research Institute, University of Tokyo, 1976.

PALUMBI, S. R.; BENZIE, J. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 27-34, 1991.

PALUMBI, Steve. Simple fool's guide to PCR. 1991.

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

PERNA, Nicole T.; KOCHER, Thomas D. Mitochondrial DNA: molecular fossils in the nucleus. **Current Biology**, v. 6, n. 2, p. 128-129, 1996.

PILEGGI, Leonardo et al. Molecular perspective on the American transisthmian species of *Macrobrachium* (Caridea, Palaemonidae). **Zookeys**, v. 457, p. 109, 2014.

PILEGGI, Leonardo G. et al. New records and extension of the known distribution of some freshwater shrimps in Brazil. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 84, n. 2, p. 563-574, 2013.

PILEGGI, Leonardo G.; MANTELATTO, Fernando L. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. **Invertebrate Systematics**, v. 24, n. 2, p. 194-208, 2010.

PILEGGI, Leonardo G.; MANTELATTO, Fernando L. Taxonomic revision of doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 102, n. 4, p. 426-437, 2012.

PIMENTEL, FABIANA RIBEIRO. **Taxonomia dos camarões de água doce (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae, Euryrhynchidae, Sergestidae) da Amazônia Oriental: estados do Amapá e Pará**. 2003. Tese de Doutorado. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZONIA.

RAUPACH, Michael J. et al. Molecular species identification of Central European ground beetles (Coleoptera: Carabidae) using nuclear rDNA expansion segments and DNA barcodes. **Frontiers in Zoology**, v. 7, n. 26, p. 1-15, 2010.

RAUPACH, Michael J.; RADULOVICI, Adriana E. Looking back on a decade of barcoding crustaceans. **ZooKeys**, n. 539, p. 53, 2015.

- SILVA-OLIVEIRA, Gláucia C. et al. The invasive status of *Macrobrachium rosenbergii*(De Man, 1879) in Northern Brazil, with an estimation of areas at risk globally. **Aquatic Invasions**, v. 6, n. 3, p. 319-328, 2011.
- SORENSEN, Michael D.; QUINN, Thomas W. Numts: a challenge for avian systematics and population biology. **The Auk**, v. 115, n. 1, p. 214-221, 1998.
- SUNNUCKS, Paul; HALES, Dinah F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 3, p. 510-524, 1996.
- TAMURA, Koichiro et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- TAUTZ, Diethard et al. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 2, p. 70-74, 2003.
- TIEFENBACHER, Ludwig. Zur Systematik und Verbreitung der Euryrhynchinae (Decapoda, Natantia, Palaemonidae). **Crustaceana**, v. 35, n. 2, p. 177-189, 1978.
- VERGAMINI, Fernanda G. et al. Genetic variability of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, v. 80, n. 1, p. 67-83, 2011.
- VERGAMINI, Fernanda Gamper. **Análise comparativa entre populações costeiras e continentais do camarão *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)(Crustacea, Palaemonidae) por meio de dados morfológicos e moleculares**. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- WHITING, M. F. et al. The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. **Systematic Biology**, v. 46, n. 1, p. 1-68, 1997.

8. APÊNDICES

Apêndice A

Localidade	N° Campo	N° Amostral
Barragem Igarape dos perdidos, Alenquer, PA 1°32'53.98"S 54°28'19.49"O	02CN151	n=5
	03CN151	
	04CN151	
	05CN151	
	06CN151	
Igarape Apui,...,PA 1°26'12.03"S 54°27'10.14"O	02CN152	n=8
	03CN152	
	04CN152	
	06CN152	
	11CN152	
	15CN152	
	16CN152	
17CN152		
Oriximiná ? 1°38'44.88"S 55°46'41.16"O n=5	01CN157	n=5
	02CN157	
	03CN157	
	04CN157	
	05CN157	
Oriximiná II ? 1°38'32.21"S 55°36'36.99"O	01CN159	n=1
	02CN159	
	03CN159	
Mamiá, Alenquer, PA 1°22'5.26"S 55° 9'29.11"O	01CN163	n=2
	03CN163	
Igarape na fazenda da Brama, Alenquer, PA 1°36'37.95"S 54°22'0.06"O	02CN166	n=10
	03CN166	
	04CN166	
	05CN166	
	06CN166	
	07CN166	
	08CN166	
09CN166		
Terra Santa, PA 2° 0'15.17"S 56°30'54.49"O	10CN166	n=6
	14CN166	
	01CN167	

	02CN167	
	03CN167	
	04CN167	
	05CN167	
	06CN167	
	01CN170	
	02CN170	
	03CN170	
	04CN170	
	05CN170	
Igarape Cangu, Nhamundá, PA 2° 6'58.55"S	06CN170	n=12
56°43'25.17"O	07CN170	
	08CN170	
	09CN170	
	10CN170	
	12CN170	
	13CN170	
	01CN171	
Igarape Arubi, Nhamundá, PA 2° 6'31.30"S	02CN171	n=3
56°42'48.02"O	03CN171	
	01TP01	
	04TP01	
	05TP01	
	08TP01	
	09TP01	
	14TP01	
	16TP01	
	22TP01	
	24TP01	
	25TP01	
	26TP01	
Rio tapajós, Santarém, PA 2°24'30.45"S	27TP01	n=27
54°43'19.28"O	29TP01	
	30TP01	
	31TP01	
	32TP01	
	33TP01	
	36TP01	
	37TP01	
	39TP01	
	40TP01	
	M01TP01	
	M04TP01	
	M05TP01	

