

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS – CCNE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL**

***Aegla platensis* (Schmitt, 1942): UM COMPLEXO DE  
ESPÉCIES? EVIDÊNCIAS A PARTIR DO GENE  
MITOCONDRIAL COI**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Caroline Bacelar Hauschild**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

***Aegla platensis* (Schmitt, 1942): UM COMPLEXO DE  
ESPÉCIES? EVIDÊNCIAS A PARTIR DO GENE  
MITOCONDRIAL COI**

**Caroline Bacelar Hauschild**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Filogenia, Filogeografia e Evolução Molecular nos Neotrópicos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas - Área Biodiversidade Animal**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos  
Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Santos

Santa Maria, RS, Brasil  
2011

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
Aprova a Dissertação de Mestrado

***Aegla platensis*: UM COMPLEXO DE ESPÉCIES? EVIDÊNCIAS A  
PARTIR DO GENE MITOCONDRIAL COI**

Elaborada por  
**Caroline Bacelar Hauschild**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Biológicas: Área Biodiversidade Animal**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos**  
(Presidente/Orientadora)

  
**Prof. Dr. Alvaro Luiz Diogo Reigada (UNIMES)**

  
**Dr. Maurício Almerão (UFRGS)**

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã e ao meu namorado pela confiança, pelo apoio, pela dedicação e pelo amor que sempre me prestaram.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com a ajuda de muitas pessoas e instituições sem as quais ele sequer teria saído do papel. De coração agradeço a todos vocês.

À Marlise, minha orientadora, por me receber de braços abertos em seu laboratório, pela confiança depositada em mim, pela orientação durante esses dois anos, pelos momentos de incentivo quando algo dava errado e disposição (sempre) em me atender, pela paixão pelo seu trabalho, a qual me contagiou e fizeram-me amar os eglídeos. E principalmente, pela grande contribuição científica e humana que hoje me faz ser uma pesquisadora.

Ao professor Sandro, pelo vasto conhecimento em eglídeos, contribuindo de forma imensurável com este trabalho e pela oportunidade de executar este trabalho sob sua co-orientação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal por oportunizar a realização deste trabalho.

À CAPES que contribuiu com este trabalho com o apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

Ao Dr. Marcos Pérez-Losada por colaborar com este trabalho fornecendo as sequências de 16S, COI e COII para que este trabalho pudesse efetivamente sair do papel, muito obrigada.

Ao professor Élgion pelas inúmeras vezes em que deixou à disposição seu laboratório.

À Liz pela imensa disposição em me ajudar com o PAUP e com o MrBayes até mesmo em suas férias, pelas inúmeras dúvidas sanadas e frequentes ensinamentos, principalmente nos momentos de aperto na reta final.

Ao Ronaldo que sempre me tratou muito bem em todas as vezes que eu fui incomodá-lo para sequenciar minhas amostras de COI.

À Paula Angélica, pelos momentos de descontração durante suas visitas ao laboratório, pelos inúmeros desabafos e pela fundamental ajuda com o Network e o Arlequim.

Aos meus colegas queridos do Lab. DiverGe, Rafa, Jober e Vanessa, pela companhia neste último ano, pelos desabafos, risadas, enfim pelos bons momentos que passamos juntos. Vocês são 10.

À Ana Cristina, que desde a graduação acompanha minha caminhada, me incentivando e acreditando no meu crescimento profissional.

À Rose, pela amizade que construímos durante o mestrado, pelas inúmeras rodas de chimarrão, pelas discussões a respeito da vida de mestrando e pelos desabafos.

Aos antigos e novos Divergianos (Darine, João Vitor, Stela, Thaís, João Henrique, Luciane, Johnny e Cíntia) que fizeram do laboratório um ambiente descontraído e agradável de trabalhar.

À Lucivani pela companhia nos almoços de finais de semana e férias quando tínhamos que trabalhar no laboratório.

Ao pessoal do LabDros que sempre mostraram-se dispostos a me ajudar no que fosse preciso.

Ao pessoal do LabCrust pelos momentos de descontrações e pela companhia nas rodas de chimarrão nos intervalinhos.

Aos meus avós que sempre torceram pelo meu sucesso, me apoiando em mais uma etapa.

Aos meus sogros e cunhado que sempre torceram por mim e me acolheram de braços abertos em seu lar, obrigada pelos ótimos momentos.

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicional que sempre me prestaram.

À Camile, minha irmã, que sempre torceu por minhas vitórias.

Ao Carlinhos, meu leal companheiro, a quem admiro muito. Pelos quase sete anos juntos, acompanhando meus passos e sempre me apoiando nos momentos difíceis. Pela paciência em me ouvir falar e explicar sobre PCRs, haplótipos, análises filogenéticas, mesmo sem entender do que realmente se tratava. Pela compreensão nos dias ausentes, pelo apoio e torcida incondicionais para que eu pudesse realizar este trabalho. Muito obrigada por tudo!

**Muito Obrigada!!!**

*"There are no freshwater Crustacea at  
all like Aeglá anywhere else in the  
world"*

Schmitt, 1942

*"O conhecimento é orgulhoso por ter  
aprendido tanto; a sabedoria é  
humilde por não saber mais"*

William Cowper

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal

Universidade Federal de Santa Maria

### ***Aegla platensis*: UM COMPLEXO DE ESPÉCIES? EVIDÊNCIAS A PARTIR DO GENE MITOCONDRIAL COI**

AUTORA: CAROLINE BACELAR HAUSCHILD

ORIENTADORA: MARLISE LADVOCAT BARTHOLOMEI-SANTOS

CO-ORIENTADOR: SANDRO SANTOS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de fevereiro de 2011

Os eglídeos há muito tempo despertam o interesse dos pesquisadores, pois são os únicos representantes da Infraordem Anomura que ocorrem em águas continentais. Ademais são endêmicos da região tropical/temperada da América do Sul, onde são comumente encontrados. A família Aeglidae compreende cerca de 70 espécies descritas até o momento, destas, aproximadamente 23 ocorrem no Rio Grande do Sul, sendo que *Aegla platensis* é uma das poucas espécies de eglídeos encontrados nas três bacias hidrográficas do RS (Bacia do Guaíba, Bacia do Uruguai e Bacia Litorânea). Devido a sua ampla distribuição decidiu-se investigar o *status* taxonômico de *Aegla platensis* oriundas da Bacia do Uruguai e Bacia do Guaíba. As análises foram realizadas com os genes mitocondriais 16S, COI e COII separadamente e com os dados concatenados dos três genes. As construções filogenéticas de *A. platensis* foram realizadas com os métodos *Neighbor-Joining*, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Bayesiana, os quais apresentaram alto suporte estatístico sugerindo a hipótese de que *A. platensis* constitua um complexo de no mínimo três espécies. Estes dados também são congruentes com as outras análises realizadas neste estudo.

Palavras-chave: Análises filogenéticas. DNA mitocondrial. Aeglidae.



