



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

DANNA MORAES ALVES

ESTUDO DA APLICABILIDADE DO DNA RIBOSSOMAL 28S NA
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE PALAEMONÍDEOS DA AMAZÔNIA
BRASILEIRA

SANTARÉM – PARÁ
ABRIL, 2020

DANNA MORAES ALVES

**ESTUDO DA APLICABILIDADE DO DNA RIBOSSOMAL 28S NA
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE PALAEMONÍDEOS DA AMAZÔNIA
BRASILEIRA**

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: Genética e Conservação da Biodiversidade.

Orientador: Prof^o Dr. Gabriel Iketani Coelho

**SANTARÉM – PARÁ
ABRIL, 2020**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

A474e Alves, Danna Moraes
Estudo da aplicabilidade do DNA ribossomal 28S na identificação molecular de palaemonídeos da Amazônia Brasileira. / Danna Moraes Alves. – Santarém, 2020.
51 p. : il.
Inclui bibliografias.

Orientador: Gabriel Iketani Coelho
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia.

1. Palaemonidae. 2. 28S. 3. Identificação molecular. I. Coelho, Gabriel Iketani , *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 595.388

Bibliotecária - Documentalista: Renata Ferreira – CRB/2 1440

DANNA MORAES ALVES

**ESTUDO DA APLICABILIDADE DO DNA RIBOSSOMAL 28S NA
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE PALAEMONÍDEOS DA AMAZÔNIA
BRASILEIRA**

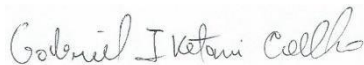
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia – PPGRNA, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais; Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA.

Área de concentração: Genética e Conservação da Biodiversidade.

Conceito:8,5

Data de aprovação: Santarém, 30 de abril de 2020.

Banca examinadora:



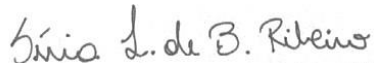
Prof. Dr. Gabriel Iketani Coelho – Orientador.
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA.



Prof^a Dra. Ivana Barbosa Veneza – Examinadora externa.
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA.



Prof. Dr. Luciano Jensen Vaz – Examinador externo.
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA.



Prof^a Dra. Siria Lisandra de Barcelos Ribeiro – Examinadora interna. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA

DEDICATÓRIA

A minha mãe Elimar Batista,

Meu irmão Denis e meu sobrinho Dário Heitor,

E ao Pedro e aos meus filhos e netos felinos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em sua infinita bondade por estar sempre presente em minha vida, a fé que carrego comigo me fez acreditar, mesmo em momentos que achei que não conseguiria, que todo o esforço seria recompensado. Por colocar pessoas em minha vida que me acompanharam e estiveram ao meu lado em momentos difíceis não permitindo que eu fraquejasse, que compartilharam as alegrias e minhas pequenas vitórias. Sou grata a ti senhor pela família e amigos que tenho, a saúde e por tua proteção.

Ao meu orientador, professor doutor Gabriel Iketani por acreditar e confiar em mim, pelos aprendizados, pela paciência, pelas conversas divertidas e também pelas sérias. Sempre lembrarei dos ensinamentos e da oportunidade de conhecer o dia a dia de um pesquisador. Agradeço pelo carinho e gentileza que teve comigo, foram inúmeros aprendizados que levarei para a vida toda. Obrigada pela oportunidade.

E a mudança que eu fiz no mestrado, agora eu sei que eu precisava disso e nem sabia. Aos meus companheiros e amigos do Laboratório de Educação e Evolução – Prof^o Horácio Schneider – LEDEVO: Teozinho, Elton, Luís, e em especial a incrível Kamila, a gentil Ellen e a elegante Cássia que foram sempre a minha dose de alegria e parceria diária, sem vocês eu nem sei como seria. Obrigada por tudo, meninas. Um agradecimento mais que especial a Professora Luciana Pimentel, que ao lado do professor Gabriel coordenam o LEDEVO, que me ajudou, me ensinou e teve tanta paciência comigo. Sou grata por tudo. Eu vou sempre poder dizer com orgulho que vi esse laboratório nascer e contribuí muito para o seu crescimento.

Pelas pessoas que passaram pela minha vida nesses dois anos, que me ensinaram muito: Illana, Ana, Bruna, Ricardo e Ivana. A Sandra por sempre autoclavar as ponteiras, a moça da guarita sempre tão gentil e as moças da limpeza.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de financiamento 001, pela concessão da bolsa de mestrado. Agradeço também aos professores da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia – PPGRNA e aos companheiros da turma 2018, em especial a Karen e Enerlisson, foi incrível e esclarecedora a experiência. A secretária do programa Rose Gleice eu quero dizer muito obrigada pela atenção de sempre.

Finalmente, e não menos importante, à minha mãe, Elimar Batista de Moraes, a minha razão de viver. A responsável pelo que eu sou hoje, que fez sacrifícios para que eu pudesse estudar e ter todas as condições necessárias para seguir até o fim. Ao meu irmão, Denis Moraes, que tanto fez por mim. O cuidado que sempre teve comigo, mesmo sendo mais novo sempre

foi meu protetor, meu ombro amigo, minha voz da consciência. Sua sinceridade e seus conselhos sempre me fizeram enxergar as coisas com mais clareza. Por me dar a alegria de ser tia.

Ao meu pai, Walker Alves, mesmo estando distante eu sou grata por tudo, pelas conversas divertidas, pelos conselhos e pelo carinho. Eu sei que sempre acreditou, rezou e torceu por mim. A minha família toda, avós, avôs, tios, tias, primos e primas, eu agradeço pelas palavras de apoio.

Aos meus amigos de longa data, que estiveram nos momentos felizes e também ouviram todas as minhas lamentações, mas estavam sempre comigo dando todo o apoio e que entenderam minha ausência em determinadas ocasiões: Ana Flávia, Daiane Rodrigues, Karla Santos, Elvis Leonardo e minha amiga e comadre Edneia Santos.

Ao meu amigo e noivo Pedro Ives eu agradeço pelo companheirismo e compreensão, pelas palavras de incentivo e por cuidar tão bem de mim e dos nossos filhos Bob, Pretinha, Millú e Ninna, e nosso netinhos Otto e Lia.

Meu muito obrigada a todos!

EPÍGRAFE

Ainda quando curumim
Ouvi do grande cacique
(Ipiaká Koran...Guerreiros!)
É chegada a hora
Botai o corpo no chão
Elevai teu espírito
Levantai as bordunas
Fazeis a farinha sagrada
Para a longa caminhada

Em Busca da Terra Sem Males – Ronaldo Barbosa

A vontade de rir é grande, mas a de chorar é maior

Juão Paulo

RESUMO

Os camarões carídeos compõem um grupo muito diverso dentro dos crustáceos decápodes. Atualmente, são reconhecidas 39 famílias, com destaque para a família Palaemonidae. Na América do Sul, os camarões palaemonídeos são a família mais especiosa, com ampla distribuição, e na Amazônia brasileira são registrados a presença de 33 espécies, com destaque para os gêneros *Macrobrachium*, *Palaemon* e *Pseudopalaemon*. A literatura para análise morfológica e taxonômica de palaemonídeos apresenta-se atualizada e bem estruturada, no entanto, esta metodologia de identificação é, em certos casos, complexa devido à sua grande homogeneidade morfológica interespecífica associado a uma considerável variação morfológica intraespecífica. No presente trabalho objetivamos avaliar a aplicabilidade de uma região do DNA ribossomal (rDNA) 28S como ferramenta para identificação molecular de camarões da família Palaemonidae. A composição do banco de dados foi através de coletas de camarões na proximidade do município de Santarém, no oeste do Estado do Pará, onde situase a confluência do rio Amazonas e rio Tapajós, e a incorporação de amostras de espécimes depositadas em três museus da região Norte. As sequências foram organizadas da seguinte forma: (1) banco de dados com 47 sequências de museu e uma árvore filogenética foi construída através do método de agrupamento de vizinhos (NJ), baseada em distância genética simples (p); (2) banco de dados com 15 sequências de museu e 27 sequências de haplótipos de amostras de igarapés e três métodos de delimitação de espécies foram aplicados: ABGD, GMYC e PTP. Com os agrupamentos fortemente suportados, a metodologia empregada permitiu uma análise por meio da correspondência entre o posicionamento das sequências em diferentes métodos de delimitação, onde foram identificadas 20 espécies pela abordagem ABGD e GMYC e 30 espécies pelo método PTP, inferimos a identificação taxonômica de 16 haplótipos e uma amostra de museu, corrigimos a identificação de seis amostras de museu, e 11 haplótipos foram identificados somente a nível de gênero. Os resultados dos dados moleculares confirmam a aplicabilidade do gene nuclear 28S como marcador molecular para identificação de espécies.

Palavras-chave: Palaemonidae. 28S. Identificação molecular.

ABSTRACT

Carida shrimp make up a very diverse group within decapod crustaceans. Currently, 39 families are recognized, with emphasis on the family Palaemonidae. In South America, palaemonid shrimp are the most speciose family with wide distribution, and in the Brazilian Amazon the presence of 33 species is registered, with emphasis on the genera *Macrobrachium*, *Palaemon* and *Pseudopalaemon*. The literature for morphological and taxonomic analysis of palaemonids is updated and well structured, however, this identification methodology is, in certain cases, complex due to its great interspecific morphological homogeneity associated with considerable intraspecific morphological variation. In the present work we aim to evaluate the applicability of a 28S ribosomal DNA (rDNA) region as a tool for molecular identification of shrimp in the Palaemonidae family. The composition of the database was through the collection of shrimp in the vicinity of the municipality of Santarém, in the west of the State of Pará, where the confluence of the Amazon River and the Tapajós River is located, and the incorporation of samples specimens deposited in three museums in the northern region. The sequences were organized as follows: (1) a database with 47 museum sequences and a phylogenetic tree was built using Neighbor Joining method (NJ), based on simple genetic distance (p); (2) database with 15 museum sequences and 27 streams of haplotype samples from streams and three species delimitation methods were applied: ABGD, GMYC and PTP. With the clusters strongly supported, the methodology used allowed an analysis by means of the correspondence between the positioning of the sequences in different delimitation methods, where 20 species were identified by the ABGD and GMYC approach and 30 species by the PTP method, we infer the taxonomic identification of 16 haplotypes and a museum sample, we corrected the identification of six museum samples, and 11 haplotypes were identified only at the gender level. The results of the molecular data confirm the applicability of the nuclear 28S gene as a molecular marker for species identification.

Key words: Palaemonidae. 28S. Molecular identification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Mapa de localização dos pontos de coletas dos espécimes da família Palaemonidae utilizados no trabalho..... 23
- Figura 2:** Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (NJ) para o gene rDNA 28S, baseada na distância p para espécies do gênero *Macrobrachium*, *Palaemon*, *Pseudopalaemon* depositadas nos museus IEPA: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá; INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; MPEG: Museu Paraense Emílio Goeldi. Os números em cada ramificação indicam os valores de bootstrap (mostrado apenas valores superiores a 50). Nomes evidenciados em vermelho são referentes a possíveis erros de identificação.....30
- Figura 3:** Árvore ultramétrica para o gene rDNA 28S com resultados das análises de delimitação de espécies. Barras verticais correspondem a análises distintas evidenciando as diferentes espécies. Os pontos acima dos ramos representam valores de probabilidade posterior (>0,9). Em preto: ABGD; Em vermelho: GMYC – yule; Em verde: GMYC – coalescent constant; Em azul: PTP..... 32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Lista taxonômica das espécies de camarões palaemonídeos que naturalmente se distribuem pela Amazônia brasileira. Referências: 1. Kensley e Walker (1982); 2. Barros e Pimentel (2001); 3. Melo (2003); 4. Magalhães e Pereira (2007); 5. Mantelatto et al., (2008); 6. Ferreira et al., (2010); 7. Pileggi e Mantelatto (2010); 8. Pileggi et al., (2013); 9. Carvalho et al., (2014); 10. Pimentel e Magalhães (2014); 11. Carvalho et al., (2017); 12. Santos et al., (2018); 13. Magalhães et al., (2018); 14. Carvalho et al., (2019). 14
- Tabela 2:** Locais de coleta dos camarões com cada código atribuído e número de espécimes coletados em cada ponto.22
- Tabela 3:** Listas das espécies de camarões da Família Palaemonidae depositadas em museus utilizadas no trabalho, com informações sobre taxonomia, museu de origem, data e local de coleta. IEPA: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá; INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; MPEG: Museu Paraense Emílio Goeldi. 24
- Tabela 4:** Lista das amostras já sequenciadas e identificadas para o gene 28S utilizadas para construção da árvore filogenética. 27
- Tabela 5:** Listas dos exemplares de museu com identificação molecular com o gene 28S e correção das amostras com identificação morfológica. IEPA: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá; MPEG: Museu Paraense Emílio Goeldi. 30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Crustáceos: camarões palaemonídeos	13
1.2	Gênero <i>Macrobrachium</i>	15
1.3	Gênero <i>Palaemon</i>	16
1.4	Gênero <i>Pseudopalaemon</i>	16
1.5	Identificação molecular	17
1.6	DNA ribossomal 28S	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral:	20
2.2	Objetivos específicos:	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Obtenção dos espécimes	21
3.2	Dados moleculares	24
3.3	Análise dos dados	25
3.3.1	Banco de dados com sequências de museu	25
3.3.2	Banco de dados com sequências de museu e igarapés	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Análise molecular dos exemplares de museu	28
4.2	Análise molecular de amostras de igarapés e delimitação de espécies	30
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Crustáceos: camarões palaemonídeos

Os camarões carídeos compõem um grupo muito diverso dentro dos crustáceos decápodes (DE GRAVE E FRANSEN 2011). Atualmente, são reconhecidas 39 famílias, com destaque para a família Palaemonidae Rafinesque, 1815 pela capacidade de seus representantes de colonizar diferentes ambientes aquáticos, distribuindo-se por todos os continentes em regiões tropicais e temperadas, ocorrendo em região marinha, estuarina ou dulcícola (DE GRAVE et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2016). Mundialmente, é composta por, aproximadamente, 1000 espécies alocadas em 130 gêneros (DE GRAVE E FRANSEN 2011; MAGALHÃES et al., 2016; MANTELATTO et al., 2016).