	M07TP01	
	M09TP01	
	M10TP01	
	01AP01	
	02AP01	
	03AP01	
	04AP01	
	06AP01	
	09AP01	
	10AP01	
	11AP01	
	12AP01	
Lago Mentai, Rio Arapiuns, Santarém, PA	13AP01	n=20
2°43'21.86"S 55°36'13.81"O	15AP01	
	16AP01	
	17AP01	
	18AP01	
	19AP01	
	20AP01	
	Msp01AP01	
	Msp02AP01	
	Msp03AP01	
	Msp04AP01	
	01AP02	
	02AP02	
	03AP02	
	04AP02	
	05AP02	
	06AP02	
	08AP02	
	09AP02	
Cachoeira do Mentai, Rio Arapiuns, Santarém,	10AP02	n=19
PA 2°39'55.19"S 55°36'22.14"O	11AP02	
	12AP02	
	13AP02	
	14AP02	
	15AP02	
	16AP02	
	17AP02	
	18AP02	
	M01AP02	
	M02AP02	
Total		108

Apêndice B

Haplótipo	GenBank	% Identidade	E-value	Bit Score	Identificação
HAP. 1	KJ155596	92.216	0.0	715	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 2	AB235287.1	85.338	1.34e-175	627	<i>Macrobrachium nipponense</i>
	AB235288.1	84.843	1.35e-170	610	<i>Macrobrachium nipponense</i>
	AB235301.1	84.729	1.74e-169	606	<i>Macrobrachium sp CD1</i>
HAP. 3	GU929542.1	100.000	0.0	1051	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 4	KM978918.1	83.824	3.79e-161	579	<i>Macrobrachium bullatum</i>
	AB235242.1	83.498	2.95e-157	566	<i>Macrobrachium asperulum</i>
	AB235240.1	83.498	2.95e-157	566	<i>Macrobrachium fukienense</i>
HAP. 5	GU929545.1	99.649	0.0	1040	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 6	GU929545.1	100.000	0.0	1051	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 7	HQ830201.1	85.025	1.32e-170	610	<i>Macrobrachium nipponense</i>
	AB235287.1	85.254	1.70e-169	606	<i>Macrobrachium nipponense</i>
	AB235263.1	85.110	2.20e-168	603	<i>Macrobrachium inflatum</i>
HAP. 8	AB235257.1	83.811	4.78e-155	558	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	KX151843.1	83.333	6.23e-149	538	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
	KX151842.1	83.333	6.23e-149	538	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
HAP. 9	GU929545.1	99.824	0.0	1046	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 10	AB235278.1	86.268	7.50e-173	617	<i>Macrobrachium latimanus</i>
	AB235277.1	86.268	7.50e-173	617	<i>Macrobrachium latimanus</i>
	AB235276.1	86.268	7.50e-173	617	<i>Macrobrachium latimanus</i>
HAP. 11	GU929545.1	99.643	0.0	1026	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 12	KM101537.1	99.267	0.0	987	<i>Macrobrachium acanthurus</i>
HAP. 13	AB235257.1	85.178	9.26e-142	514	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	KX151843.1	85.270	9.32e-137	497	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
	KX151842.1	85.270	9.32e-137	497	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
HAP. 14	GU929544.1	98.158	0.0	948	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 15	KJ155596.1	93.519	0.0	804	<i>Macrobrachium brasiliense</i>