## **ABSTRACT**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal  
Universidade Federal de Santa Maria

### ***Aegla platensis*: a species complex? Evidences from the mitochondrial gene COI**

AUTHOR: CAROLINE BACELAR HAUSCHILD

ADVISER: MARLISE LADVOCAT BARTHOLOMEI-SANTOS

CO-ADVISER: SANDRO SANTOS

Aeglid crabs have attracted researchers because they represent the only anomuran family entirely restricted to continental waters, besides being endemic to the tropical and temperate regions of South America, occurring in streams, creeks, rivers, lagoons and caves. These crabs are becoming more and more restricted to the headwaters due to their necessity of clean and well oxygenated water. The family Aeglididae encompasses about 70 species described up to now, and of these, 23 are found in Rio Grande do Sul state (RS). *Aegla platensis* is one of the few species found in the three hydrographic basins of RS. Due to its broad distribution, this study investigates the taxonomic status of *A. platensis* occurring in Uruguay and Guaíba basins. Analysis were carried out with partial sequences of the mitochondrial genes 16S, COI and COII individually as well as the three genes concatenated. Phylogenetic analysis were performed using Neighbor-Joining, Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, and Bayesian Inference, which presented high statistical supports, suggesting the hypothesis that *A. platensis* may constitute a complex with at least three species. These results are in agreement with the other analyses realized in the present study.

Key-Words: Phylogenetics Analysis. Mitochondrial DNA. Aeglididae.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Populações de <i>A. platensis</i> referentes a cada local de coleta e a cada sub-bacia da Bacia do Rio Uruguai.....	28
Tabela 2 - Populações do Rio Dulce na Argentina e da Bacia do Guaíba no Rio Grande do Sul.....	29
Tabela 3 - Espécies utilizadas como grupo externo e o número de acesso no GenBank.....	30

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Diversidade Nucleotídica e Diversidade Haplotípica.....	45
Tabela 2 – Valores percentuais obtidos pela AMOVA referentes aos genes 16S, COI e COII.....	45

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica de <i>A. platensis</i> .....	20
Figura 2 - Representação dos genes e de sua ordem frequentemente encontrados no DNA mitocondrial de animais.....	24
Figura 3 - <i>Aegla platensis</i> .....	26
Figura 4 - Bacias Hidrográficas do estado do Rio Grande do Sul e suas sub-bacias.... .....	27

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## CAPÍTULO 1

- Figura 1 – Distribuição das frequências intraespecíficas e interespecíficas de distância K2P para os dados concatenados (16S, COI e COII) em comparações pareadas entre as espécies de *Aegla* e entre indivíduos de *A. platensis*.....40
- Figura 2 – Relações filogenéticas dos dados concatenados (16S, COI e COII), representadas por uma árvore consenso obtida através de análise Bayesiana com o tamanho dos ramos representados.....42
- Figura 3 – Análise Bayesiana (BA) representada pelo tamanho dos ramos e pelas populações agrupadas por localidade.....43
- Figura 4 - Rede de haplótipos dos dados concatenados (16S, COI e COII).....47

## LISTA DE APÊNDICES

### CAPÍTULO 1

#### APÊNDICE A

Tabela 1 - Populações de <i>A. platensis</i> referentes a cada local de coleta e a cada sub-bacia da Bacia do Rio Uruguai.....	55
Tabela 2 - Populações do Rio Dulce na Argentina e da Bacia do Guaíba no Rio Grande do Sul.....	55
Tabela 3 - Espécies utilizadas como grupo externo e o número de acesso no GenBank. ....	56
Tabela 4 - Amostras sequenciadas dos genes mitocondriais 16S, COI e COII.....	56

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>1.1 Revisão Bibliográfica</b> .....	31
1.1.1 Caranguejos Eglídeos .....	31
1.1.2 DNA mitocondrial .....	19
<b>1.2 Objetivo Geral</b> .....	21
<b>1.3 Objetivos Específicos</b> .....	21
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	22
<b>2.1 Diagnose da espécie <i>Aegla platensis</i></b> .....	22
<b>2.2 Descrição da área de amostragem</b> .....	22
<b>2.4 Análises moleculares</b> .....	25
2.4.1 <i>Grupo externo</i> (Grupo Externo) .....	25
2.4.2 Análises Moleculares .....	26
2.4.3 Análises Filogenéticas .....	27
<b>3 CAPÍTULO 1</b> .....	29
Resumo .....	31
Introdução .....	31
Materiais e Métodos .....	32
Resultados .....	35
Discussão .....	43
Referências Bibliográficas .....	47
Apêndice A .....	51
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Revisão Bibliográfica

### 1.1.1 Caranguejos Eglídeos

#### 1.1.1.1 Aspectos Taxonômicos e Evolutivos

Os eglídeos são caranguejos da Ordem Decapoda pertencentes à família Aeglidae a qual se configura como a única família da Infraordem Anomura a habitar águas continentais. Além disso, são endêmicos da região tropical/temperada da América do Sul (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994).

O status taxonômico da família Aeglidae tem sido seriamente discutido por alguns autores em relação à inclusão da família Aeglidae na superfamília Galattheoidea (PÉREZ-LOSADA et al., 2002a; PÉREZ-LOSADA et al., 2004; MCLAUGHLIN et al., 2007), principalmente devido aos caracteres morfológicos.

Estes caranguejos se diferenciam evolutivamente das mais de 2.350 espécies de anomuros de vida exclusivamente marinha, lagunar ou estuarina (KAESTNER, 1980; GRAVE et al., 2009), e também, das outras famílias galattheoideas (BOND-BUCKUP, 2003).

Alguns dos caracteres morfológicos exclusivos dos eglídeos que os diferenciam das demais famílias são: as suturas na carapaça, estrutura branquial do tipo tricobrânquia e presença de crista palmar nos quelípodos, a qual é bem desenvolvida em muitas espécies de eglídeos. Além destes caracteres, os machos de eglídeos apresentam a forma dos pleópodos vestigiais, diferentemente dos machos de outros galattheoideas em que os pleópodos são desenvolvidos (MARTIN & ABELE, 1986; PÉREZ-LOSADA et al., 2002a; BOND-BUCKUP, 2003).

Os exemplares da família Aeglidae são caracterizados por possuir carapaça achatada dorsoventralmente, mais larga na região posterior, percorrida



transversalmente por um sulco cervical distinto; região torácica subdividida em uma área cardíaca axial e áreas branquiais subdivididas por uma ou mais linhas transversais e/ou longitudinais; rostro proeminente, geralmente carenado, estendendo-se além do nível dos espinhos ântero-laterais; margem interna do carpo do quelípodo ornada com espinhos (BUCKUP & BOND-BUCKUP, 1999).

Pérez-Losada et al. (2002a) realizaram uma revisão sobre o posicionamento taxonômico de Aeglidae e as relações filogenéticas entre superfamílias da infra-ordem Anomura e sugeriram, a partir da análise de dados moleculares, que o status taxonômico da família Aeglidae deve ser revisado, podendo esta ser considerada como uma superfamília, devido a separação dos eglídeos das outras famílias galatheoideas. Mais recentemente, com base em uma análise cladística, McLaughlin et al. (2007) propõem a mudança no *status* taxonômico dos eglídeos para superfamília Aegloidea.