Na América do Sul, os camarões palaemonídeos são a família mais especiosa, com ampla distribuição e comumente são encontrados em habitats de baixa altitude (até 250 metros acima do nível do mar) nas drenagens dos oceanos Atlântico e Pacífico (MAGALHÃES et al., 2016). No Brasil, seus membros estão representados por 19 gêneros e 65 espécies (MELO, 2003; FERREIRA et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2013; PILEGGI E MANTELATTO 2010; 2012; PIMENTEL E MAGALHÃES 2014; SANTOS et al., 2018; CARVALHO et al., 2014; 2017; 2019). Destes, 15 gêneros são exclusivamente marinhos, dois gêneros são estritamente dulcícolas, um gênero ocorre em ambientes de água doce e estuarino e um gênero ocorre nos três ambientes (MELO, 2003; FERREIRA et al., 2010; DE GRAVE E ASHELBY 2013).

Na Bacia Amazônica brasileira, a diversidade de camarões palaemonídeos é bem conhecida devido a análises taxonômicas iniciadas na década de 50 por Holthuis e colaboradores (1951; 1952). Atualmente, é registrada a presença de 33 espécies (incluindo duas espécies exóticas) alocadas em nove gêneros, entre espécies costeiras do Atlântico e espécies continentais. Com destaque para os gêneros *Macrobrachium* Bate, 1868, *Palaemon* Weber, 1795 e *Pseudopalaemon* Sollaud, 1911 com maior número de espécies, respectivamente (KENSLEY E WALKER 1982; BARROS E PIMENTEL 2001; IKETANI et al., 2011; MACIEL et al., 2011; PILEGGI et al., 2013; PIMENTEL E MAGALHÃES 2014; SANTOS et al., 2018; CARVALHO et al., 2014; 2019). A tabela 1 lista as espécies que já foram reportadas para a Bacia Amazônica e seus respectivos habitats.

Tabela 1: Lista taxonômica das espécies de camarões palaemonídeos que naturalmente se distribuem pela Amazônia brasileira. Referências: 1. Kensley e Walker (1982); 2. Barros e Pimentel (2001); 3. Melo (2003); 4. Magalhães e Pereira (2007); 5. Mantelatto et al., (2008); 6. Ferreira et al., (2010); 7. Pileggi e Mantelatto (2010); 8. Pileggi et al., (2013); 9. Carvalho et al., (2014); 10. Pimentel e Magalhães (2014); 11. Carvalho et al., (2017); 12. Santos et al., (2018); 13. Magalhães et al., (2018); 14. Carvalho et al., (2019).

Táxon	Habitat	Referências
Gênero <i>Macrobrachium</i> Bate, 1868		
<i>Macrobrachium acanthurus</i> Wiegmann, 1836	Dulcícola e Estuarino	2;6;7;10
<i>Macrobrachium amazonicum</i> (Heller,1862)	Dulcícola e Estuarino	1;2;4;7;8;10;12;13
<i>Macrobrachium aracamuni</i> Rodríguez, 1982	Dulcícola	5;7
<i>Macrobrachium brasiliense</i> (Heller, 1862)	Dulcícola	4;8;10;12;13
<i>Macrobrachium carcinus</i> (Linnaeus, 1758)	Dulcícola e Estuarino	2;7;10
<i>Macrobrachium depressimanum</i> Pereira, 1993	Dulcícola	7;8
<i>Macrobrachium ferreirai</i> Kensley e Walker, 1982	Dulcícola	1;4;7;8;12
<i>Macrobrachium inpa</i> Kensley e Walker, 1982	Dulcícola	1;4;7
<i>Macrobrachium jelskii</i> (Miers, 1877)	Estritamente dulcícola	1;2;4;8;10;12;13
<i>Macrobrachium nattereri</i> (Heller, 1862)	Dulcícola	1;2;4;7;8;10;12
<i>Macrobrachium olfersi</i> (Wiegmann, 1836)	Dulcícola e Estuarino	6;10
<i>Macrobrachium surinamicum</i> Holthuis, 1948	Estuarino	7;8;10;13
Gênero <i>Palaemon</i> Weber, 1795		
<i>Palaemon carteri</i> Gordon, 1935	Estritamente dulcícola	1;2;4;8;9;10;14
<i>Palaemon ivonicus</i> Holthuis, 1950	Estritamente dulcícola	8;9;13;14
<i>Palaemon mercedae</i> Pereira, 1986	Estritamente dulcícola	4;8;10;11;14
<i>Palaemon octaviae</i> (Chace, 1972)	Marinho e estuarino	11;14
<i>Palaemon pandaliformis</i> (Stimpson, 1871)	Estuarino e dulcícola	2;10;14
<i>Palaemon paivai</i> Fausto-Filho, 1967	Marinho e Estuarino	2;11;14
<i>Palaemon yuna</i> Carvalho, Magalhães e Mantelatto, 2014	Estritamente dulcícola	9;12;14
Gênero <i>Pseudopalaemon</i> Sollaud, 1911		
<i>Pseudopalaemon amazonensis</i> Ramos-Porto, 1979	Estritamente dulcícola	1;2;10
<i>Pseudopalaemon chryseus</i> Kensley e Walker, 1982	Estritamente dulcícola	1; 4;8;10;11;12;13
<i>Pseudopalaemon gouldingi</i> Kensley e Walker, 1982	Estritamente dulcícola	1; 4; 12
<i>Pseudopalaemon nigramnis</i> Kensley e Walker, 1982	Estritamente dulcícola	1; 4

Fonte: Elaborada pelo próprio Autor.

1.2 Gênero *Macrobrachium*

Este táxon abrange espécies com considerável plasticidade fenotípica, habitando diferentes tipos de corpos hídricos (igarapés, lagos e rios) sob as diversas condições ambientais de seus diferentes habitats (TADDEI et al., 2017). No Brasil, este táxon é representado por 20 espécies, e na Amazônia podem ser encontrados 14, incluindo duas espécies exóticas (*M. rosenbergii* De Man, 1879 e *M. equidens* Dana, 1852) (MAGALHÃES et al., 2005; IKETANI et al., 2011; MACIEL et al., 2011; PILEGGI E MANTELATTO 2012; ROSSI et al., 2020), com ampla distribuição nesta região. A importância deste grupo compreende aspectos ecológicos como componentes da cadeia trófica, e aspectos econômicos com extensa aplicação na pesca artesanal, na aquicultura, no setor de aquarismo, e é fonte de proteína animal (OTTONI et al., 2011).

O alto conservadorismo interespecífico e uma considerável variabilidade intraespecífica pode levantar debate sobre estudos sistemáticos, gerando dúvidas sobre o status taxonômico de algumas espécies (PILEGGI E MANTELATTO 2010; 2012; VERGAMINI et al., 2011; ROSSI E MANTELATTO, 2013; GUERRA et al., 2014; VERA-SILVA et al., 2016; 2017). Diversos trabalhos buscam descrever caracteres singulares na tentativa de minimizar os erros de identificação de espécies (FERREIRA et al., 2010; PILEGGI E MANTELATTO 2012; SANTOS et al., 2018). Recentemente, Vera-Silva e colaboradores (2017) redescreveram alguns caracteres de *M. jelskii* que permitam uma diferenciação mais clara dessa espécie quando comparada com outras espécies com alta similaridade morfológica na fase juvenil, como *M. amazonicum* e *M. acanthurus*.

As características hidrológicas e ambientais das diferentes Bacias da região Amazônica contribuem para a diversidade da fauna decápode (MAGALHÃES et al., 2018), e podem favorecer a divergência genética entre populações de uma mesma espécie. Vergamini et al. (2011) utilizando os marcadores mitocondriais rRNA 16S e citocromo oxidase C subunidade I (COI) demonstraram estruturação genética entre populações de *M. amazonicum* em três linhagens distintas: Região Hidrográfica (RH) da Amazônia (continental), RH da bacia dos rios Paraná/Paraguai e região costeira do Norte e Nordeste do Brasil. Iketani et al. (no prelo) empregando o marcador COI também observaram resultado similar para *M. amazonicum*, denominando as três linhagens como: população continental da Amazônia, população costeira da Amazônia e população continental do Pantanal. Trabalhando com diferentes populações de *M. jelskii*, Vera-Silva e colaboradores (2016), empregando os marcadores 16S e COI, observaram que a filogenia recuperada demonstrava a formação de dois clados, denominados de ‘clado amazônico’ e ‘clado costeiro’.

A heterogeneidade ambiental da região Amazônica contribui para a origem de linhagens, e ainda que algumas espécies tenham capacidade de dispersão ou possam ser transferidas para outros pontos por ação humana, as barreiras físicas, geográficas e processos ecológicos podem auxiliar

processos de especiação, e, conseqüentemente, gerar implicações taxonômicas com identificações morfológicas inconsistentes (VERA-SILVA et al., 2016).

1.3 Gênero *Palaemon*

Este gênero é considerado o terceiro maior grupo dentro da família Palaemonidae, com recente incorporação ao gênero com a sinonimização de três outros: *Coutierella* Sollaud, 1914, *Exopalaemon* Holthius, 1950 e *Palaemonetes* Heller, 1869 (ASHELBY et al., 2012; DE GRAVE E ASHELBY 2013). No território brasileiro são reportadas nove espécies ocorrendo em diferentes habitats (CARVALHO et al., 2014; 2019). Destas, sete são registradas na região Amazônica (CARVALHO et al., 2014).

A delimitação de espécies dentro do gênero é difícil devido ao seu pequeno tamanho e a baixa diferenciação fenotípica interespecífica complica a análise taxonômica baseada somente em caracteres morfológicos (GARCIA-DÁVILA et al., 2005). Carvalho et al. (2019) dissertam que apesar da diferenciação morfológica externa sutil entre *P. carteri*, *P. ivonicus* e *P. yuna*, há sobreposição de caracteres quando muitas amostras são analisadas. E ainda, aspectos ecológicos podem ser usados como informações complementares na diferenciação das espécies, uma vez que *P. ivonicus*, utilizados na análise, eram oriundos de ambientes de águas brancas e *P. yuna* é encontrado em ambientes de água preta da Amazônia Central como também observado por Santos et al. (2018), já ambientes de águas claras podem abrigar populações das duas espécies, como foi observado no trabalho de Magalhães e colaboradores (2018) no rio Xingu para *P. ivonicus*.

Baseado em análises moleculares, Carvalho et al. (2017) observaram a formação de estruturação genética para o gênero *Palaemon*, uma linhagem (informalmente) chamada de "*Alaocaris*" composto por *P. carteri*, *P. ivonicus*, *P. pandaliformis* e *P. yuna* e uma linhagem "*Palaemon*" formado por *P. mercedae*, *P. octaviae*, e *P. paivai* (aqui citadas apenas as espécies que ocorrem na Bacia Amazônica, para maiores detalhes ver Carvalho et al., 2017). E ainda, Carvalho et al. (2019) relataram estruturação genética em *P. carteri* e *P. pandaliformis*. Populações Amazônicas de *P. carteri* do Amapá, do Pará e da Guiana Francesa se separaram em três grupos, e *P. pandaliformis* formou um grupo brasileiro com espécimes do Pará a Santa Catarina e outro grupo com espécimes da região do Caribe. Os autores especularam que caracteres internos e aspectos biológicos possam ser utilizados para propor novos táxons.

1.4 Gênero *Pseudopalaemon*

As espécies desse gênero são de pequeno porte, chegando até 50 mm, com áreas de endemismo na América do Sul, com maior distribuição na Bacia Amazônica onde quatro das cinco espécies conhecidas são registradas (KENSLEY E WALKER 1982; BARROS E PIMENTEL 2001; MAGALHÃES E PEREIRA 2007; PILEGGI et al., 2013; PIMENTEL E MAGALHÃES 2014; CARVALHO et al., 2017; SANTOS et al., 2018; MAGALHÃES et al., 2018). Estão

fortemente associadas a sistemas aquáticos presentes na região Amazônica (rios de águas claras, brancas e pretas) em microhabitats de áreas de várzeas, serapilheiras submersas e macrófitas aquáticas (MAGALHÃES 1987; MAGALHÃES E PIMENTEL 2014).

Os principais trabalhos com este grupo são voltados para taxonomia, composição e distribuição faunística (KENSLEY E WALKER 1982; PIMENTEL E MAGALHÃES 2014), desenvolvimento larval (MAGALHÃES, 1986; MAGALHÃES E MEDEIROS, 1998), biologia reprodutiva (DE OLIVEIRA et al., 2017) e dinâmica populacional (WALKER E FERREIRA, 1985), com destaque para *Pseudopalaemon amazonensis* e *Ps. chryseus* que são as espécies mais distribuídas e, conseqüentemente, as mais citadas na literatura. Magalhães et al. (2018) analisando espécimes coletados no médio e alto rio Xingú, observaram indivíduos com semelhanças a *Ps. chryseus*, entretanto não foi possível atribuir a qualquer espécie do gênero, discutindo a possibilidade de uma nova espécie para esta bacia.

Quanto a dados moleculares para este gênero, os estudos são escassos, com deposição de seqüências nucleotídicas no GenBank apenas para a espécie *Ps. chryseus*, com os trabalhos de Botello e Alvarez (2013) apresentando uma seqüência parcial do gene mitocondrial 16S rRNA, e Carvalho et al. (2017) com seqüências parciais únicas dos genes mitocondrial 16S rRNA, nucleares Histona H3 e 18S rRNA. Nestes dois trabalhos a seqüência de *Ps. chryseus* agrupou dentro de clados formados por espécies do gênero *Macrobrachium*.

1.5 Identificação molecular

A literatura para análise morfológica e taxonômica de palaemonídeos apresenta-se atualizada e bem estruturada com trabalhos de Pileggi e Mantelatto (2012) para *M. olfersii* e *M. potiuna*; Vera-Silva et al. (2017) para *M. jelskii*; Carvalho et al. (2014; 2017; 2019) para o gênero *Palaemon* e Santos et al., (2018) para os gêneros *Macrobrachium*, *Palaemon* e *Pseudopalaemon* coletados em igarapés do Estado de Roraima. No entanto, esta metodologia de identificação é, em certos casos, complexa devido ao seu grande conservadorismo morfológico interespecífico associado a uma considerável variação morfológica intraespecífica, aliada a diferenças nos habitats ocupados, estratégias comportamentais e de reprodução (VERA-SILVA et al., 2017).