HAP. 16	JQ805959.1	83.333	1.65e-139	507	<i>Macrobrachium olfersi</i>
	JQ805944.1	83.333	1.65e-139	507	<i>Macrobrachium olfersi</i>
	JQ805958.1	83.150	7.69e-138	501	<i>Macrobrachium olfersi</i>
HAP. 17	JQ805959.1	83.700	7.64e-143	518	<i>Macrobrachium olfersi</i>
	JQ805958.1	83.516	3.55e-141	512	<i>Macrobrachium olfersi</i>
	JQ805957.1	83.516	3.55e-141	512	<i>Macrobrachium olfersi</i>
HAP. 18	AB235242.1	83.483	5.90e-144	521	<i>Macrobrachium asperulum</i>
	AB235240.1	83.483	5.90e-144	521	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	JQ805904.1	83.636	9.88e-142	514	<i>Macrobrachium digueti</i>
HAP. 19	AB235243.1	84.050	1.63e-149	540	<i>Macrobrachium asperulum</i>
	AB235240.1	84.022	5.86e-149	538	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	AB235289.1	83.692	3.53e-146	529	<i>Macrobrachium pinguis</i>
HAP. 20	AB235289.1	84.420	4.53e-150	542	<i>Macrobrachium pinguis</i>
	AB235240.1	84.299	2.12e-143	520	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	AB235242.1	83.244	3.55e-141	512	<i>Macrobrachium asperulum</i>
HAP. 21	AB235289.1	84.755	2.09e-153	553	<i>Macrobrachium pinguis</i>
	AB235240.1	84.270	2.12e-143	520	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	AB235259.1	83.577	3.55e-141	512	<i>Macrobrachium grandimanus</i>
HAP. 22	GU929544.1	99.088	0.0	985	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 23	GU929544.1	99.453	0.0	996	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 24	AB235257.1	86.225	1.58e-169	606	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	AB235278.1	85.868	3.43e-166	595	<i>Macrobrachium latimanus</i>
	AB235277.1	85.868	3.43e-166	595	<i>Macrobrachium latimanus</i>
HAP. 25	AB235257.1	85.510	7.42e-163	584	<i>Macrobrachium latimanus</i>
	AB235278.1	84.436	7.53e-153	551	<i>Macrobrachium latimanus</i>
	AB235277.1	84.436	7.53e-153	551	<i>Macrobrachium latimanus</i>
HAP. 26	AB235257.1	85.331	3.45e-161	579	<i>Macrobrachium latimanus</i>

	KX151844.1	84.919	3.48e-156	562	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
	KX151843.1	84.919	3.48e-156	562	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
HAP. 27	GU929545.1	99.270	0.0	990	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 28	GU929499.1	98.905	0.0	979	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 29	AB235289.1	85.018	9.67e-157	564	<i>Macrobrachium pinguis</i>
	AB235240.1	83.929	7.58e-148	534	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	AB235242.1	83.750	3.53e-146	529	<i>Macrobrachium asperulum</i>
HAP. 30	AB235257.1	84.601	1.26e-150	544	<i>Macrobrachium latimanus</i>
	GU929469.1	83.303	9.95e-137	497	<i>Macrobrachium jelski</i>
	HM352484.1	83.122	9.95e-137	497	<i>Macrobrachium jelski</i>
HAP. 31	AB235257.1	84.601	1.26e-150	544	<i>Macrobrachium latimanus</i>
	GU929469.1	83.303	9.95e-137	497	<i>Macrobrachium jelski</i>
	HM352484.1	83.122	9.95e-137	497	<i>Macrobrachium jelski</i>
HAP. 32	KJ155596.1	92.963	0.0	787	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 33	KJ155596.1	93.519	0.0	802	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 34	KJ155596.1	94.063	0.0	819	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 35	KJ155596.1	94.630	0.0	835	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 36	KJ155596.1	94.630	0.0	835	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 37	KJ155596.1	92.593	0.0	776	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 38	KJ155596.1	92.579	0.0	774	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 39	AB235257.1	85.510	7.42e-163	584	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	AB235268.1	84.615	5.82e-154	555	<i>Macrobrachium lar</i>
	AB235278.1	84.436	7.53e-153	551	<i>Macrobrachium latimanus</i>
HAP. 40	AB235257.1	85.510	7.42e-163	584	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	AB235278.1	84.794	3.48e-156	562	<i>Macrobrachium latimanus</i>
	AB235277.1	84.794	3.48e-156	562	<i>Macrobrachium latimanus</i>
HAP. 41	KJ155596.1	96.481	0.0	894	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 42	KJ155596.1	95.926	0.0	878	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 43	KJ155596.1	95.370	0.0	859	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 44	KJ155596.1	95.185	0.0	854	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 45	KJ155596.1	94.853	0.0	850	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 46	KJ155596.1	95.926	0.0	876	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 47	KJ155596.1	95.556	0.0	865	<i>Macrobrachium brasiliense</i>

HAP. 48	KJ155596.1	95.370	0.0	859	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
HAP. 49	GU929545.1	99.635	0.0	1002	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 50	AB235289.1	84.936	4.50e-155	558	<i>Macrobrachium pinguis</i>
	AB235259.1	84.124	3.53e-146	529	<i>Macrobrachium grandimanus</i>
	AB235240.1	84.153	3.53e-146	529	<i>Macrobrachium fukienense</i>
HAP. 51	AB235289.1	84.755	2.09e-153	553	<i>Macrobrachium pinguis</i>
	AB235240.1	83.971	1.64e-144	523	<i>Macrobrachium fukienense</i>
	AB235242.1	83.393	7.64e-143	518	<i>Macrobrachium asperulum</i>
HAP. 52	KJ155596.1	81.852	4.44e-165	592	<i>Macrobrachium brasiliense</i>
	KY224525.1	71.739	8.50e-68	268	<i>Macrotermes sp.</i>
	KY224573.1	72.851	1.84e-64	257	
HAP. 53	GU929471.1	99.453	0.0	996	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 54	GU929474.1	99.453	0.0	996	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 55	GU929544.1	98.905	0.0	979	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 56	GU929544.1	98.175	0.0	957	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
HAP. 57	GU929544.1	99.088	0.0	985	<i>Macrobrachium amazonicum</i>