A família Aeglidae é representada por dois gêneros fósseis e um único gênero vivo (*Aegla*). Os gêneros fósseis possuem um representante cada: *Haumuriaegla glaessneri* com mais de 70 milhões de anos, oriunda de rochas marinhas da Nova Zelândia do Cretáceo Superior, descrita por Feldmann (1984) e *Protaegla miniscula* também proveniente de rochas marinhas do Cretáceo Inferior, no entanto encontrada no México (FELDMANN et al., 1998). O gênero *Aegla* possui cerca de 70 espécies e subespécies descritas até o momento (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994; MCLAUGHLIN et al., 2010).

No Brasil existem cerca de 40 espécies descritas podendo ser encontrados desde o Rio Canoas, que faz fronteira entre o estado de Minas Gerais (município de Claraval) e o estado de São Paulo (município de Franca) (BUENO et al., 2007), até o Rio Grande do Sul (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994). Destas espécies descritas para o Brasil cerca de 36 são consideradas endêmicas da região sul do país, sendo ainda que 23 ocorrem no estado do Rio Grande do Sul (BOND-BUCKUP et al., 2008).

A presença do gênero *Aegla* na América do Sul é discutida primeiramente por Ortmann (1902 apud BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994, p. 163), que argumenta que a distribuição dos eglídeos em ambos os lados dos Andes já ocorria antes do soerguimento da Cordilheira, a partir das evidências da união da América do Sul, Austrália, Nova Zelândia e o Antártico no final do Mesozóico e início do Terciário. O mesmo autor levantou ainda a hipótese de que as espécies chilenas teriam migrado

para o norte da Argentina e sul do Brasil, no início do Terciário, não descartando a ideia de que isto possa ter ocorrido em sentido contrário.

Partindo da hipótese proposta por Ortmann (1902 apud BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994, p. 163) e do registro das espécies fósseis, um estudo filogeográfico utilizando dados moleculares relaciona a distribuição de eglídeos aos eventos geológicos que causaram a inversão das drenagens de rios na América do Sul meridional (Pérez-Losada et al., 2004). Este amplo estudo filogenético dá suporte à hipótese de origem marinha via Pacífico, para os eglídeos, com subsequente dispersão para o leste do continente sul-americano.

Portanto, as espécies do gênero *Aegla* apresentam uma estrutura filogeográfica separando-as em dois principais grupos: o das espécies chilenas e do sul da Argentina, e o outro compreende as espécies do norte da Argentina, do Uruguai e do Brasil (Pérez-Losada et al., 2004).

#### 1.1.1.2 Aspectos Biológicos e Ecológicos

Os eglídeos distribuem-se pelas bacias do Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e centro-sul do Chile podendo ser encontrados desde profundidades de 320 metros em lagos chilenos e a 4500 metros de altitude no noroeste argentino (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994).

Estes caranguejos de água doce possuem hábitos bentônicos sendo encontrados sob detritos vegetais ou enterrados no substrato arenoso; sua dieta consiste de detritos vegetais e larvas aquáticas de insetos (MAGNI & PY-DANIEL, 1989; BOND-BUCKUP, 2003; BUENO & BOND-BUCKUP, 2004; SANTOS et al., 2008). Representam um elo nas relações tróficas dos ambientes límnicos onde servem de alimento para rãs, peixes, aves (ARENAS, 1976), jacarés (BUENO & BOND-BUCKUP, 2004), lontras (CASSINI et al., 2009) e por se alimentarem de larvas de simúlídeos hematófagos (MAGNI & PY-DANIEL, 1989; BOND-BUCKUP, 2003).

Habitam locais em que a água é límpida e bem oxigenada (FERREIRA et al., 2005), sendo que seu hábitat está cada vez mais restrito às nascentes devido principalmente às práticas de silvicultura, como a produção de *Pinus* e eucalipto na

região Sul do Brasil, além do uso demasiado de pesticidas na agricultura e o da criação de suínos (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994; BOND-BUCKUP et al., 2008). Em vista disso, muitas das espécies conhecidas encontram-se ameaçadas, alocadas nas categorias de criticamente em perigo, em perigo e vulnerável (MARQUES et al., 2002; PÉREZ-LOSADA et al., 2009).

Os eglídeos adultos podem chegar a medir até 60 mm de comprimento de carapaça. A coloração varia de acordo com o substrato em que vivem, geralmente de marrom esverdeado a preto, no entanto, podem ser encontrados espécimes de cor azul, amarelo, laranja e vermelho (JARA, 1989).

São organismos dióicos; nos machos os pleópodos são vestigiais e o poro genital se abre na coxa do quinto par de pereiópodos enquanto que nas fêmeas o poro genital se abre na coxa do terceiro pereiópodo (MARTIN & ABELE, 1988).

A fecundidade depende do tamanho da fêmea variando de 120 (BAHAMONDE & LÓPEZ, 1961) a 1043 ovos que medem de 1,00 mm a 1,37 mm (JARA, 1977). A desova ocorre principalmente no outono, mas em algumas espécies pode ocorrer durante todo o ano (BAHAMONDE & LÓPEZ, 1961; RODRIGUEZ & HEBLING, 1978; BUENO & BOND-BUCKUP, 2000). As fêmeas produzem uma prole por ano, sendo que o fim do período de incubação dos ovos acontece entre o quarto e oitavo mês (BOND-BUCKUP et al., 2008). Possuem desenvolvimento direto e não possuem estágio larval (BOND-BUCKUP et al., 1999), e nascem com cerca de 1,13 mm a 1,58 mm CL (comprimento da carapaça) dependendo da espécie (BOND-BUCKUP et al., 1999).

Os juvenis possuem incubação assíncrona e permanecem com a mãe até o terceiro ou quarto dia de vida. Após esta fase é observado um comportamento gregário, em que grupos de três a sete juvenis se agarram uns aos outros pelos pereiópodos (GRECO et al., 2004).

### 1.1.1.3 *Aegla platensis* Schmitt, 1942

#### 1.1.1.3.1 Distribuição Geográfica

A espécie *Aegla platensis* é amplamente distribuída (MORRONE & LOPRETTO, 1994) sendo encontrada na Argentina (norte e centro da Província de Buenos Aires, leste da Província de Tucumán, sudeste da Província de Catamarca e sudoeste da Província de Misiones), no Brasil (sudoeste do estado de Santa Catarina e estado do Rio Grande do Sul, exceto ao nordeste), no Paraguai (Colônia Independência) e no Uruguai (Departamentos de Colônia e Canelones) (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994) (Figura 1).



Figura 1 – Mapa da distribuição geográfica de *A. platensis*

Fonte: Bond-Buckup, 2003

#### 1.1.1.3.2 Aspectos Ecológicos

Devido ao fato de *A. platensis* possuir ampla distribuição, seus aspectos biológicos, ecológicos, morfológicos e comportamentais são muito estudados, além de ser considerada um bom modelo experimental (BUENO et al., 2000; BUENO & BOND-BUCKUP, 2000; BUENO & BOND-BUCKUP, 2004; ALMERÃO et al., 2007; ALMERÃO et al., 2010).