A aplicação de técnicas moleculares contribui para o avanço em estudos de delimitação de espécies e relações filogenéticas de camarões palaemonídeos, principalmente com a utilização do fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase C subunidade I (COI), popularizado através da iniciativa do *DNA barcode* (HEBERT et al., 2003). Diversas pesquisas comprovaram a aplicabilidade deste marcador para delimitar crustáceos decápodes e, até certo ponto, para construção de filogenias (LEFÉBURE et al., 2006; LIU et al., 2007; PILEGGI E MANTELATTO, 2010; MATZEN DA SILVA et al., 2011; VERGAMINI et al., 2011; ROBE et al., 2012; PILEGGI et al., 2014; VERA-SILVA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017; JORDÁN-

HERNÁNDEZ et al., 2019). Porém, as limitações deste marcador podem levar a erros de superestimação do número de espécies devido a presença de heteroplasmia e pseudogenes (LOPEZ et al., 1994; SORENSON E QUINN, 1998; BENSASSON et al., 2001), com registros de ocorrência em crustáceos decápodes (ZHANG E HEWITT et al., 1997; WILLIAMS E KNOWLTON, 2001; NGUYEN et al., 2002; SONG et al., 2008; BUHAY, 2009; MATZEN DA SILVA et al., 2011; BAEZA E FUENTES, 2013; MACHIDA E LIN, 2017), e em palaemonídeos do gênero *Macrobrachium*: *M. ferreirai* (ROBE et al., 2012), *M. jelskii* (MORAES, 2017), *M. brasiliense* (ÁVILA, 2017) e *M. amazonicum* (IKETANI, et al., no prelo).

Atualmente, a utilização em combinação de mais de um marcador é realizada para uma análise de dados mais robusta, empregando, geralmente, marcadores mitocondriais concomitantemente com nucleares, como, por exemplo, o trabalho de Wowor e colaboradores (2009), que realizaram uma abordagem multilocus (genes mitocondriais 16S e COI, e genes nucleares rDNA 18S, 28S, Histona H3) para gênero *Macrobrachium* de vários pontos da Ásia, determinando relações filogenéticas a partir de construção de árvores gênicas, conseguindo relacionar a origem das espécies de acordo com seu habitat e ciclo de vida. Como ferramenta para identificação de espécies, os marcadores mitocondriais possuem certa preferência por apresentar boa resolução, com fixação mais rápida de mutações devido, em parte, a mecanismos de reparo durante a replicação serem menos rigorosos, levando a uma alta taxa de substituições (SONNENBERG et al., 2007), no entanto, marcadores mitocondriais nem sempre refletem a história completa de uma espécie, tendo como principal argumento a herança uniparental (BALLARD E WHITLOCK, 2004). A aplicação de marcadores nucleares, em conjunto ou separado, pode ser uma ferramenta para complementação em estudos de determinação de espécies e relações filogenéticas (SONNENBERG et al., 2007). No presente trabalho avaliamos a utilização de uma região do DNA ribossomal (rDNA) 28S como ferramenta para identificação molecular de camarões da família Palaemonidae.

1.6 DNA ribossomal 28S

O DNA ribossomal nuclear (rDNA) é composto por uma grande família multigênica dos genomas de eucariotos, consistindo em várias cópias repetitivas (em tandem) (HILLIS E DIXON, 1991; COLEMAN, 2003). A unidade ribossômica é organizada por genes codificadores 18S, 5.8S e 28S separados por dois espaçadores internos (ITS – 1 e ITS – 2). É descrito que o rDNA sofre um processo evolutivo dependente das suas sequências, possibilitando que todas as unidades de repetição sejam idênticas, mantendo um alto grau de similaridade dentro da família gênica por mecanismos como conversão gênica e permuta desigual entre unidades de repetição (HILLIS E DIXON, 1991; BALDWIN et al., 1995). Este processo pode gerar mutações de ganho ou perda de repetições e polimorfismos de inserçãodeleção dentro e entre populações (GRAUR E LI, 2000),

como resultado, a maioria dos genes de rDNA provou ser um marcador útil para inferências filogenéticas em nível de espécie, gênero e família (VAN WORMHOUDT et al., 2019).

A utilização rDNA 28S em diversos estudos com crustáceos demonstrou potencial para análises filogenéticas (CRANDALL et al., 2000; PORTER et al., 2005; WOWOR et al., 2009; CHEN et al., 2009; KOU et al., 2013). Chen et al. (2009), ao comparar as topologias obtidas a partir dos marcadores mtDNA 16S e rDNA 28S para espécies de *Macrobrachium* originárias de Taiwan, indicaram que as análises das árvores filogenéticas derivadas do 28S tiveram uma resolução topológica consideravelmente mais alta do que a do 16S. A aplicação do marcador nuclear para identificação de espécies já foi evidenciado por Castelin e colaboradores (2017) que, juntamente com o gene mtDNA 16S, investigaram camarões do gênero *Macrobrachium* do Indo-Pacífico e relataram que os animais que eram chamados de *M. australe* pertenciam a duas espécies: *M. australe* e uma espécie críptica identificada como *M. ustulatum*, que era considerada sinônimo júnior. E por Bloom et al. (2019), que efetuaram uma análise multilocus (COI, 16S, 28S e GAPDH) com lagostim *Faxonius* do rio Tennessee e Kentucky nos Estados Unidos da América, onde o conjunto de dados de 28S conseguiu recuperar a filogenia com clados bem suportados e contribuiu para a descrição de uma nova espécie batizada de *Faxonius bellator*.

Uma vez que, uma avaliação da utilidade do rDNA 28S para identificação molecular de camarões de água doce da Amazônia brasileira pertencentes a família Palaemonidae ainda não foi realizada, até o momento, e acreditando que a identificação de espécies através deste marcador pode apoiar o gene da citocromo oxidase C subunidade I (COI), amplamente utilizado, permitindo maior confiança na delimitação de espécies, removendo o viés inerente ao uso de um único gene mitocondrial para decisões sobre limites de espécies (SABIA et al., 2017). E ainda, estudos que investiguem a utilidade de marcadores alternativos e confiáveis podem contribuir para esclarecer aspectos relacionados a identificação correta dos organismos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a aplicabilidade do fragmento do rDNA 28S como ferramenta de identificação molecular em camarões palaemonídeos da Amazônia brasileira.

2.2 Objetivos específicos:

- Construir um banco de dados a partir de amostras depositadas nas principais coleções dos museus científicos da região;
- Comparar a identificação morfológica de amostras depositadas nos principais museus da Amazônia brasileira com a identificação molecular através do rDNA 28S;
- Estimar os níveis de variabilidade genética intra e interespecífica para o marcador avaliado;
- Investigar limites moleculares intra e interespecíficos das relações filogenéticas dos três principais gêneros pertencentes a família Palaemonidae;
- Investigar o desempenho de diferentes metodologias de delimitação de espécies usando sequências de rDNA 28S.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos espécimes

No presente trabalho, a composição do banco de dados foi formada a partir de amostras coletadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Educação e Evolução Prof^o Horácio Schneider – LEDEVO da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, e por amostras de camarões depositadas nos principais museus da região norte.

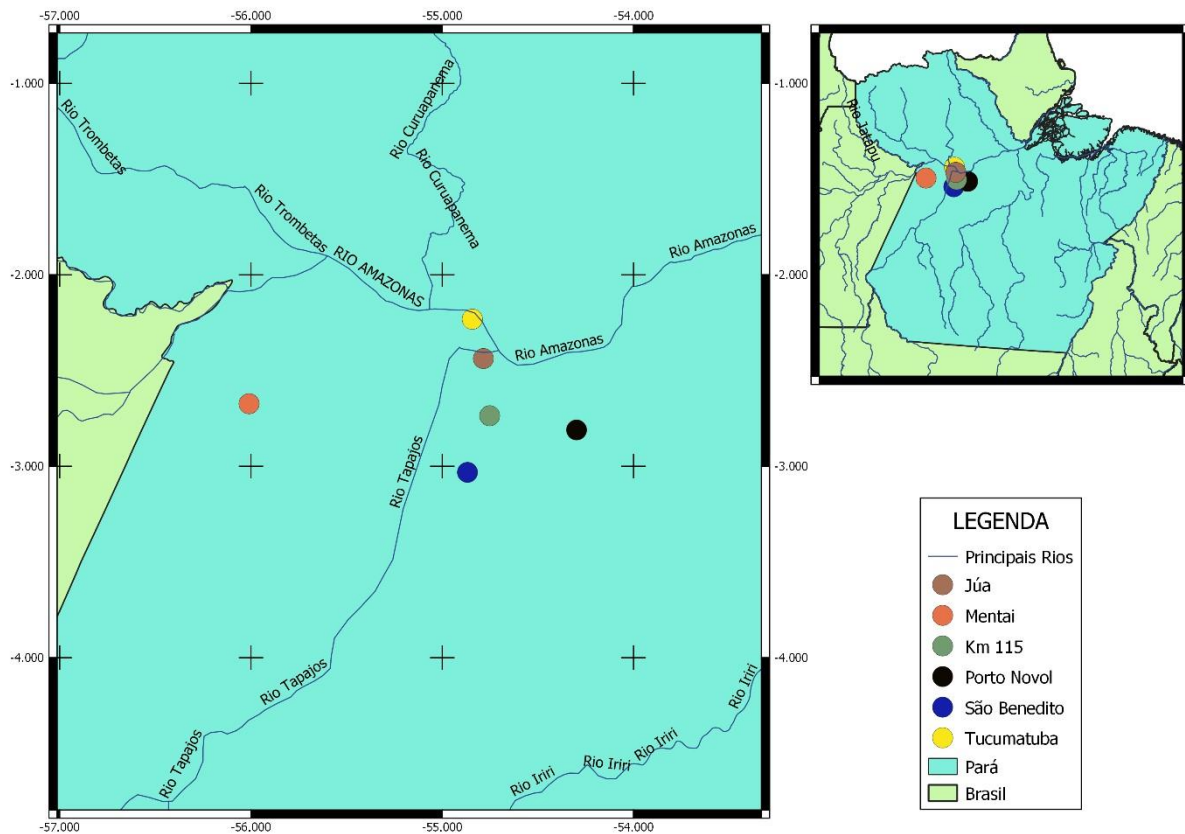
As coletas de camarões ocorreram na proximidade do município de Santarém, no oeste do Estado do Pará, onde situa-se a confluência do rio Amazonas e rio Tapajós. O ponto de coleta no rio Amazonas foi o igarapé do Tucumatuba no Distrito de Arapixuna, no noroeste de Santarém. Um ponto em Porto Novo, que fica às margens do rio Curuá-Una a sudeste do município e que possui sua desembocadura no rio Amazonas. E cinco pontos ao longo do rio Tapajós, que incluíram quatro igarapés (um igarapé não é nomeado, identificado como Km 115), um lago próximo a região urbana do município e um igarapé conectado ao rio Arapiuns, um afluente da margem esquerda do rio Tapajós. Todos os pontos de coleta estão listados na tabela 2 e apresentados na figura 1 abaixo.

Tabela 2: Locais de coleta dos camarões com cada código atribuído e número de espécimes coletados em cada ponto.

LOCAL	CÓDIGO	N
Igarapé do Tucumatuba – rio Amazonas	ARAP	90
Igarapé São Benedito - rio Tapajós	ISB	25
Lago do Juá - rio Tapajós	LJ	8
Igarapé km 115 - rio Tapajós	IKM	11
rio Tapajós	TAP	15
Igarapé Mentai - rio Arapiuns	IME	24
Porto Novo – Hidreletrica Curuá-Una	PN	2

Fonte: Elaborada pelo próprio Autor.

Figura 1: Mapa de localização dos pontos de coletas dos espécimes da família Palaemonidae utilizados no trabalho.



Fonte: Elaborada pelo próprio Autor.

As coletas foram realizadas por meio de rede, puçá e matapi (armadilha com isca), com auxílio de pescadores artesanais locais. Os espécimes capturados foram acondicionados em recipientes plásticos contendo álcool etílico 70%, com as identificações do local de coleta. As amostras foram transportadas para o laboratório, onde foram triadas para separação em diferentes grupos morfológicos. Posteriormente, foi retirada uma pequena porção de tecido muscular abdominal de cada espécime, que recebeu um código referente ao local de coleta e numeração. Após esta etapa, os camarões foram mantidos conservados em álcool etílico 70% e inseridos na coleção carcinológica do laboratório.

As amostras de tecidos de espécimes depositadas em três museus da região Norte: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no Amazonas e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) no Pará foram incorporadas ao trabalho para obtenção de sequências de referência, uma vez que passaram por identificação morfológica prévia. Foram selecionadas 39 amostras de 10 espécies e 3 amostras que estavam identificadas apenas a nível de gênero, (Tabela 3).

Tabela 3: Listas das espécies de camarões da Família Palaemonidae depositadas em museus utilizadas no trabalho, com informações sobre taxonomia, museu de origem, data e local de coleta. IEPA: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá; INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; MPEG: Museu Paraense Emílio Goeldi.