Esta espécie é considerada onívora, generalista e oportunista, pois se alimenta de acordo com a disponibilidade de recursos no ambiente, no entanto os adultos e juvenis possuem hábitos alimentares diferentes (BUENO & BOND-BUCKUP, 2004).

Tanto adultos e juvenis de *A. platensis* apresentam preferência alimentar por fragmentos de plantas, sendo este conteúdo alimentar encontrado mais frequentemente nos estômagos de juvenis. Além disso, esta espécie apresenta uma preferência por insetos em sua forma imatura de pupa, ninfa ou larva (BUENO & BOND-BUCKUP, 2004).

Identificou-se para indivíduos de *A. platensis* oriundos do Arroio Mineiro no estado do Rio Grande do Sul/Brasil que a variação sazonal interfere no grau de repleção (DF) do estômago apresentando altos valores durante o outono. Este resultado coincide com o fato de haver maior diversidade de recursos alimentares disponíveis nesta época e provavelmente também esteja associado à reprodução, período este em que há grande gasto energético havendo uma maior necessidade de se acumular energia (BUENO & BOND-BUCKUP, 2003). Este mesmo estudo verificou ainda em relação à variação diária, que os valores de DF apresentaram-se mais altos às 24 horas, indicando uma tendência ao forrageamento noturno.

#### 1.1.1.3.3 Aspectos Reprodutivos

Em um estudo sobre a dinâmica populacional de *A. platensis* utilizando populações oriundas do Arroio Mineiro/RS constatou-se que o período reprodutivo desta espécie estende-se por todo o ano, no entanto apresenta um pico reprodutivo

no mês de julho (BUENO & BOND-BUCKUP, 2000). Este mesmo estudo atribui o período prolongado de reprodução às condições favoráveis como temperaturas de 13°C no inverno e 22°C no verão, consideradas amenas, à abundância de recursos alimentares e às águas límpidas.

As fêmeas ovígeras de *A. platensis* parecem apresentar preferência por locais em que as margens são próximas à vegetação enquanto os juvenis preferem locais com pouca correnteza e substrato de areia mais fina e que após completar um ano de idade os juvenis já se reproduzem (BUENO & BOND-BUCKUP, 2000).

Bueno et al. (2000) consideram que esta espécie possui crescimento indeterminado sofrendo ecdises contínuas após a puberdade, mas tal inferência não pode ser generalizada para todo o gênero, devido ao fato de o táxon ser muito heterogêneo em relação ao crescimento. O grau de heteroquilia para os machos neste estudo foi de 36,5% para a quela esquerda, sendo que 43% apresentaram as quelas iguais, e 51,7% das fêmeas apresentaram as quelas do mesmo tamanho. A heteroquilia pode estar relacionada ao uso diferencial dos quelípodos, ou estar relacionada ainda ao fato de que quando a maior quela é perdida, durante a regeneração ela pode se tornar menor. Os indivíduos desta espécie vivem cerca de dois anos e meio (BUENO & BOND-BUCKUP, 2000).

#### 1.1.1.3.4 Aspectos Taxonômicos e Evolutivos

Em um estudo filogeográfico do gênero *Aegla*, realizado por Pérez-Losada et al. (2004), as análises baseadas em genes mitocondriais sugeriram que *A. platensis* seja uma “entidade evolutiva” composta por linhagens parafiléticas, ou seja, que não possuem o mesmo ancestral comum.

Ridley (2006) discute que membros de uma espécie diferem de outras espécies genética e ecologicamente, entre outros aspectos, como comportamento e morfologia.

As Bacias Hidrográficas do Rio Grande do Sul estão isoladas, de tal forma que o fluxo gênico entre suas populações de eglídeos deve ter cessado há bastante tempo, podendo ter dado início a um processo de especiação. Tal hipótese pode ser

investigada em relação às populações de *A. platensis*, uma vez que se encontram em Bacias Hidrográficas isoladas geograficamente.

O processo de diferenciação genética também pode estar ocorrendo entre populações de uma mesma bacia por isolamento entre as populações devido a uma possível baixa capacidade de dispersão dos eglídeos, ou ainda, devido à fragmentação dos habitats causada pela ação antrópica, embora neste último caso a diferenciação não seja suficiente para levar à especiação, devido ao pouco tempo de divergência.

### 1.1.2 DNA mitocondrial

A investigação da variabilidade genética em populações pode ser utilizada para inferir o quanto duas ou mais populações de uma espécie estão diferindo geneticamente entre si. Essa variabilidade pode ser acessada utilizando-se marcadores moleculares, os quais são locos que podem diferir em suas taxas de substituição/evolução, de modo que através de uma escolha criteriosa desses marcadores é possível identificar indivíduos, espécies ou até mesmo formular hipóteses filogenéticas em grupos supra-específicos (MATIOLI, 2001).

Nas últimas três décadas o DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido extensivamente utilizado em muitos estudos de estrutura populacional, relações filogenéticas e nos entendimentos de aspectos ecológicos e biológicos de muitos organismos (AVISE, 1994; BOORE, 1999; BALLARD & WHITLOCK, 2004).

O mtDNA representa cerca de 1 a 2% do DNA celular em duplo filamento circular. Geralmente o DNA mitocondrial em animais é quase sempre uma molécula circular fechada, pequena, possuindo em torno de 15 a 20 kb, contendo em seu genoma 37 genes. Destes, somente 13 são genes codificadores de proteínas, 22 para RNA transportadores e dois para subunidades ribossômicas, sendo que codificam somente 5% dos produtos necessários para o funcionamento da mitocôndria, os demais sendo codificados pelo DNA nuclear (BOORE, 1999).

O genoma mitocondrial possui altas taxas de substituição, ou seja, evolui mais rápido que o genoma nuclear, tornando-se apto para se trabalhar com táxons mais derivados e próximos (MATIOLI, 2001; ALBERTS et al., 2004).

Além disso, apresenta herança materna e ausência de recombinação, o conteúdo gênico é bastante conservado, e a ordem em que esses genes se encontram organizados no genoma também costuma ser conservada (Figura 2) (ARIAS et al., 2003).

Os genes rDNA 16S, e os genes codificadores de proteínas Citocromo c oxidase subunidade I e II (COI e COII) têm sido extensivamente utilizados para responder questões filogenéticas entre grupos de crustáceos (COX & HEBERT, 2001; DANIELS et al., 2002; PÉREZ-LOSADA et al., 2002b; PÉREZ-LOSADA et al., 2002c; LIU et al., 2007; COSTA et al., 2007; BUCKLIN et al., 2007; WILSON et al., 2009; SOTELO et al., 2009).