Identificação Taxonômica	Origem	Voucher	Data de Coleta	Localidade
<i>Macrobrachium brasiliense</i> 84	IEPA	537	24/08/2004	Igarapé do Braço
<i>Macrobrachium brasiliense</i> 85	IEPA	537	24/08/2004	Igarapé do Braço
<i>Macrobrachium brasiliense</i> 86	IEPA	537	24/08/2004	Igarapé do Braço
<i>Macrobrachium ferreirai</i> 51	INPA	189	17/07/1985	Rio Uatumã, cachoeira Balbina
<i>Macrobrachium iheringi</i> 107	IEPA	716	19/01/2005	Rio Mapaoni - Tumucumaque II
<i>Macrobrachium iheringi</i> 109	IEPA	716	19/01/2005	Rio Mapaoni - Tumucumaque II
<i>Macrobrachium iheringi</i> 110	IEPA	716	19/01/2005	Rio Mapaoni- Tumucumaque II
<i>Macrobrachium iheringi</i> 111	IEPA	716	19/01/2005	Rio Mapaoni- Tumucumaque II
<i>Macrobrachium inpa</i> 61	INPA	663	17/05/1994	Reserva Ducke
<i>Macrobrachium inpa</i> 62	INPA	663	17/05/1994	Reserva Ducke
<i>Macrobrachium jelskii</i> 16	MPEG	731	10/11/1999	Flona de Caxiuanã, Melgaço, Pará
<i>Macrobrachium jelskii</i> 18	MPEG	731	10/11/1999	Flona de Caxiuanã, Melgaço, Pará
<i>Macrobrachium jelskii</i> 124	IEPA	619	23/07/2004	Lagoa dos Índios
<i>Macrobrachium nattereri</i> 128	IEPA	612	15/11/2004	RDS do Rio Iratapuru
<i>Macrobrachium nattereri</i> 129	IEPA	612	15/11/2004	RDS do Rio Iratapuru
<i>Macrobrachium nattereri</i> 137	IEPA	893	30/07/2005	Rio Cupixi
<i>Macrobrachium nattereri</i> 138	IEPA	893	30/07/2005	Rio Cupixi
<i>Macrobrachium nattereri</i> 139	IEPA	893	30/07/2005	Rio Cupixi
<i>Macrobrachium nattereri</i> 140	IEPA	893	30/07/2005	Rio Cupixi
<i>Macrobrachium nattereri</i> 141	IEPA	893	30/07/2005	Rio Cupixi
<i>Macrobrachium surinamicum</i> 26	MPEG	520	18/10/1997	Lomeiro do Ajiru, Marajó-Pará
<i>Macrobrachium surinamicum</i> 57	INPA	284	mar/85	Rio Tocantins, em Cametá - Pará
<i>Macrobrachium surinamicum</i> 80	IEPA	595	Abril/Maio/2004	TABACO - Sede do IBAMA
<i>Macrobrachium surinamicum</i> 92	IEPA	185	20/06/1999	Rio Maniva
<i>Macrobrachium surinamicum</i> 95	IEPA	185	20/06/1999	Rio Maniva
<i>Palaemon carteri</i> 06	MPEG	644	22/12/1999	Mocambo, Belém, Pará

Fonte : Elaborada pelo próprio Autor.

Tabela 3: Continuação.

Identificação Taxonômica	Origem	Voucher	Data de Coleta	Localidade
<i>Palaemon carteri</i> 07	MPEG	644	22/12/1999	Mocambo, Belém, Pará
<i>Palaemon carteri</i> 08	MPEG	644	22/12/1999	Mocambo, Belém, Pará
<i>Palaemon carteri</i> 09	MPEG	644	22/12/1999	Mocambo, Belém, Pará
<i>Palaemon carteri</i> 10	MPEG	644	22/12/1999	Mocambo, Belém, Pará
<i>Palaemon pandaliformis</i> 12	MPEG	196	25/04/1997	Furo do Taici, Bragança, Pará
<i>Palaemon pandaliformis</i> 13	MPEG	196	25/04/1997	Furo do Taici, Bragança, Pará
<i>Pseudopalaemon chryseus</i> 01	MPEG	749	14/04/2002	Monte Dourado, Reserva Genética Felipe, Pará
<i>Pseudopalaemon chryseus</i> 03	MPEG	749	14/04/2002	Monte Dourado, Reserva Genética Felipe, Pará
<i>Pseudopalaemon chryseus</i> 42	MPEG	765	18/03/2001	Flona de Caxiuanã, Melgaço, Pará
<i>Pseudopalaemon chryseus</i> 43	MPEG	765	18/03/2001	Flona de Caxiuanã, Melgaço, Pará
<i>Macrobrachium sp.</i> 2 – 98	IEPA	856	14/03/2005	Igarapé do Rio Santo Antônio - Afluente do Rio Araguari
<i>Macrobrachium sp.</i> 1 – 131	IEPA	869	04/05/2005	Igarapé Baliza - Acampamento
<i>Macrobrachium sp.</i> 1 – 132	IEPA	869	04/05/2005	Igarapé Baliza - Acampamento

Fonte : Elaborada pelo próprio Autor.

3.2 Dados moleculares

As extrações de DNA ocorreram através do protocolo com acetato de amônio, com ajustes (BRUDORF et al., 1989) e, em casos que não foi possível obter o DNA por extração convencional, utilizou-se o Kit QIAamp® DNA Micro (Quiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. As amplificações das regiões de interesse foram executadas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em um volume final de 25 µL com os seguintes volumes e concentrações de reagentes: 13,9 µL de água ultrapura, 4,0 µL de dNTP (1,25mM), 2,5 µL de MgCl₂, 2,0 µL de *Buffer Solution* (10X), 0,25 µL de cada *primer* (10µM), 0,1 µL de Taq polimerase (5U/µL) e 2,0 µL de DNA.

Para amplificação da região nuclear 28S (~540 pb) utilizou-se o iniciador 28S A (5'-GACCCGTCTTGAAGCACG-3') e 28S B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTAC-3') (WHITING et al., 1997). As reações de PCR ocorreram em um termociclador Bioer Gene Pro, iniciada com um período de desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos (30 s de desnaturação a 94°C, 30 s de pareamento a 51°C e extensão de 1 min a 72°C) e extensão final de 5 min a 72°C. Todas as amostras, após extração e amplificação, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% corados com GelRed visualizadas sob luz ultravioleta e fotodocumentadas.

A purificação do produto da PCR foi realizada conforme as recomendações do protocolo de purificação com acetato de amônio e isopropanol. As amostras foram preparadas para

sequenciamento com o kit *Big Dye 3.1 (Applied Biosystems)* seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. O equipamento utilizado foi o sequenciador automático ABI 3500 (*Applied Biosystems*).

3.3 Análise dos dados

As sequências obtidas foram tratadas no programa *CodonCode Aligner v8.0.2 (CodonCode Corporation)*, com posterior visualização de cada sequência e edição, quando necessário. O alinhamento ocorreu na plataforma *online MAFFT v. 7 (KATOHE STANDLEY, 2013)*. Disponível em: <<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>>. Após o alinhamento, as sequências foram organizadas da seguinte forma: (1) banco de dados com sequências de museu; (2) banco de dados com sequências de museu e igarapés. Para exclusão de sequências duplicadas foi utilizada a ferramenta *online ElimDupes* (Disponível em: <<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/elimdupesv2/elimdupes.html>>) e para descarte de regiões hipervariáveis e gaps foi aplicado o programa *online GBLOCKS v. 0,91b (CASTRESANA, 2000; TALAVERA E CASTRESANA, 2007)*. Disponível em: <http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html>).

3.3.1 Banco de dados com sequências de museu

Para a elaboração da árvore filogenética foram utilizadas, no total, 48 sequências de 12 espécies com um tamanho final de 383 pb, onde 39 sequências foram extraídas de exemplares de museus (tabela 3) e 9 amostras adicionadas fazem parte do banco de dados de sequências do LEDEVO (tabela 4). Uma amostra do gênero *Euryrhyinchus* foi incorporada como grupo externo. A construção da árvore filogenética foi realizada através do método de agrupamento de vizinhos (do inglês *Neighbour Joining – NJ*), com análise de significância dos agrupamentos estimada por meio do teste de *bootstrap* a partir de 1000 pseudoréplicas (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura 2 parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). As análises evolutivas foram executadas no programa MEGA X (KUMAR et al., 2018).

Tabela 4: Lista das amostras já sequenciadas e identificadas para o gene 28S utilizadas para construção da árvore filogenética.

Identificação	Origem	Data de Coleta	Localidade
<i>Macrobrachium acanthurus</i> 01	LEDEVO	setembro/2015	Ilhéus – Bahia
<i>Macrobrachium acanthurus</i> 10	LEDEVO	setembro/2015	Ilhéus – Bahia
<i>Macrobrachium acanthurus</i> 32	LEDEVO	maio/2012	Bragança – Pará
<i>Macrobrachium acanthurus</i> 35	LEDEVO	maio/2012	Bragança – Pará
<i>Macrobrachium carcinus</i> Af15	LEDEVO	maio/2012	Afuá – Pará
<i>Macrobrachium amazonicum</i> 02-51	LEDEVO	maio/2013	Juruti - Pará
<i>Macrobrachium amazonicum</i> GO01	LEDEVO	março/2011	Bela vista – Goiás
<i>Macrobrachium amazonicum</i> MS1	LEDEVO	março/2011	Mato Grosso do Sul
<i>Euryrhynchus</i> sp. – 01	LEDEVO	2017	Santarém - Pará

Fonte: Elaborada pelo próprio Autor.

3.3.2 Banco de dados com sequências de museu e igarapés

Para análises de identificação de espécies, inicialmente realizamos a seleção de um representante de cada espécie conforme a análise anterior, e de sequências únicas de amostras de igarapés de acordo com o resultado da ferramenta ElimDupes. A inferência em nível de *Barcode gap* foi realizada empregando o *software* ABGD - *Automatic Barcode Gap Discovery* (PUIILLANDRE et al., 2012. Disponível em: <<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>>) aplicando os seguintes parâmetros: Pmin 1/4 0.001 e Pmax 1/4 0.1; steps 1/4 10; NBins 1/4 20; *Relative gap* 1/4 1 e modelo de Jukes-Cantor (JC69). A escolha do modelo evolutivo para melhor ajuste ao banco de dados foi o GTR realizada pelo Kakusan v. 4 (TANABE, 2007).

As árvores utilizadas nas análises de GMYC – *General Myxed Yule Coalescent* (PONS et al., 2006) foram obtidas pelo *software* Beast v.2.3.1 (BOUCKAERT et al., 2014), com corridas em 10 milhões de passos, com topologias sendo amostradas a cada 1000 gerações, descarte de 10% das genealogias como *burn-in*, e testamos a influência de diferentes árvores (*Yule*, *Constant coalescent* e *Relaxed clock*). O *software* TRACER v. 1.6 foi empregado para convergência das árvores, com os valores de ESS acima 200. O GYCM foi executado no pacote Splits (*Species Limits by Threshold Statistics*) (EZARD et al., 2009), disponibilizado pelo *software* R v. 3.2 (R Core Team, 2012). A última análise foi realizada por meio do modelo PTP – *Poisson Tree Processes* (ZHANG et al., 2013. Disponível em: <<https://species.h-its.org/>>), com a árvore filogenética de máxima verossimilhança (em inglês *Maximum Likelihood* – ML) feita no RaxML, gerada pelo servidor

CIPRES *Science Gateway* v. 3.3 (MILLER et al., 2010 Disponível em: < <https://www.phylo.org/>>) com *bootstrap* de 100 pseudoréplicas.

4 RESULTADOS

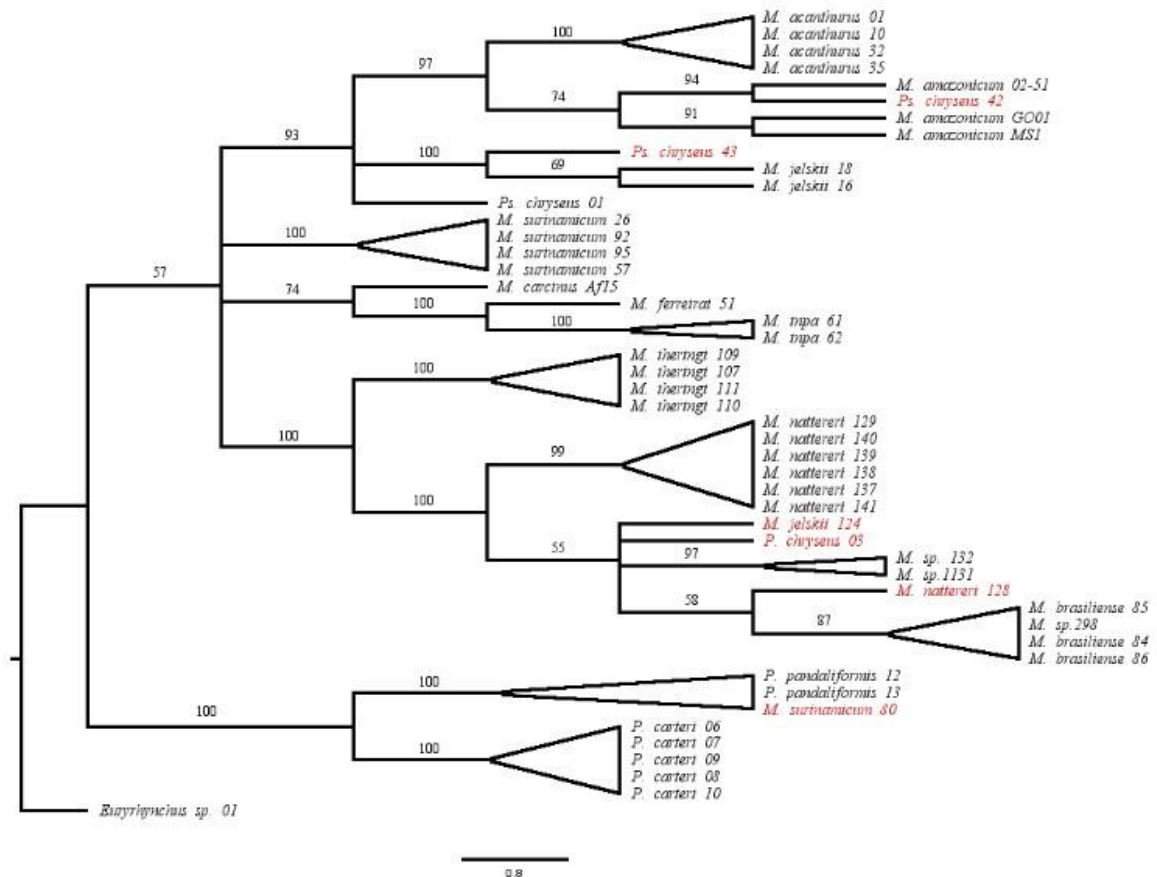
4.1 Análise molecular dos exemplares de museu

A árvore filogenética para o rDNA 28S revelou a formação de clados bem definidos para o gênero *Palaemon* e *Macrobrachium*, entretanto, o gênero *Pseudopalaemon* surgiu dentro do grande grupo composto pelos representantes de *Macrobrachium* (figura 1). Na análise entre os gêneros, o maior valor de divergência foi entre *Palaemon* e *Macrobrachium* com 17% de diferença. Já entre *Macrobrachium* e *Pseudopalaemon* o valor foi de 11,9% de divergência.

As amostras de *Macrobrachium* que apresentaram variabilidade intraespecífica foram *M. brasiliense* e *M. amazonicum*. Em *M. brasiliense*, a divergência foi de 2,54%, e em *M. amazonicum* foi de 0,9%, considerando apenas amostras coletadas na Bacia Amazônica. Quando incorporamos as amostras de Goiás e Mato Grosso do Sul, a divergência em *M. amazonicum* é de 3,3%. A variabilidade interespecífica mais baixa foi observada entre *M. nattereri* e *M. brasiliense* com 1,57%, seguida de *M. ferreirai* e *M. inpa* com 2,13% de divergência. Já o maior valor de divergência foi observado entre *M. carcinus* e *M. iheringi* com 13,37%. A divergência estimada entre as espécies *P. carteri* e *P. pandaliformis* foi de 4,98%.

Os exemplares de museu que não possuíam identificação *M. sp.* 2-98 (*Voucher* 856 – IEPA), *M. sp.* 1-132 e *M. sp.* 1-131 (*Voucher* 869 – IEPA) foram reconhecidos como *M. brasiliense*, com valores de distância entre 0,0 a 0,52%. A topologia evidenciou que seis sequências se agruparam de maneira inesperada, revelando possíveis erros na identificação das espécies depositadas. A amostra nomeada como *Ps. chryseus* 42 (*Voucher* 765 – MPEG) agrupou com *M. amazonicum* com distância genética de 0,94%, já *Ps. chryseus* 43 (*Voucher* 765 – MPEG) está mais próxima de *M. jeslkii* com valor de 0,46% de divergência. *M. jeslkii* 124 (*Voucher* 619 – IEPA), *M. nattereri* 128 (*Voucher* 612 – IEPA) e *Ps. chryseus* 03 (*Voucher* 749 – MPEG) foram inseridas no clado de *M. brasiliense*, com valores de distância entre 0,0 a 1,33%. A amostra *M. surinamicum* 80 (*Voucher* 595 – IEPA) foi idêntica a *P. pandaliformis*. A tabela 5 apresenta a lista das amostras de museus com a identificação molecular baseada nas análises do presente estudo.

Figura 2: Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (NJ) para o gene rDNA 28S, baseada na distância p para espécies do gênero *Macrobrachium*, *Palaemon*, *Pseudopalaemon* depositadas nos museus IEPA: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá; INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia ; MPEG: Museu Paraense Emílio Goeldi. Os números em cada ramificação indicam os valores de *bootstrap* (mostrado apenas valores superiores a 50). Nomes evidenciados em vermelho são referentes a possíveis erros de identificação.



Fonte: Elaborada pelo próprio Autor.

Tabela 5: Listas dos exemplares de museu com identificação molecular com o gene 28S e correção das amostras com identificação morfológica. IEPA: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá; MPEG: Museu Paraense Emílio Goeldi.

Identificação Taxonômica	Identificação Molecular	Museu	Voucher
<i>Macrobrachium</i> sp.2-98	<i>M. brasiliense</i>	IEPA	856
<i>Macrobrachium</i> sp.1-131	<i>M. brasiliense</i>	IEPA	869
<i>Macrobrachium</i> sp.1-132	<i>M. brasiliense</i>	IEPA	869
<i>M. jelskii</i> 124	<i>M. brasiliense</i>	IEPA	619
<i>M. nattereri</i> 128	<i>M. brasiliense</i>	IEPA	612
<i>M. surinamicum</i> 80	<i>P. pandaliformis</i>	IEPA	595
<i>Ps. chryseus</i> 03	<i>M. brasiliense</i>	MPEG	749
<i>Ps. chryseus</i> 42	<i>M. amazonicum</i>	MPEG	765
<i>Ps. chryseus</i> 43	<i>M. jelskii</i>	MPEG	765

Fonte: Elaborada pelo próprio Autor.

4.2 Análise molecular de amostras de igarapés e delimitação de espécies

Um total de 154 amostras de igarapés foram sequenciadas, e resultados da análise pela ferramenta ElimDupes demonstraram 27 sequências únicas (haplótipos) (apêndice), que juntamente com 15 sequências de espécimes de museu com identificações morfológica e molecular congruentes de 12 espécies formaram o banco de dados com 42 sequências, com tamanho final de 444 pb. Os resultados das três análises realizadas (ABGD, GMYC e PTP) encontram-se resumidos na figura 2.

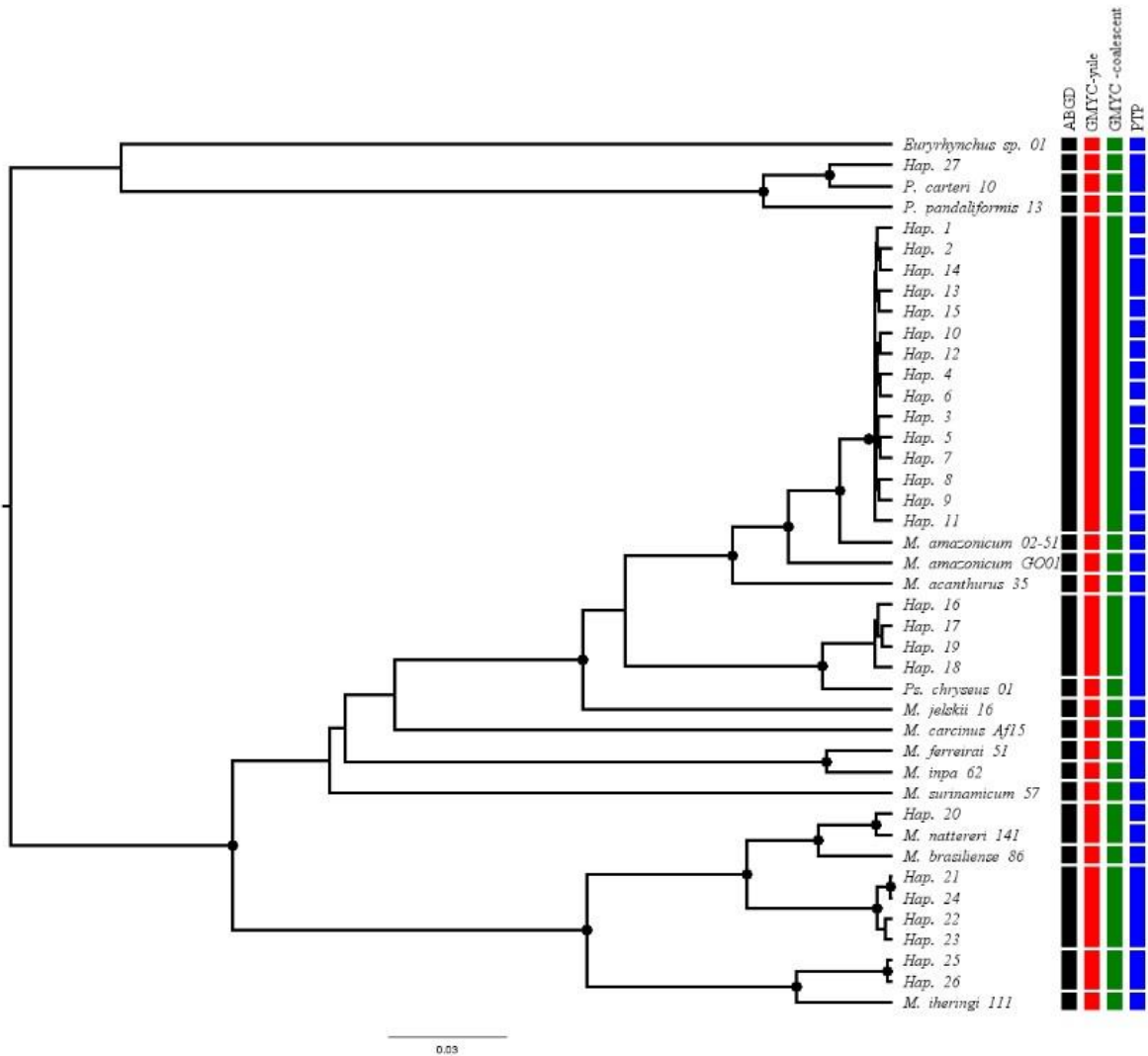
De acordo com a análise de delimitação de espécies com métodos de distância, o ABGD identificou 21 grupos (possíveis espécies) com limiar inicial. Após partições recursivas, o número de grupos variou de 20 a 21 de espécies potenciais. O método GMYC de delimitação molecular de espécies resultou em uma partição com 20 entidades (espécies), com identificações similares para os dois modelos de árvores utilizadas (Yule e Constant coalescent). Finalmente, a investigação via PTP delimitou 30 potenciais espécies, com 16 dessas apresentando valores de suporte de 50%. Comparativamente, ABGD e GMYC evidenciaram delimitação para as mesmas espécies potenciais (figura 2).

Com base nos grupos gerados a partir das análises de delimitação, os haplótipos de 1 a 15 formaram um grande grupo de uma única espécie que se apresenta muito próximo de *M. amazonicum* 02-51 para duas das três análises (ABGD e GMYC), já para PTP esses haplótipos diferem entre si, com retorno de 13 espécies possíveis. Outro ponto observado foi a divergência entre as amostras *M. amazonicum* 02-51 de Juruti e *M. amazonicum* GO01 de Goiás, concordando com a análise de distância das amostras de museu.

Considerando a amostra *Ps. chryseus* 01 um representante válido desta espécie, quatro haplótipos (16 – 19) formaram um clado com alto valor de suporte para as três análises. O método PTP considerou as cinco amostras como *Ps. chryseus*, já ABDG e GMYC demonstraram que os haplótipos pertencem ao gênero *Pseudopalaemon*, mas possivelmente de uma outra espécie.

O haplótipo 20 foi identificado como *M. nattereri* em ABGD e GMYC, mas o PTP o considerou uma espécie distinta com relação genética próxima com *M. brasiliense* e *M. nattereri*. Os haplótipos 21, 22, 23 e 24 formaram um grupo com alto valor de suporte com *M. brasiliense* e *M. nattereri* nos três métodos, sendo identificados como *Macrobrachium* sp. Já os haplótipos 25 e 26 formaram um grupo com valor altamente suportado com sequências de *M. iheringi* para as três análises. O haplótipo 27 foi identificado como *P. carteri* para PTP, já para ABGD e GMYC são amostradas como espécie diferente, ou seja, como *Palaemon* sp.

Figura 3: Árvore ultramétrica para o gene rDNA 28S com resultados das análises de delimitação de espécies. Barras verticais cores podem a análises distintas evidenciando as diferentes espécies. Os pontos acima dos ramos representam valores de probabilidade posterior ($>0,9$). Em preto: ABGD; Em vermelho: GMYC - yule; Em verde: GMYC - coalescent constant; Em azul: PTP.



Fonte: Elaborada pelo próprio Autor.

5 DISCUSSÃO

A identificação molecular de camarões da família Palaemonidae através do marcador nuclear 28S mostrou-se viável, demonstrando eficiência em discriminar espécies. Com os agrupamentos fortemente suportados, a metodologia empregada permitiu uma análise por meio da correspondência entre o posicionamento das sequências em diferentes métodos de delimitação. Os clados formados para o gene 28S pelas amostras com identificação morfológica prévia (figura 1; 2) corresponderam ao observado por Pileggi e Mantelatto, (2010) a partir de sequências de regiões de DNA mitocondrial (COI e 16S) para o gênero *Macrobrachium*; Carvalho et al. (2017; 2019) com os genes 16S, COI, 18S e Histona H3; e Botello e Alvarez (2013) com o gene 16S para os gêneros *Palaemon* e *Pseudopalaemon*.

A topologia observada na árvore inferida não apontou consenso entre os métodos de delimitação. O ABGD foi capaz de distinguir 20 grupos, assim como GMYC (Yule e Constant coalescent), ao passo que PTP obteve 30 potenciais espécies. O maior ponto de divergência entre as análises se deu na delimitação das amostras que agruparam com *M. amazonicum*, com ABGD e GMYC convergindo para um grande grupo de uma única espécie, e PTP para 13 espécies possíveis. Zhang et al. (2013) alerta que o PTP pode superestimar o número de espécies quando a amostragem de táxons é desigual, um problema comum principalmente dentro de grupos que apresentam uma pequena variação. Neste caso, a divisão numerosa sugerida para PTP não parece ser um panorama provável aqui, uma vez que os haplótipos são, em sua maioria, da mesma localidade (Igarapé do Tucumatuba - ver apêndice).

A sequência de *M. amazonicum* proveniente de Juruti foi correspondente com o grande grupo formado pelos haplótipos 1 – 15, com as análises de delimitação evidenciando que as amostras têm relação genética próxima, mas com uma pequena divergência (3,3%) de *M. amazonicum* oriundo de Goiás e Mato Grosso do Sul. Estudos genéticos de *M. amazonicum* com marcadores mitocondriais já apontaram divergência a nível intraespecífico em três linhagens, resumidamente: população continental da Amazônia; população costeira da Amazônia e população do Pantanal (BASTOS, 2002; VERGAMINI et al., 2011; IKETANI et al., no prelo), e após estudos comparativos entre as populações continental da Amazônia e do Pantanal, Dos Santos et al. (2013) e Weiss et al. (2015) concluíram que a população do Pantanal constitui uma nova espécie descrita como *Macrobrachium pantanalense*. Dos Santos et al. (2013) ainda ressaltam que estudos futuros com a população continental da Amazônia podem levar a descrição de uma nova espécie.

O marcador 28S foi capaz de identificar o haplótipo 20 como *M. nattereri* e as amostras de museu *M. sp. 2 – 98*, *M. sp. 1-131* e *M. sp.1-132* como *M. brasiliense*, já quatro amostras únicas (haplótipo 21, 22, 23 e 24) apresentaram proximidade com as espécies *M. nattereri* e *M. brasiliense*. Análises filogenéticas já evidenciaram a relação próxima dessas suas espécies, que ainda formam

um clado comum com *M. ferreirai*, *M. inpa*, *M. depressimanum* e *M. aracamuni* (PILEGGI e MANTELATTO, 2010). No nosso banco de dados haviam sequências de *M. ferreirai* e *M. inpa*, mas não apresentaram correspondência com nenhum outro haplótipo, e na Amazônia brasileira *M. depressimanum* é registrado apenas nos estados do Acre, Amazonas e Rondônia (PILEGGI et al., 2013), e *M. aracamuni* no Amazonas (MANTELATTO et al., 2008). Neste cenário podemos supor que (1) esses haplótipos são de uma espécie próxima não incluída ao nosso banco de referência, caso seja de *M. depressimanum* e/ou *M. aracamuni* a área de ocorrência de uma delas seria ampliada; ou (2) os haplótipos indicariam uma espécie nova ainda não descrita. Recentemente, Rossi et al. (2020) descreveram uma nova espécie de camarão de água doce endêmica da bacia do rio São Francisco nomeada de *Macrobrachium verendensis*, morfologicamente semelhante a *M. brasiliense*, evidenciando que ainda há muito o que se conhecer da real diversidade de espécies de *Macrobrachium*.