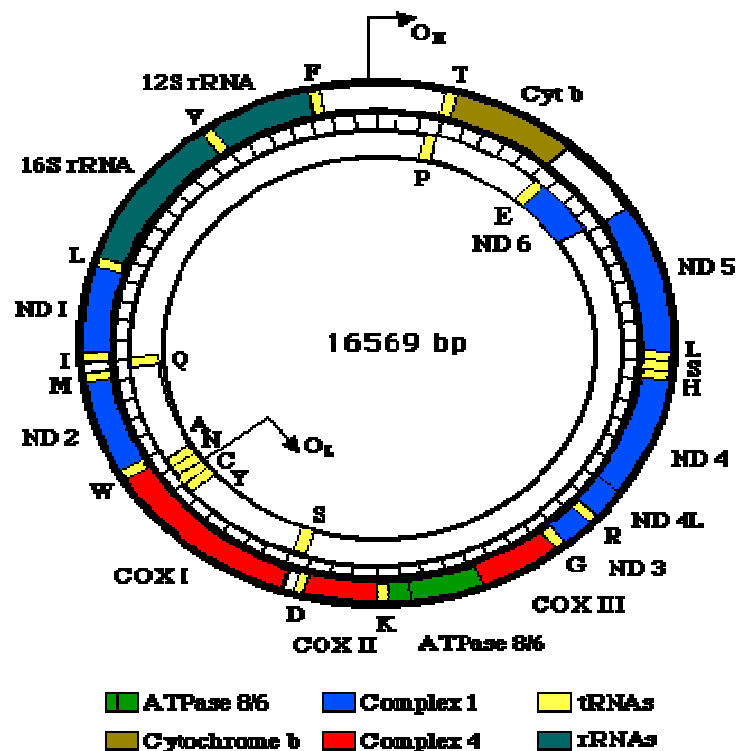


Figura 2 - Representação dos genes e de sua ordem frequentemente encontrados no DNA mitocondrial de animais



## 1.2 Objetivo Geral

- Contribuir para a determinação do *status* taxonômico de populações de *Aegla platensis*, oriundas da Bacia Hidrográfica do Rio Uruguai e da Bacia do Rio Guaíba, no estado do Rio Grande do Sul, utilizando os genes mitocondriais 16S, COI e COII.

## 1.3 Objetivos Específicos

- Verificar o nível de diferenciação genética entre populações de *Aegla platensis*, coletadas em diferentes rios;
- Verificar o padrão de distribuição geográfica da variação genética encontrada;
- Avaliar as relações filogenéticas entre as populações estudadas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Diagnose da espécie *Aegla platensis*

Carapaça moderadamente achatada, regiões branquiais expandidas, espinho ântero-lateral da carapaça alcançando a metade da córnea; lobos protogástricos moderadamente elevados; rostro muito longo nos adultos, tendendo a estiliforme, elevado, reto, carenado em todo o seu comprimento; carena rostral com três a quatro fileiras irregulares de escamas, tornando-se mais espaçadas na porção distal; ângulo látero-dorsal da segunda pleura com espinho; quarto esternito torácico elevado medianamente com escama; margem externa proximal do dedo móvel do quelípodo com lobo com tubérculo; crista palmar retangular pouco desenvolvida; margem interna da face ventral do ísquio do quelípodo inerte (BOND-BUCKUP, 2003, p. 90).

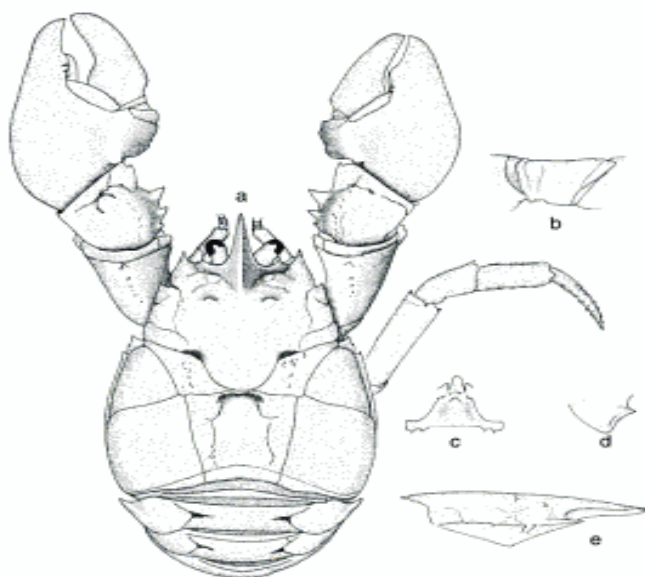


Figura 3 – Desenho de um exemplar macho de *Aegla platensis* - **a**: vista dorsal; **b**: base-ísquio do quelípodo (vista lateral); **c**: terceiro e quarto esternitos torácicos (vista ventral); **d**: epímero 2 (vista lateral); **e**: porção lateral da carapaça (vista lateral).

Fonte: Bond-Buckup, 2003.

## 2.2 Locais de Coleta

O Rio Grande do Sul é formado por três grandes bacias hidrográficas: a Bacia do Rio Uruguai (faz parte da Bacia do Rio da Prata) que abrange cerca de 60% da área total do Estado; a Bacia do Rio Guaíba com 30% do total e a Bacia Litorânea com 13% do total (ATLAS SOCIOECONÔMICO DO RS). A maioria das espécies está restrita a uma única bacia, no entanto, uma das poucas espécies que ocorre em ambas as três bacias é a *Aegla platensis* (SANTOS et al., 2009; BOND-BUCKUP et al., 2010).

Apenas os exemplares de *A. platensis* oriundos da Bacia do Rio Uruguai foram coletados para este estudo, os quais são oriundos de rios e arroios de cinco sub-bacias desta bacia (Figura 4). Cada rio e arroio em que os exemplares foram coletados foram considerados como sendo uma população (Tabela 1).

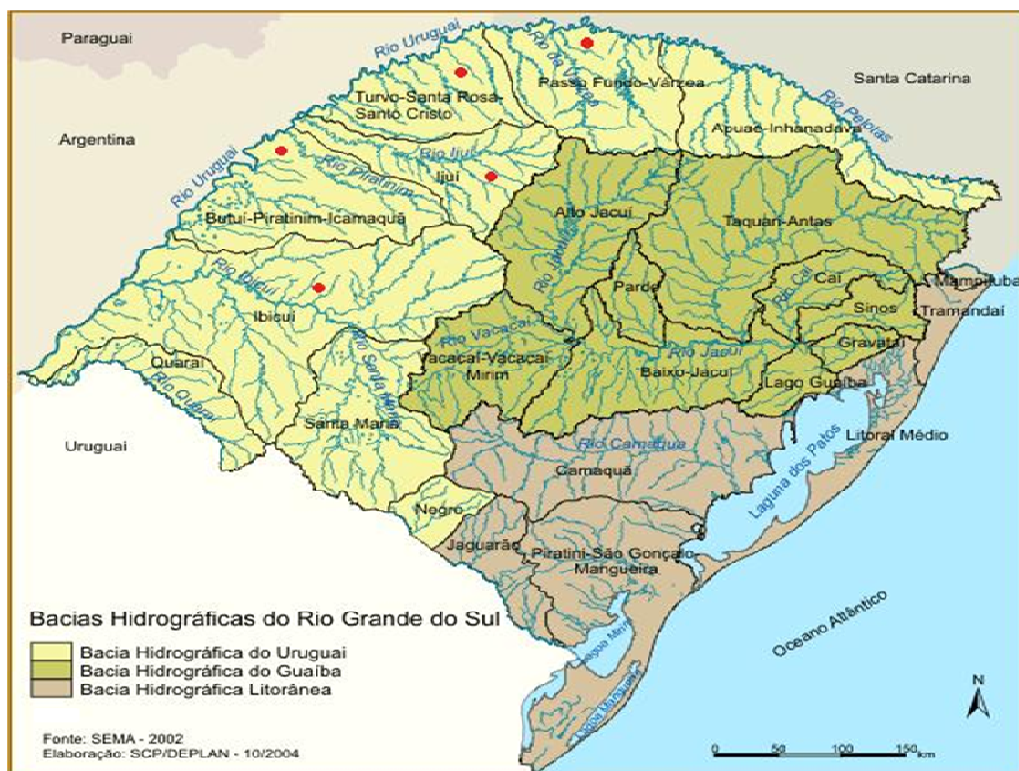


Figura 4 – Mapa das Bacias Hidrográficas do estado do Rio Grande do Sul com suas respectivas sub-bacias. Os pontos vermelhos (●) são referentes às sub-bacias em que os exemplares de *Aegla platensis* foram coletados.