A amostragem para as espécies do gênero *Palaemon* foi baixa (duas espécies) e apenas uma amostra (haplótipo 27) foi correspondente, apontando relação genética mais próxima a *P. carteri* em comparação com *P. pandaliformis*, sendo identificada como *Palaemon* sp. Naturalmente a abundância de *Palaemon* é baixa, Odinetz-Collart (1988) cita que *M. amazonicum* chega a representar cerca de 80% da biomassa dos macrocrustáceos em lagos de várzea da Amazônia, e nossos resultados estão alinhados com estas afirmações, uma vez que, apenas, cerca de 20% das amostras foram identificadas como *Palaemon* ou *Pseudopalaemon*.

Carvalho et al. (2014) relataram, através de dados moleculares, que populações de *P. carteri* são atribuídas a região da Amazônia oriental, e populações da Amazônia central e ocidental são atribuídas a *P. ivonicus*, *P. yuna* e *P. mercedae*. Ainda de acordo com estes autores, amostras de *P. carteri* não foram encontradas na região da Amazônia central e ocidental, e trabalhos anteriores, baseados em dados morfológicos, chamaram de *P. carteri* o que, na verdade, era *P. ivonicus/yuna* (ODINETZ-COLLART E ENRICONI, 1993; GARCÍADÁVILA E MAGALHÃES, 2003; GARCÍA-DÁVILA et al. 2005). Além disso, recentemente, Carvalho et al. (2019) observaram que *P. carteri* apresenta estruturação genética entre populações presentes na Amazônia. Considerando as informações acima e os aspectos ecológicos, o sistema hidrológico (ambientes de águas brancas) do haplótipo 27 pode indicar a presença de *P. ivonicus* ou *P. mercedae* e até mesmo *P. carteri* (CARVALHO et al., 2014), e a ampliação da área de distribuição.

A aplicação do gene nuclear 28S foi satisfatória em distinguir espécies que estavam presentes no banco de dados, como mostrado anteriormente, concordando com trabalhos anteriores que também empregaram este marcador para identificação de diferentes organismos como fungos (PINNOI et al., 2007), trematódeos (HERNÁNDEZ-MENA et al., 2016; ORÉLIS-RIBEIRO et al., 2017), vespas (CAMPBELL et al., 1994), miriápodes (GAI et al., 2006), e crustáceos *Niphargus*

(HEKMATARA et al., 2013; NTAKIS et al., 2015), Krill (JARMAN et al., 2000). E tal marcador em combinação com outros marcadores nucleares (LITTLEWOOD, 1994; TAYLOR et al., 2007; HIRAI et al., 2013) ou mitocondriais (LANDSTORFER E SCHUBART, 2010; SHORT et al., 2013; CASTELIN et al., 2017; WOOD et al., 2018; BLOOM et al., 2019) tem contribuindo para a reconstrução de filogenias e delimitação de táxons. Hirai et al. (2013), ao realizar uma avaliação combinando as regiões nucleares ITS2 – 28S como marcador para identificação de crustáceos copépodes do Pacífico Norte, concluíram que marcadores ITS2 – 28S são facilmente amplificados e suficientemente variáveis para identificação de diferentes espécies.

Entretanto, a ausência de uma maior cobertura de sequências de espécies dos gêneros *Macrobrachium*, *Palaemon* e *Pseudopalaemon* foi um fator limitante, uma vez que alguns haplótipos foram identificados apenas a nível de gênero. O clado dos haplótipos 25 e 26 com *M. iheringi* revelou um grupo inesperado. *M. iheringi* é um camarão de água doce endêmico do Brasil que, até o momento, não é registrado para a bacia Amazônica, sua área de distribuição conhecida abrange os estados de Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (PILEGGI et al., 2013). As amostras dessa espécie são provenientes de coleção, e segundo os dados sobre o local, são oriundas do rio Mapaoni, afluente da margem esquerda do rio Jari, na serra do Tumucumaque, no Estado do Amapá. Dados de filogenia molecular com *M. iheringi* revelaram relação próxima com *Cryphiops brasiliensis* (PILEGGI E MANTELATTO, 2010) e *M. potiuna* (ROSSI et al., 2020), espécies sem ocorrência para a bacia Amazônica. Baseado nessas informações, é possível que essa identificação tenha sido realizada erroneamente, e consideramos as amostras do clado formado como *Macrobrachium* sp.

As sequências de rDNA 28S revelaram ainda que seis amostras identificadas pela morfologia apresentaram inconsistências de identificação (tabela 5), com uma maior fragilidade de identificação em amostras consideradas *Pseudopalaemon chryseus*. De acordo com os resultados, a inferência filogenética apresentou relação muito próxima entre os gêneros *Macrobrachium* e *Pseudopalaemon*, com inserção do representante deste gênero dentro de *Macrobrachium*. Das quatro amostras desta espécie incluídas no trabalho, três revelaram possíveis erros de identificação agrupando com espécies distintas do gênero *Macrobrachium* (*M. amazonicum*, *M. brasiliense* e *M. jelskii*). Esta descoberta conduziu a duas hipóteses: (1) a única amostra que não agrupou com as demais (*Ps. chryseus* 01) é, de fato, um exemplar desta espécie; (2) a única amostra que não agrupou é um espécime não identificado do gênero *Macrobrachium*.

Em favor da primeira hipótese, os resultados do presente trabalho foram similares aos achados de Botello e Alvarez (2013) para o gene 16S e Carvalho et al. (2017) em análise multilocus (16S, 18S e Histona H3), com *Ps. chryseus* surgindo entre os camarões *Macrobrachium* de desenvolvimento larval abreviado. Botello e Alvarez (2013) enfatizam que apesar da estreita

relação entre *Macrobrachium* e *Cryphiops* (PILEGGI E MANTELATTO, 2010), seus resultados revelaram maior proximidade entre *M. tuxtlaense* e *Ps. chryseus*. Já a segunda hipótese levanta dois pontos: o primeiro é de que, possivelmente, os espécimes se encontravam na fase juvenil ou imatura e foram, erroneamente, atribuídas a *Ps. chryseus*, e o segundo ponto é de que o material pode não ter sido identificado por um especialista da área (DE OLIVEIRA et al., 2017).

Neste sentido, consideramos estes questionamentos válidos para as demais amostras com identificações confusas: *M. jelskii* 124 e *M. nattereri* 128 são, na verdade, *M. brasiliense* e *M. surinamicum* 80 é *P. panfaliformis*, uma vez que espécies que ainda não atingiram a fase adulta podem apresentar semelhanças morfológicas nestas fases, como já evidenciado entre *M. amazonicum* e *M. jelskii* (GUERRA et al., 2014, VERA-SILVA et al., 2017; SANTOS et al., 2018), *M. brasiliense* e *M. nattereri* (SANTOS et al., 2018; ROSSI et al., 2020), *P. carteri* e *P. yuna* (GARCÍA-DÁVILA et al. 2005; CARVALHO et al., 2014).

Recentemente Santos et al. (2018) atualizaram dados sobre caracteres para identificação morfológica para duas espécies (*Ps. chryseus* e *Ps. goulding*) no estado de Roraima. Mas, segundo Ashelby et al. (2012) o caractere usado para distinguir os *Macrobrachium* de *Pseudopalaemon* é a ausência de um palpo mandibular em *Pseudopalaemon*, que em análise com outros gêneros da família Palaemonidae, foi considerado sem valor sistemático.

A correspondência dos haplótipos 16, 17, 18 e 19 com a amostra identificada como *Ps. chryseus* 01 foi considerada como a mesma espécie para PTP, mas como espécie potencial distinta para ABGD e GMYC. Baseados em dados de distribuição (PILEGGI et al., 2013; PIMENTEL E MAGALHÃES, 2014) para a área de coleta desses haplótipos (Igarapé São Benedito - rio Tapajós e Igarapé Mentai - rio Arapiuns), apenas *Ps. chryseus* é registrado. Com estudos futuros e incorporação de sequências das demais espécies do gênero *Pseudopalaemon* será possível realizar uma comparação completa do grupo, com possível ampliação das áreas de ocorrência. E alguns trabalhos de distribuição e novos registros de espécies alertam para estudos mais detalhados sobre uma possível nova espécie de *Pseudopalaemon* em populações do rio Jaú, no Amazonas (KEMENES et al., 2010), rio Iriri na bacia do rio Xingú no Pará (MAGALHÃES et al., 2018) e rio Cinaruco, na bacia do rio Orinoco na Venezuela (MONTROYA et al., 2014).

Contudo, dos três gêneros da família Palaemonidae analisados neste trabalho, *Pseudopalaemon* é o único grupo que não possui estudos de filogenia molecular, talvez a dificuldade de captura e seu pequeno porte sejam fatores limitantes, aliado ao fato de serem morfológicamente semelhantes a espécies de *Macrobrachium* jovens (DE OLIVEIRA et al., 2017; MAGALHÃES et al., 2018), tornando a identificação morfológica mais complexa. Pimentel e Magalhães (2014) realizaram novos registros de espécies da família Palaemonidae nos estados do Amapá e Pará, com material de coleções das instituições científicas da Amazônia, e análises

morfológicas realizadas por estes autores foram divergentes com os resultados moleculares do presente trabalho. Os espécimes dos lotes MPEG 749 e MPEG 765 que foram descritas como *Ps. chryseus* por estes autores, foram identificadas aqui como espécies pertencentes ao gênero *Macrobrachium*. Esta discordância ressalta que a continuidade dessas informações pode gerar instabilidade taxonômica, superestimando descrições e áreas de distribuição. Um estudo de dados morfológicos rigorosos e análises moleculares robustas se faz necessário para apoiar a classificação do grupo.

A importância da identificação correta dos organismos é fundamental para o conhecimento da diversidade biológica. Na região Neotropical a fauna de camarão de água doce é subestimada (MAGALHÃES et al., 2016), e a difusão de erros de identificação pode conduzir à interpretação incorreta das relações filogenéticas, biogeográficas e ecológicas (VERASILVA et al., 2017). De fato, a presença de caracteres plásticos torna a determinação precisa de espécies difícil e problemática, e a adição de marcadores moleculares competentes é fundamental para elucidar a delimitação de fronteiras entre linhagens e/ou espécies e podem ajudar na interpretação de padrões de biodiversidade (ROSSI E MANTELATTO, 2013).

6 CONCLUSÃO

Os resultados dos dados moleculares de camarões da família Palaemonidae da Amazônia brasileira confirmam a aplicabilidade do gene nuclear 28S como marcador molecular para identificação de espécies. Comparando os diferentes métodos de delimitação, de modo geral, o 28S demonstrou variabilidade para diferentes gêneros e espécies, explorando as relações genéticas dentro da família e evidenciando identificações confusas. No entanto, é necessário a adição de mais espécimes e outras espécies para melhorar a resolução das relações taxonômicas desta família.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHELBY, C. W., PAGE, T. J., DE GRAVE, S., HUGHES, J. M., & JOHNSON, M. L. (2012). Regional scale speciation reveals multiple invasions of freshwater in Palaemoninae (Decapoda). **Zoologica Scripta**, v.41, n. 3, p.293-306.
- ÁVILA, F. F. **Identificação molecular de camarões de água doce (Decapoda, Palaemonidae) do baixo amazonas**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Oeste do Pará. Brasil.
- BAEZA, J. A., & FUENTES, M. S. (2013). Exploring phylogenetic informativeness and nuclear copies of mitochondrial DNA (numts) in three commonly used mitochondrial genes: mitochondrial phylogeny of peppermint, cleaner, and semi-terrestrial shrimps (Caridea: Lysmata, Exhippolysmata, and Merguia). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 168, n. 4, p.699-722.
- BALDWIN, B. G., SANDERSON, M. J., PORTER, J. M., WOJCIECHOWSKI, M. F., CAMPBELL, C. S., & DONOGHUE, M. J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri botanical garden**, p.247-277.
- BALLARD, J. W. O., & WHITLOCK, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular ecology**, v. 13, n. 4, p.729-744.
- BARROS, M.P. DE, PIMENTEL, F.R., (2001). A fauna de decapoda (Crustacea) do estado do Pará, Brasil: lista preliminar das espécies. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi**, sér. Zool. 17, 15–41.
- BASTOS, S. N. **Caracterização molecular e biologia reprodutiva de Macrobrachium amazonicum (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae)**. Tese de Doutorado. Master Thesis, Universidade Federal do Pará, Bragança, Pará, Brazil, 71p., 2002.
- BATE, C. Spence. On a new genus, with four new species of freshwater prawns. In: **Proceedings of the Zoological Society of London**. 1868. p. 363-368.
- BENSASSON, D., ZHANG, D. X., HARTL, D. L., & HEWITT, G. M. (2001). Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends in ecology & evolution**, v. 16, n. 6, p.314-321.
- BLOOM, E. T., MCCALL, B. L., SCHUSTER, G. A., & BLANTON, R. E. (2019). Systematics and description of a new species of *Faxonius* Ortmann, 1905 (Decapoda: Astacidea: Cambaridae) from the Red River system of Kentucky and Tennessee, USA. **Journal of Crustacean Biology**, v. 39, n. 1, p.40-53.
- BOTELLO, A., & ALVAREZ, F. (2013). Phylogenetic relationships among the freshwater genera of palaemonid shrimps (Crustacea: Decapoda) from Mexico: evidence of multiple invasions?. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 4, p.773-780.
- BOUCKAERT, R., HELED, J., KÜHNERT, D., VAUGHAN, T., WU, C. H., XIE, D., SUSHARD, M., A., RAMBAUT, A., & DRUMMOND, A. J. (2014). BEAST 2: a software

platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS computational biology**, v. 10, n. 4, e1003537.

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

CAMPBELL, B. C., STEFFEN-CAMPBELL, J. D., & WERREN, J. H. (1994). Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. **Insect molecular biology**, v. 2, n. 4, p. 225-237.

CARVALHO, F. L., MAGALHÃES, C., & MANTELATTO, F. L. (2014). 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 – 108.

CARVALHO, F. L., DE GRAVE, S., & MANTELATTO, F. L. (2017). An integrative approach to the evolution of shrimps of the genus *Palaemon* (Decapoda, Palaemonidae). **Zoologica Scripta**, v. 46, n. 4, p. 473-485.