Além dos espécimes de *A. platensis* oriundos da Bacia do Rio Uruguai foram utilizados exemplares do Rio Demétrio pertencentes à Bacia do Guaíba e dos arroios Vipos e Membrillos pertencentes ao Rio Dulce no Noroeste da Argentina. As sequências referentes às populações da Argentina e da Bacia do Guaíba no Rio Grande do Sul/Brasil foram obtidas no banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabela 2).

Tabelas 1 – Locais de coleta na Bacia do Uruguai, com suas respectivas coordenadas geográficas e número de indivíduos referentes a cada população (N).

<b>Locais de Coleta – População (Sub-bacia)</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>	<b>N</b>
Rio Rosário (Ibicuí)	29°07'39"S, 54°48'48"W	2
Rio Curussu (Ibicuí)	29°33'29"S, 54°51'39"W	2
Rio Itu (Ibicuí)	29°17'22"S, 54°57'08"W	2
Rio Icamaquãzinho (Butuí)	28°46'36"S, 54°55'57"W	2
Rio Taquarembó (Butuí)	28°52'31"S, 54°56'23"W	2
Rio Itacurubi (Butuí)	28°56'31"S, 55°01'58"W	2
Rio Piratini (Butuí)	28°27'06"S, 54°57'27"W	2
Rio Catuípe (Butuí)	28°14'43"S, 54°06'59"W	2
Arroio Santa Bárbara (Ijuí)	28°15'53"S, 54°12'26"W	2
Rio Guarani (Ijuí)	28°10'58"S, 54°31'33"W	2
Rio Alegre (Ijuí)	28°12'40"S, 53°30'15"W	2
Rio Cachoeira (Ijuí)	28°14'21"S, 53°45'12"W	2
Rio Conceição (Ijuí)	28°27'49"S, 53°57'19"W	2
Rio Potiribú (Ijuí)	28°33'29"S, 53°36'35"W	2
Rio Comandai (Turvo)	27°57'56"S, 54°52'44"W	2
Arroio Butiá (Turvo)	28°01'18"S, 54°53'17"W	2
Rio Passo Fundo (Passo Fundo)	28°14'06"S, 52°24'54"W	3

Tabela 2 – Número de acesso no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) das populações localizadas fora da Bacia Hidrográfica do Rio Uruguai .

Populações	Número de acesso		
	16S	COI	COII
ARGENTINA	AY595917.1	AY595663.1	AY595788.1
	AY595916.1	AY595662.1	AY595787.1
	AY595805.1	AY595551.1	AY595676.1
GUAÍBA	AY595804.1	AY595550.1	AY595675.1
	AY595803.1	AY595549.1	AY595674.1

### 2.3 Coleta de indivíduos

Foram coletados dois a três indivíduos de cada população. A coleta foi realizada com auxílio de armadilhas confeccionadas com garrafa PET, tendo como conteúdo isca de fígado bovino como atrativo aos animais. Utilizou-se também um puçá de 30 cm X 50 cm de boca, com profundidade de 60 cm e malha de 1,0 mm, colocado estrategicamente para que os animais fossem carregados pela correnteza quando houvesse o revolvimento do substrato. Coleta manual com a remoção cuidadosa de pedras também foi realizada.

Os indivíduos foram triados, fixados em álcool 96 GL nos locais de coleta, sendo posteriormente identificados em laboratório de acordo com Bond-Buckup & Buckup (1994).

### 2.4 Análises moleculares

#### 2.4.1 Grupo Externo

Foram utilizadas quatro espécies mais próximas filogeneticamente de *Aegla platensis* como grupo externo: *Aegla uruguayana*, *Aegla rossiana*, *Aegla intercalata*

e *Aegla prado*. A espécie *Aegla singularis* também foi utilizada nas análises devido ao fato de agrupar juntamente com linhagens de *Aegla platensis*, podendo ser consideradas espécies irmãs (PÉREZ-LOSADA et al., 2004). As sequências referentes a estas espécies foram obtidas no banco de dados GenBank (Tabela 3).

Tabela 3 - Espécies utilizadas como grupo externo e o número de acesso no GenBank.

Espécies	Número de acesso GenBank		
	16S	COI	COII
<i>Aegla uruguayana</i>	AY595885.1	AY595631.1	AY595756.1
	AY595886.1	AY595632.1	AY595757.1
<i>Aegla rossiana</i>	AY595877.1	AY595623.1	AY595748.1
	AY595878.1	AY595624.1	AY595749.1
<i>Aegla intercalata</i>	AY595918.1	AY595664.1	AY595789.1
	AY595919.1	AY595665.1	AY595790.1
	AY595920.1	AY595666.1	AY595791.1
<i>Aegla prado</i>	AY595887.1	AY595634.1	AY595758.1
	AY595888.1	AY595633.1	AY595759.1
<i>Aegla singularis</i>	AY595868.1	AY595614.1	AY595739.1

#### 2.4.2 Extração, amplificação e sequenciamento

A extração de DNA, amplificação e sequenciamento dos genes mitocondriais 16S, COI e COII foram realizados pelo laboratório do Dr. Keith Crandall, Brigham Young University, USA, segundo protocolo previamente estabelecido (PÉREZ-LOSADA et al., 2004).

### 2.4.3 Análises Filogenéticas

#### 2.4.3.1 Alinhamento e Concatenação

Os dados foram concatenados no programa PhyCon segundo os parâmetros “*default*” do sistema (YOTOKO et al., 2007).

Foi realizado um alinhamento automático pelo ClustalW implementado no programa MEGA 4.0.2 (TAMURA et al., 2007), seguida por uma inspeção manual para verificar possíveis erros de alinhamento.

#### 2.4.3.2 Construção de Árvores por diferentes Métodos

As árvores foram construídas para cada gene separadamente e com os dados concatenados. Para as análises com os dados concatenados foram excluídas algumas amostras devido à falta de mais de um dos genes sequenciados. No entanto, para as amostras em que um dos marcadores estava faltando, se utilizou do critério de colocar “N” em todo o comprimento da sequência, desde que esta adição não ultrapassasse 25% da sequência concatenada.