CARVALHO, F. L., MAGALHÃES, C., & MANTELATTO, F. L. (2019). A molecular and morphological approach on the taxonomic status of the Brazilian species of *Palaemon* (Decapoda, Palaemonidae). **Zoologica Scripta**, p.1-16.

CASTELIN, M., FEUTRY, P., HAUTECOEUR, M., MARQUET, G., WOWOR, D., ZIMMERMANN, G., & KEITH, P. (2013). New insight on population genetic connectivity of widespread amphidromous prawn *Macrobrachium lar* (Fabricius, 1798) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). **Marine Biology**, v. 160, n. 6, p.1395-1406.

CASTELIN, M., DE MAZANCOURT, V., MARQUET, G., ZIMMERMANN, 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**, v. 289, p. 1-27.

CASTRESANA, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular biology and evolution**, v. 17, n. 4, p. 540-552.

CHACE, F. A. (1972). The shrimps of the Smithsonian-Bredin Caribbean expeditions with a summary of the West Indian shallow-water species (Crustacea: Decapoda: Natantia). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 98, p. 1–179.

CHEN, R. T., TSAI, C. F., & TZENG, W. N. (2009). 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.

COLEMAN, A. W. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **TRENDS in Genetics**, v. 19, n. 7, p.370-375.

- CRANDALL, K. A., HARRIS, D. J., & FETZNER JR, J. W. (2000). The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, n. 267, n. 1453, p.1679-1686.
- DE GRAVE, S., & FRANSEN, C.H.J.M. (2011). Carideorum Catalogus: The Recent Species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean Shrimps (Crustacea: Decapoda), **Zoologische Mededelingen**, 85: 195-589.
- DE GRAVE, S., & ASHELBY, C. W. (2013). A re-appraisal of the systematic status of selected genera in Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). **Zootaxa**, v. 3734, n.3, p.331344.
- DE GRAVE, S., FRANSEN, C. H. J. M. & PAGE, T. J. (2015). Let's be pals again: major systematic changes in Palaemonidae (Crustacea: Decapoda). **PeerJ**, v. 3, p. e1167.
- DE OLIVEIRA, L. J. F., SANT'ANNA, B. S., & HATTORI, G. Y. (2017). Reproductive potential of four freshwater prawn species in the Amazon region. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 61, n. 4, p. 290-296.
- DOS SANTOS, A., HAYD, L., & ANGER, K. (2013). A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. **Zootaxa**, v. 3700, n. 3, p. 534-546.
- FAUSTO FILHO, J. (1967). *Palaemon (Palaemon) paivai*, nova espécie de crustáceo do Brasil (Decapoda Palaemonidae). **Arquivos Da Estação De Biologia Marinha Da Universidade Federal do Ceará**, v. 7, n. 1, p.19–22.
- FELSENSTEIN J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p.783-791.
- FERREIRA, R.S., VIEIRA, R.R.R., & D'INCAO, F., (2010). The marine and estuarine shrimps of the Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Caridea) from Brazil. **Zootaxa** 24, 1–24.
- GAI, Y. H., SONG, D. X., SUN, H. Y., & ZHOU, K. Y. (2006). Myriapod monophyly and relationships among myriapod classes based on nearly complete 28S and 18S rDNA sequences. **Zoological Science**, v. 23, n. 12, p. 1101-1108.
- GARCÍA-DÁVILA, C. R., & MAGALHÃES, C. (2003). Revisão taxonômica dos camarões de água doce (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae, Sergestidae) da Amazônia Peruana. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 4, p. 663-686.
- GARCÍA-DÁVILA, C. R., MAGALHÃES, C., & GUERRERO, J. C. H. (2005). Morphometric variability in populations of *Palaemonetes* spp. (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) from the Peruvian and Brazilian Amazon Basin. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 95, n. 3, p.327-334.
- GORDON, I. (1935). On new or imperfectly known species of Crustacea Macrura. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 39, n. 266, p. 307-351.
- GRAUR, D., & LI, W. H. (2000). Fundamentals of molecular evolution. **Dynamics**, 20(2), 38.

- GUERRA, A. L., LIMA, A. V. B., LUCATO JUNIOR, R. V., CHIACHIO, M. C., TADDEI, F. G., & CASTIGLIONI, L. (2014). Genetic variability and phylogenetic aspects in species of the genus *Macrobrachium*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p.3646-3655.
- HEBERT, P. D., CYWINSKA, A., BALL, S. L., DEWAARD, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v.270, n.1512, p.313-321.
- HEKMATARA, M., ZAKŠEK, V., HEIDARI BALADEHI, M., & FIŠER, C. (2013). Two new species of *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda) from Iran. **Journal of Natural History**, v. 47, n. 21-22, p. 1421-1449.
- HELLER, C. 1862. Beiträge zur näheren Kenntniss der Macrouren. Sitzungsberichte der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen. **Klasse der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften**, Wien 45(1): 389–426, pls. 1–2.
- HERNÁNDEZ-MENA, D. I., LYNGGAARD, C., MENDOZA-GARFIAS, B., & PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. (2016). A new species of *Auriculostoma* (Trematoda: Allocreadiidae) from the intestine of *Brycon guatemalensis* (Characiformes: Bryconidae) from the Usumacinta River basin, Mexico, based on morphology and 28S rDNA sequences, with a key to species of the genus. **Zootaxa**, v. 4196, n. 2, p. 261-277.
- HILLIS, D. M., & DIXON, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly review of biology**, v. 66, n. 4, p.411-453.
- HIRAI, J., SHIMODE, S., & TSUDA, A. (2013). Evaluation of ITS2-28S as a molecular marker for identification of calanoid copepods in the subtropical western North Pacific. **Journal of Plankton Research**, v. 35, n. 3, p. 644-656.
- HOLTHUIS, L. B. (1948). Note on some Crustacea Decapoda Natantia from Surinam. **Proceedings Koninklijke Nederlandsche Akademie van Wetenschappen**, v.51, p.11041113.
- HOLTHUIS, L. B. (1950). Preliminary descriptions of twelve new species of Palaemonid prawns from American waters (Crustacea Decapoda). **Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, v. 53, p.93-99.
- HOLTHUIS L. B. (1951). A general revision of the Palaemonidae (Crustacea Decapoda Natantia) of the Americas. I. The subfamilies Euryrhyndinae and Pontoniinae. **Allan Hancock Foundation Publications, Occasional Papers** 11: 1–332.
- HOLTHUIS L. B. (1952). A general revision of the Palaemonidae (Crustacea Decapoda Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. **Allan Hancock Foundation Publications, Occasional Papers** 12: 1–396.
- IKETANI, G., PIMENTEL, L., SILVA-OLIVEIRA, G., MACIEL, C., VALENTI, W., SCHNEIDER, H., & SAMPAIO, I. (2011). The history of the introduction of the giant river prawn, *Macrobrachium cf. rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae), in Brazil: New insights from molecular data. **Genetics and molecular biology**, v. 34, n. 1, p. 142-151.

- JARMAN, S. N., NICOL, S., ELLIOTT, N. G., & MCMINN, A. (2000). 28S rDNA evolution in the Eumalacostraca and the phylogenetic position of krill. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 17, n. 1, p. 26-36.
- JORDÁN-HERNÁNDEZ, M., RODRÍGUEZ-ALMARÁZ, G., & FAVELA-LARA, S. (2019). Delimitation of sympatric *Palaemon* (Decapoda, Palaemonidae) species of the Laguna Madre, Mexico. **Zoologica Scripta**; 00:1-12.
- KATOH, K., & STANDLEY, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780.
- KENSLEY, B., & WALKER, I. (1982) Palaemonid shrimps from the Amazon basin, Brazil (Crustacea: Decapoda: Natantia). **Smithsonian Contribution to Zoology** 362: 1–28.
- KEMENES, A., FORSBERG, B. R., MAGALHAES, C., & DOS ANJOS. (2010). Environmental factors influencing the community structure of shrimps and crabs (Crustacea: Decapoda) in headwater streams of the Rio Jaú, Central Amazon, Brazil. **Pan-american Journal of Aquatic Sciences**, n. 5, v. 1, p. 36-46.
- KIMURA M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120.
- KOU, Q., LI, X. Z., CHAN, T.-Y., CHU, K. H. & GAN, Z. (2013). 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.
- KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., & TAMURA K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549.
- LANDSTORFER, R. B., & SCHUBART, C. D. (2010). A phylogeny of Pacific fiddler crabs of the subgenus *Minuca* (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae: *Uca*) with the description of a new species from a tropical gulf in Pacific Costa Rica. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 48, n. 3, p. 213-218.
- LEFÉBURE, T., DOUADY, C. J., GOUY, M., & GIBERT, J. (2006). 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.
- LINNAEUS, C. 1758. **Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis.** (10 Edition) Vol. 1. Holmiae: Laurentii Salvii. iii, 824 pp.
- LITTLEWOOD, D. T. J. (1994). Molecular phylogenetics of cupped oysters based on partial 28S rRNA gene sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 3, n. 3, p. 221-229.

- LIU, M. Y.; CAI, Y. X.; TZENG, C. S. (2007). Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. **Zoological Studies**, v. 46, p. 272-289.
- LOPEZ, J. V., YUHKI, N., MASUDA, R., MODI, W., & O'BRIEN, S. J. (1994). Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. **Journal of molecular evolution**, v. 39, v. 2, p.174-190.
- MACHIDA, R. J.; LIN, Y. Y. (2017). Occurrence of mitochondrial CO1 pseudogenes in *Neocalanus plumchrus* (Crustacea: Copepoda): Hybridization indicated by recombined nuclear mitochondrial pseudogenes. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0172710.
- MACIEL, C. R., QUADROS, M. L., ABRUNHOSA, F., BASTOS, S., SCHNEIDER, H., & SAMPAIO, I. (2011). Occurrence of the Indo-Pacific freshwater prawn *Macrobrachium equidens* Dana 1852 (Decapoda, Palaemonidae) on the coast of Brazilian Amazonia, with notes on its reproductive biology. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 2, p. 533544.
- MAGALHÃES, C. (1987). The larval development of palaemonid shrimps from the Amazon Region reared in the laboratory. V. The abbreviated development of *Pseudopalaemon chryseus* Kensley & Walker, 1982 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). **Acta Amazonica**, v. 16, p. 95-124.
- MAGALHÃES, C., & MEDEIROS, N. (1998). The larval development of palaemonid shrimps from the Amazon Region reared in the Laboratory. VII. Abbreviated development of *Pseudopalaemon amazonensis* Ramos-Porto, 1979 (Crustacea: Decapoda: Caridea). **Acta Amazonica**, v. 28, n. 4, p.433-433.
- MAGALHÃES, C.; BUENO, S.; BOND, G.; VALENTI, W.C.; SILVA, H.M.; KIYOARA, F.; MOSSOLIN, E.C.; ROCHA, S. (2005). Exotic species of freshwater decapod crustaceans in state of São Paulo, Brasil: records and causes of their introduction. **Biodiversity & Conservation**, v. 14, n. 8, p. 1929-1945.
- MAGALHÃES, C., & PEREIRA, G. (2007). Assessment of the decapod crustacean diversity in the Guayana Shield region aiming at conservation decisions. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p.1-6.
- MAGALHÃES, C., CAMPOS, M. R., COLLINS, P. A., & MANTELATTO, F. L. (2016). Diversity, distribution and conservation of freshwater crabs and shrimps in South America. Diversity, distribution and conservation of freshwater crabs and shrimps in South America. In: **A global overview of the conservation of freshwater decapod crustaceans**. Springer, Cham, p. 303-322.
- MAGALHÃES, C., ROBLES, R., SOUZA-CARVALHO, E. A., CARVALHO, F. L., DE OLIVEIRA MALTA, J. C., & MANTELATTO, F. L. (2018). Annotated checklist of parasitic and decapod crustaceans from the middle and lower Xingu (Amazon Basin) above and below the Belo Monte dam complex, Pará State, Brazil. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v.166, n. 1, p.1-35.

- MANTELATTO, F. L., PILEGGI, L. G., SUÁREZ, H., & MAGALHÃES, C. (2008). First record and extension of the known distribution of the inland prawn, *Macrobrachium aracamuni* Rodríguez, 1982 (Decapoda, Palaemonidae) in Brazil. **Crustaceana**, v. 81, n. 2, p.241-246.
- MANTELATTO, F.L.; PILEGGI, L.G.; MAGALHÃES, C.; CARVALHO, F.L.; ROCHA, S.S.; MOSSOLIN, E.C.; ROSSI, N. & BUENO, S.L.S. (2016). Avaliação dos Camarões Palemonídeos (Decapoda: Palaemonidae), Cap. 20, p. 252-267. In: Pinheiro, M.A.A. & Boos, H. (Org.). **Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014**. Porto Alegre, RS: Sociedade Brasileira de Carcinologia - SBC, 466 p.
- MATZEN DA SILVA, J. M., CREER, S., DOS SANTOS, A., COSTA, A. C., CUNHA, M. R., COSTA, F. O., CARVALHO, G. R. (2011). Systematic and evolutionary insights derived from mtDNA COI barcode diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). **PLoS one**, v.6, n.5, p. e19449.
- MELO, G. A. S. (2003). Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**, Editora Loyola, São Paulo p. 289-415.
- MIERS, E. J. (1877). On a collection of Crustacea, Decapoda and Isopoda, chiefly from South America, with descriptions of new genera and species. **Proceedings of Zoological Society London**, v.1877, p. 653-679.
- MILLER, M. A., PFEIFFER, W., & SCHWARTZ, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **2010 gateway computing environments workshop (GCE)**. Ieee, p. 1-8
- MONTOYA, J. V., ARRINGTON, D. A., & WINEMILLER, K. O. (2014). Seasonal and diel variation of shrimp (Crustacea, Decapoda) on sandbanks of a tropical floodplain river. **Journal of Natural History**, v. 48, v. 9-10, p. 557-574.
- MORAES, S. A. S. N. de. **Variabilidade fenotípica e genotípica do camarão *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) das Bacias do Nordeste Brasileiro: uma abordagem de sistemática integrativa**. 2017. Master's Thesis. Brasil.
- NGUYEN, T.T.T; MURPHY, N. P.; AUSTIN, C. M. (2002). Amplification of multiple copies of mitochondrial Cytochrome b gene fragments in the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark (Parastacidae: Decapoda). **Animal genetics**, v. 33, n. 4, p. 304-308.
- NTAKIS, A., ANASTASIADOU, C., ZAKŠEK, V., E FIŠER, C. (2015). Phylogeny and biogeography of three new species of *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda) from Greece. **Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology**, v. 255, p. 32-46.
- ODINETZ-COLLART, O., ENRICONI, A. (1993). Estratégia reprodutiva e alguns aspectos demográficos do camarão *Palaemonetes carteri* Gordon, 1935 na Amazônia Central, Rio Negro. **Acta Amazonica** v. 23, n.2-3, p. 227-243.
- ORÉLIS-RIBEIRO, R., HALANYCH, K. M., DANG, B. T., BAKENHASTER, M. D., ARIAS, C. R., E BULLARD, S. A. (2017). Two new species of *Elopicola* (Digenea: Aporocotylidae) from Hawaiian ladyfish, *Elops hawaiiensis* (Eastern Sea) and Atlantic tarpon,

Megalops atlanticus (Gulf of Mexico) with a comment on monophyly of elopomorph blood flukes. **Parasitology international**, v. 66, n. 3, p. 305-318.