Para a construção das árvores foram utilizados quatro métodos: 1) *Neighbor Joining* (NJ) (SAITOU & NEI, 1987), usando como modelo de distância Kimura-2-Parâmetros (K2P) implementado no programa Mega 4.0.2 (TAMURA et al., 2007) com 1000 réplicas de *bootstrap*; 2) método de Máxima Parcimônia (MP), com busca heurística com adição randômica de amostras com rearranjos de bissecção-reconexão da árvore (TBR - *Tree Bisection and Reconnection*), implementado no PAUP 4.0b1 (SWOFFORD, 2003) com 1000 réplicas de *bootstrap*; 3) método de Máxima Verossimilhança (MV), segundo o modelo indicado pelo ModelTest (POSADA & CRANDALL, 1998) com busca heurística com adição randômica de amostras com rearranjos de bissecção-reconexão da árvore (*TBR - Tree Bisection and Reconnection*) realizado no PAUP 4.0b1 com 100 réplicas de *bootstrap*; e 4) Análise Bayesiana (BA), segundo o modelo indicado pelo MrModelTest

(NYLANDER, 2004) realizada no programa MrBayes (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) com probabilidade posterior de 1.000.000 gerações.

#### 2.4.3.3 Análise Populacional de *Aegla platensis*

As análises populacionais foram realizadas para cada um dos genes. Os índices de diversidade (diversidade haplotípica e nucleotídica), diferenciação genética, divergência entre populações, Teste D de Tajima (TAJIMA, 1989) e Teste de Fu (FU, 1997) foram calculados no programa DnaSP v. 5 (LIBRADO & ROZAS, 2009).

As análises hierárquicas da diversidade genética das populações foram investigadas através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) para cada gene isoladamente (16S, COI e COII). Tais análises foram realizadas levando-se em consideração os agrupamentos por localidade (sub-bacias e bacias), sendo, portanto as populações divididas em sete grupos: Argentina (população do Rio Doce na Argentina), Guaíba (população do Rio Demétrio da Bacia do Guaíba), Butuí, Ijuí, Ibicuí, Passo Fundo e Turvo, sendo estes cinco últimos grupos referentes às populações das sub-bacias da Bacia do Rio Uruguai.

O programa Network v. 4.6 (FLUXUS TECHNOLOGY LTD., 2010) foi utilizado para representar a mais provável relação entre os haplótipos para os dados concatenados, para isto a rede de distância foi calculada com o algoritmo *Median Joining* (BANDELT et al., 1999).



### **3 CAPÍTULO 1**

ARTIGO *Aegla platensis* (SCHMITT, 1942): a species complex? Evidences from mitochondrial 16S, COI and COII genes.

*Aegla platensis* (SCHMITT, 1942): a species complex? Evidences from mitochondrial 16S, COI and COII genes

Caroline Bacelar Hauschild<sup>1</sup>, Sandro Santos<sup>1,2</sup>, Marlise Ladvoat Bartholomei-Santos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

Corresponding author: marliselbs@gmail.com

Laboratório de Diversidade Genética - DiverGe

Departamento de Biologia, sala 1140-H, prédio 17

Universidade Federal de Santa Maria

Av. Roraima, n° 1000, Camobi

97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

Fone: +55 55 3220 8665 e 3220 8629

Sub-ramal: 25

## Resumo

Os eglídeos pertencem à única família de caranguejos anomuros a habitar águas continentais além de serem endêmicos da região subtropical e temperada da América do Sul. A espécie *Aegla platensis* é amplamente distribuída sendo encontrada nas três bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul. Sua ampla distribuição tem ocasionado dúvidas a respeito de seu *status* taxonômico. Populações de *A. platensis* oriundas da Bacia do Uruguai e da bacia do Guaíba são isoladas por uma barreira geográfica conhecida como Serra do Pinhal. Análises de *Neighbor-Joining*, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, Bayesiana e uma rede de haplótipos construída com os genes 16S, COI e COII concatenados, mostram uma clara separação entre os indivíduos da Bacia do Uruguai e da Bacia do Guaíba. Os espécimes oriundos da Bacia do Guaíba e das populações Itu, Vipos e Membrillos mostraram-se divergentes as demais, constituindo assim exemplares que não pertencem à espécie *A. platensis* e sim a novas espécies.

## Introdução

Os eglídeos são caranguejos anomuros pertencentes à superfamília Aegloidea, a qual possui uma única família (Aeglidae) e um único gênero vivo (*Aegla*). A família Aeglidae desperta grande interesse nos pesquisadores, tal interesse deve-se principalmente por possuir características morfológicas que diferem estes caranguejos dos outros anomuros, por ser endêmica da região subtropical e temperada da América do Sul e por ser a única família anomura a ser encontrada em águas continentais (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994).

Além disso, muitas espécies conhecidas encontram-se ameaçadas, alocadas na categoria de criticamente em perigo, em perigo e vulnerável (MARQUES et al., 2002; PÉREZ-LOSADA et al., 2009).

O gênero *Aegla* é representado por cerca de 70 espécies e subespécies descritas, sendo que 23 ocorrem no estado do Rio Grande do Sul. A espécie *Aegla platensis* está amplamente distribuída e no estado do Rio Grande do Sul pode ser encontrada nas três grandes bacias hidrográficas, a Bacia do Rio Uruguai, Bacia do

Rio Guaíba e Bacia Litorânea, o que ocorre somente com outras duas espécies de eglídeos (SANTOS et al., 2009; BOND-BUCKUP et al, 2010).

O *status* taxonômico de *A. platensis* até o momento está indefinido. Em um estudo filogeográfico da família Aeglidae realizado por Pérez-Losada et al. (2004) sugeriram que *A. platensis* seja uma “entidade evolutiva” composta por linhagens parafiléticas, ou seja não possuem o mesmo ancestral comum. Além disso, análises morfológicas de espécimes de diferentes locais mostraram variações entre as localidades, também sugerindo a possibilidade de que *A. platensis* seja realmente um complexo de espécie composto por diversas espécies ou uma espécie composta por diversas subespécies (SANDRO SANTOS, dados não publicados).

As populações de *A. platensis* que se encontram na Bacia do Rio Uruguai e na Bacia do Rio Guaíba estão isoladas devido a uma barreira geográfica originada por uma placa tectônica que soergueu o planalto (AB’SABER, 1970) dando origem a um divisor de águas de 11 milhões de anos, conhecido como a Serra do Pinhal (PEREIRA et al., 1989). Esta barreira pode ter sido suficiente para que se originasse um processo de especiação entre populações oriundas de bacias diferentes.

Portanto, o presente estudo tem o objetivo de contribuir para a determinação do *status* taxonômico de populações de *Aegla platensis*, oriundas da Bacia Hidrográfica do Rio Uruguai e da Bacia do Rio Guaíba, no estado do Rio Grande do Sul, juntamente com algumas amostras da Argentina, utilizando os genes mitocondriais 16S, COI e COII.

## **Materiais e Métodos**

### **Amostragem e locais de coleta**

Foram coletados 35 espécimes de *Aegla platensis* em rios e arroios de cinco sub-bacias da Bacia Hidrográfica do Rio Uruguai. Cada local de coleta foi considerado como sendo uma população (Apêndice A, Tabela1).