OTTONI, F. P., A. Q. LEZAMA, M. L., TRIQUES, E. N., FRAGOSO-MOURA, C. C., T. LUCAS, & F. A. R. BARBOSA. (2011). *Australoheros perdi*, new species (Teleostei: Labroidei: Cichlidae) from the lacustrine region of the Doce River Valley, southeastern Brazil, with biological information. **Vertebrate Zoology**, v. 61, p.137-145.

PEREIRA, G. (1986). Freshwater shrimps from Venezuela I: Seven new species of Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 99, n. 2, p.198-213.

PEREIRA, G. A. (1993). A description of a new species of *Macrobrachium* from Perú, and distributional records for *Macrobrachium brasiliense* (Heller) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v.106, n. 2, p. 339345.

PILEGGI, L. G. & MANTELATTO, F. L. (2010). 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.

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

PILEGGI, L. G., MAGALHÃES, C., BOND-BUCKUP, G., & MANTELATTO, F. L. (2013). 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.

PILEGGI, L. G., ROSSI, N., WEHRTMANN, I. S., & MANTELATTO, F. L. (2014). Molecular perspective on the American transisthmian species of *Macrobrachium* (Caridea, Palaemonidae). **Zookeys**, v. 457, p.109-131.

PIMENTEL, F.R., & MAGALHÃES, C., (2014). Palaemonidae, Euryrhyndidae, and Sergestidae (Crustacea: Decapoda): Records of native species from the states of Amapá and Pará, Brazil, with maps of geographic distribution. **Check List** v. 10, n. 6, 1300–1315.

PINNOI, A., JEEWON, R., SAKAYAROJ, J., HYDE, K. D., & JONES, E. G. (2007). *Berkleasium crunisia* sp. nov. and its phylogenetic affinities to the Pleosporales based on 18S and 28S rDNA sequence analyses. **Mycologia**, v. 99, n. 3, p. 378-384.

PONS, J., BARRACLOUGH, T. G., GOMEZ-ZURITA, J., CARDOSO, A., DURAN, D. P., HAZELL, S., KAMOUN, S., SUMLIN, W., & VOGLER, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic biology**, v. 55, n. 4, p. 595-609.

PORTER, M. L., PÉREZ-LOSADA, M., & CRANDALL, K. A. (2005). Model-based multilocus estimation of decapod phylogeny and divergence times. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 37, n.2, p.355-369.

- PULLANDRE, N., MODICA, M. V., ZHANG, Y., SIROVICH, L., BOISSELIER, M.C., CRUAUD, C., HOLFORD, M., SAMADI, S., (2012). Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. **Molecular Ecology**, v.21, n. 11, p.2671–2691.
- RAFINESQUE, C. S. (1815). *Analyse de la Nature, ou Tableau de l'Univers et des Corps Organisés*. Aux dépens de l'auteur. L'Imprimerie de Jean Barravecchia, Palermo. N. 117.
- RAMOS-PORTO, M. (1979). *Pseudopalaemon amazonensis*, espécie nova de camarão da bacia Amazônica (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 31^a Reunião Anual, Resumos. **Ciência e Cultura**, Suplemento v. 31, n. 7, p. 693.
- ROBE, L. J., MACHADO, S., BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. (2012). The DNA barcoding and the caveats with respect to its application to some species of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda). **Zoological Science**, v.29, n.10, p.714-724.
- RODRIGUEZ, G. (1982). Fresh-water shrimps (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Orinoco basin and the Venezuelan Guayana. **Journal of Crustacean Biology**, v. 2, n. 3, p. 378-391.
- 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**, v. 8, n. 1, e54698.
- ROSSI, N., MAGALHAES, C., MESQUITA, E. R., & MANTELATTO, F. L. (2020). Uncovering a hidden diversity: a new species of freshwater shrimp *Macrobrachium* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) from Neotropical region (Brazil) revealed by morphological review and mitochondrial genes analyses. **Zootaxa**, v. 4732, n. 1, p. 177-195.
- SABIA, L., DI CAPUA, I., PERCOPO, I., UTTIERI, M., & AMATO, A. (2017). ITS2 in calanoid copepods: reconstructing phylogenetic relationships and identifying a newly introduced species in the Mediterranean. **The European Zoological Journal**, v. 84, n. 1, p.104-115.
- SANTOS, M. A. L., DE CASTRO, P. M., & MAGALHÃES, C. (2018). Freshwater shrimps (Crustacea, Decapoda, Caridea, Dendrobranchiata) from Roraima, Brazil: species composition, distribution, and new records. **Check List**, v. 14, p. 21.
- SHORT, J. W., HUMPHREY, C. L., & PAGE, T. J. (2013). Systematic revision and reappraisal of the Kakaducarididae Bruce (Crustacea: Decapoda: Caridea) with the description of three new species of *Leptopalaemon* Bruce & Short. **Invertebrate Systematics**, v. 27, n. 1, p. 87-117.
- SOLLAUD E. (1911). *Pseudopalaemon bouvieri*, nouveau genre, nouvelle espèce, de la famille des Palæmonidae. **Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle** 17: 12–16.
- SONG, H., BUHAY, J.E., WHITING, M.F. & CRANDALL, K.A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **P. Natl. Acad. Sci. USA**. v.105, p.13468-13491.
- SONNENBERG, R., NOLTE, A. W., & TAUTZ, D. (2007). An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. **Frontiers in zoology**, v. 4, n. 6.

SORENSEN, M. D., & QUINN, T. W. (1998). Numts: a challenge for avian systematics and population biology. **The Auk**, v.115, n. 1, p.214-221.

STIMPSON, W. (1871). Notes on North American Crustacea in the Museum of the Smithsonian Institution. No III. **Annals of the Lyceum of Natural History of New York**, v.10, p. 92–136.

TADDEI, F. G.; REIS, S. D. S.; DAVID, F. S.; SILVA, T. E. D.; FRANSOZO, V.; FRANSOZO, A. (2017). Population structure, mortality, and recruitment of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae) in the eastern Amazon region, Brazil. **The Journal of Crustacean Biology**, v.37, n.2, p.131-141.

TALAVERA, G., & CASTRESANA, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic biology**, v. 56, n. 4, p. 564-577.

TANABE, A. S. (2007). Kakusan: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 6, p. 962-964.

TAYLOR, J. D., WILLIAMS, S. T., GLOVER, E. A., & DYAL, P. (2007). A molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta): new analyses of 18S and 28S rRNA genes. **Zoologica Scripta**, v. 36, n. 6, p. 587-606.

VAN WORMHOUDT, A., ADJEROUD, M., ROUZÉ, H., & LERAY, M. (2019). Recent and old duplications in crustaceans “Internal Transcribed Spacer 1 ”: structural and phylogenetic implications. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 5, p.5185-5195.

VERA-SILVA, A. L., CARVALHO, F. L., & MANTELATTO, F. L. (2016). Distribution and Genetic Differentiation of *Macrobrachium jelskii* (Natantia: Palaemonidae) in Brazil Reveal Evidence of Non-Natural Introduction and Cryptic Allopatric Speciation. **Journal of Crustacean Biology**, v. 36, n.3, p.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**, v. 4269, n. 1, p.44-60.

VERGAMINI, F. G., PILEGGI, L. G., & MANTELATTO, F. L. (2011). Genetic variability of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, v. 80, n. 1, p.67-83.

WALKER, I., & FERREIRA, M. D. N. (1985). On the population dynamics and ecology of the shrimp species (Crustacea, Decapoda, Natantia) in the Central Amazonian river TarumãMirim. **Oecologia**, v. 66, n. 2, p.264-270.

WEBER F. (1795). **Nomenclator entomologicus secundum entomologia systematicum ill. Fabricii adjectis speciebus recens detectis et varietatibus**. C.E. Bohn, Chilonii (Kiel) et Hamburgii (Hamburg), i–viii, 1–171.

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

WIEGMANN, A. F. A. (1836). Beschreibung einiger neuen Crustaceen des Berliner Museums aus Mexico und Brasilien. **Archiv für Naturgeschichte**, v. 2, n. 1, p. 145-151.

WHITING, M. F., CARPENTER, J. C., WHEELER, Q. D., & WHEELER, W. C. (1997). 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.

WILLIAMS, S. T.; & KNOWLTON, N. (2001). Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 8, p. 1484-1493.

WOOD, L. E., DE GRAVE, S., & DANIELS, S. R. (2019). A comparative evolutionary study reveals radically different scales of genetic structuring within two atyid shrimp species (Crustacea: Decapoda: Atyidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 186, n. 1, p. 200-212.

WOWOR, D., MUTHU, V., MEIER, R., BALKE, M., CAI, Y., & NG, P. K. (2009). Evolution of life history traits in Asian freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) based on multilocus molecular phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.52, n. 2, p.340-350.

ZHANG, D. X.; & HEWITT, G. M. (1997). Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 2, p. 99-120.

ZHANG, J., KAPLI, P., PAVLIDIS, P., & STAMATAKIS, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869-2876.

APÊNDICE – Lista dos haplótipos com as sequências duplicadas e identificação molecular do gene28S. N: Número de sequências que foram identificadas como semelhantes. ARAP: Igarapé do Tucumatuba – rio Amazonas; ISB: Igarapé São Benedito - rio Tapajós; IKM: Igarapé Km115 – rio Tapajós; LJ: Lago do Juá – rio Tapajós; TAP: rio Tapajós; IME: Igarapé Mentai – rio Arapiuns; PN: Porto Novo – Hidrelétrica de Curuá-Una.

HAPLÓTIPOS	N	SEQUÊNCIAS DUPLICADAS	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR 28S
Hap.1	5	ARAP019, ARAP26, ARAP29, ARAP78, ARAP86	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.2	70	ARAP03, ARAP035, ARAP04, ARAP043, ARAP051, ARAP059, ARAP06, ARAP07, ARAP08, ARAP11, ARAP12, ARAP17, ARAP18, ARAP21, ARAP22, ARAP24, ARAP25, ARAP027, ARAP31, ARAP33, ARAP36, ARAP37, ARAP38, ARAP39, ARAP40, ARAP41, ARAP42, ARAP44, ARAP45, ARAP46, ARAP47, ARAP49, ARAP50, ARAP53, ARAP56, ARAP57, ARAP60, ARAP61, ARAP62, ARAP63, ARAP64, ARAP65, ARAP66, ARAP67, ARAP68, ARAP69, ARAP70, ARAP72, ARAP74, ARAP75, ARAP76, ARAP77, ARAP79, ARAP80, ARAP81, ARAP82, ARAP83, ARAP84, ARAP85, ARAP87, ARAP88, ARAP91, ARAP92, ARAP93, ARAP94, ARAP95, ARAP96, ARAP99, ARAP48, IME03	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.3	1	ARAP34	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.4	1	PN-02	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.5	1	ARAP23	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.6	2	ARAP52, ARAP54	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.7	1	ARAP71	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.8	1	ARAP13	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.9	1	ARAP28	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.10	1	ARAP32.	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.11	1	ARAP20	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.12	1	PN-01	<i>Macrobrachium amazonicum</i>

APÊNDICE – Continuação. Lista dos haplótipos com as sequências duplicadas e identificação molecular do gene28S. N: Número de sequências que foram identificadas como semelhantes. ARAP: Igarapé do Tucumatuba – rio Amazonas; ISB: Igarapé São Benedito - rio Tapajós; IKM: Igarapé Km115 – rio Tapajós; LJ: Lago do Juá – rio Tapajós; TAP: rio Tapajós; IME: Igarapé Mentai – rio Arapiuns; PN: Porto Novo – Hidrelétrica de Curuá-Una.

HAPLÓTIPOS	N	SEQUÊNCIAS DUPLICADAS	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR 28S
Hap.13	1	ARAP55	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.14	1	ARAP30	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.15	1	ARAP58	<i>Macrobrachium amazonicum</i>
Hap.16	15	ISB01, ISB03, ISB04, ISB05, ISB07, ISB12, ISB13, ISB14, ISB17, ISB20, ISB21, IME19, ISB19, IME20, ISB09	<i>Pseudopalaemon</i> sp.
Hap.17	5	ISB08, ISB10, ISB11, ISB15, ISB22	<i>Pseudopalaemon</i> sp.
Hap.18	1	IME22	<i>Pseudopalaemon</i> sp.
Hap.19	4	ISB06, ISB16, ISB18, ISB23	<i>Pseudopalaemon</i> sp.
Hap.20	1	ARAP02	<i>Macrobrachium nattereri</i>
Hap.21	1	IME14	<i>Macrobrachium</i> sp.
Hap.22	1	LJ06	<i>Macrobrachium</i> sp.
Hap.23	1	LJ07	<i>Macrobrachium</i> sp.
Hap.24	1	IME15	<i>Macrobrachium</i> sp.
Hap.25	30	IKM01, IKM02, IKM03, IKM05, IKM06, IKM07, IKM08, IKM09, IKM10, IKM11, TAP04, TAP05, TAP06, TAP07, TAP09, TAP14, TAP15, TAP16, TAP17, TAP18, TAP20, TAP22, TAP23, TAP25, TAP30, LJ01, LJ02, LJ03, LJ04, LJ05	<i>Macrobrachium</i> sp.
Hap.26	1	IKM04	<i>Macrobrachium</i> sp.
Hap.27	2	ARAP97, ARAP98.	<i>Palaemon</i> sp.