Além dos espécimes coletados na Bacia do Rio Uruguai foram utilizadas sequências do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) referentes a exemplares do Rio Demétrio da Bacia do Guaíba no estado do Rio Grande do Sul/Brasil e do arroios Vipos e Membrillos do Rio Dulce no noroeste da Argentina (Apêndice A, Tabela 2). Foram utilizadas quatro espécies como *grupo externo*

(grupo externo): *Aegla uruguayana*, *Aegla rossiana*, *Aegla intercalata* e *Aegla prado*, além da espécie *Aegla singularis* que também foi utilizada nas análises devido ao fato de agrupar juntamente com espécimes de *Aegla platensis*, podendo ser consideradas como espécies-irmãs (PÉREZ-LOSADA et al., 2004). As sequências referentes a estas espécies foram obtidas no banco de dados GenBank (Apêndice A, Tabela 3).

Os exemplares foram coletados com auxílio de armadilhas contendo isca de fígado bovino, puçá e também foi realizada coleta manual.

Os indivíduos foram triados, fixados em álcool 96 GL e previamente identificados ainda nos locais de coleta. Em laboratório, os espécimes foram identificados de acordo com Bond-Buckup & Buckup (1994).

### Análises Moleculares

O DNA das amostras coletadas foi sequenciado para os genes mitocondriais 16S, COI e COII pelo laboratório do Dr. Keith Crandall, Brigham Young University, USA (Apêndice A, Tabela 4), segundo protocolo previamente estabelecido (PÉREZ-LOSADA et al., 2004).

### Concatenação dos Dados e Alinhamento de Sequências

Os dados foram concatenados no programa PhyCon segundo os parâmetros “*default*” do sistema (YOTOKO et al., 2007). As sequências foram alinhadas na interface do ClustalW implementada no programa MEGA 4.0.2 (TAMURA et al., 2007) segundo os parâmetros “*default*” do sistema para sequências nucleotídicas, seguida por uma inspeção manual para verificar possíveis erros de alinhamento.

### Construção de Árvores por diferentes Métodos

As árvores foram construídas para cada gene individualmente e com os dados concatenados. Para as análises com os dados concatenados foram excluídas algumas amostras devido à falta de mais de um dos genes sequenciados. No entanto, no caso de algumas amostras em que faltava um dos marcadores, utilizou-

se o critério de colocar apenas “N” em todo o comprimento da sequência somente quando esta adição não ultrapassasse 25% da sequência concatenada.

Para verificar as distâncias intraespecíficas e interespecíficas foi utilizado o modelo Kimura-2-Parâmetros o qual foi implementado no programa Mega 4.0.2 (TAMURA et al., 2007).

Método de Distância - *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU & NEI, 1987) – utilizou o modelo de distância K2P (Kimura-2-Parâmetros) implementado no programa Mega 4.0.2 (TAMURA et al., 2007) e a confiabilidade foi medida pelo teste de *bootstrap* com 1000 replicações.

*Máxima Parcimônia* (MP) – foi conduzido com busca heurística com 10 replicações adição randômica seguida de rearranjos de bissecção-reconexão da árvore (TBR - *Tree Bisection and Reconnection*) e a confiabilidade foi medida pela utilização do teste de *bootstrap* com 1000 réplicas de acordo com parâmetros utilizados por Pérez-Losada et al. (2004). As árvores igualmente parcimoniosas foram submetidas a um consenso estrito, sendo executado no programa PAUP 4.0b1 (SWOFFORD, 2003).

*Máxima Verossimilhança* (MV) – executada segundo o modelo evolutivo HKY+I+G indicado pelo ModelTest (POSADA & CRANDALL, 1998) através do critério de informação Akaike (AIC) (AKAIKE, 1974), com busca heurística com adição randômica de amostras com rearranjos de bissecção-reconexão da árvore (TBR - *Tree Bisection and Reconnection*), com confiabilidade de 100 réplicas de *bootstrap*, realizado no PAUP 4.0b1 (SWOFFORD, 2003).

*Análise Bayesiana* (BA) – realizada de acordo com o modelo evolutivo HKY+I+G indicado pelo MrModelTest (NYLANDER, 2004), executada no programa MrBayes (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003), com probabilidade posterior de 1.000.000 de gerações. A análise Bayesiana iniciou gerando árvores aleatórias que foram amostradas a cada 100 gerações, e 25% das árvores foram descartadas como *burn-in*.

#### Análise Populacional de *Aegla platensis*

As análises populacionais foram realizadas para cada um dos genes. Os índices de diversidade (diversidade haplotípica e nucleotídica), diferenciação genética, divergência entre populações, Teste D de Tajima (TAJIMA, 1989) e Teste

de Fu (FU, 1997) foram calculados no programa DnaSP (LIBRADO & ROZAS, 2009).

As análises hierárquicas da diversidade genética das populações foram investigadas através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) para cada gene isoladamente (16S, COI e COII). Tais análises foram realizadas levando-se em consideração os agrupamentos por localidade (sub-bacias e bacias), sendo, portanto as populações divididas em sete grupos: Argentina (população do Rio Doce na Argentina), Guaíba (população do Rio Demétrio da Bacia do Guaíba), Butuí, Ijuí, Ibicuí, Passo Fundo e Turvo, sendo estes cinco últimos grupos referentes às populações das sub-bacias da Bacia do Rio Uruguai.

O programa Network v. 4.6 (FLUXUS TECHNOLOGY LTD., 2010) foi utilizado para representar a mais provável relação entre os haplótipos para os dados concatenados, para isto a rede de distância foi calculada com o algoritmo *Median Joining* (BANDELT et al., 1999).

## Resultados

### Análises Filogenéticas

Foram utilizadas 44 sequências na análise com os dados concatenados incluindo as espécies do grupo externo. As análises realizadas para cada gene separadamente apresentaram topologias semelhantes às análises com dados concatenados, e dessa forma, somente foram apresentadas as últimas análises. Para a realização das análises foram consideradas 17 populações de *Aegla platensis* referentes à Bacia do Uruguai, uma da Bacia do Rio Guaíba e duas do Rio Dulce do noroeste da Argentina. Os dados concatenados geraram um produto de 1872 pb, com 261 sítios parcimoniosamente informativos. As frequências nucleotídicas foram significativamente diferentes A= 33,0, C=14,0, G=15,0 e T=38,0 (A+T=71,0).

As distâncias Kimura-2-Parâmetros (K2P) variaram entre indivíduos da mesma população de 0,00% (Itu) a 0,9% (Catuípe) e para espécies diferentes variaram entre 1,5% (*Aegla singularis* e *Aegla platensis*) e 8,6% (*Aegla prado* e *Aegla platensis*). Quando a espécie *A. singularis* é excluída das análises é possível

identificar que a distância mínima verificada entre as espécies aumenta, indo de 1,5% para 3,6%, revelando que realmente a espécie *A. singularis* é muito próxima de *A. platensis*. As frequências interespecíficas e intraespecíficas podem ser vistas na figura 1.

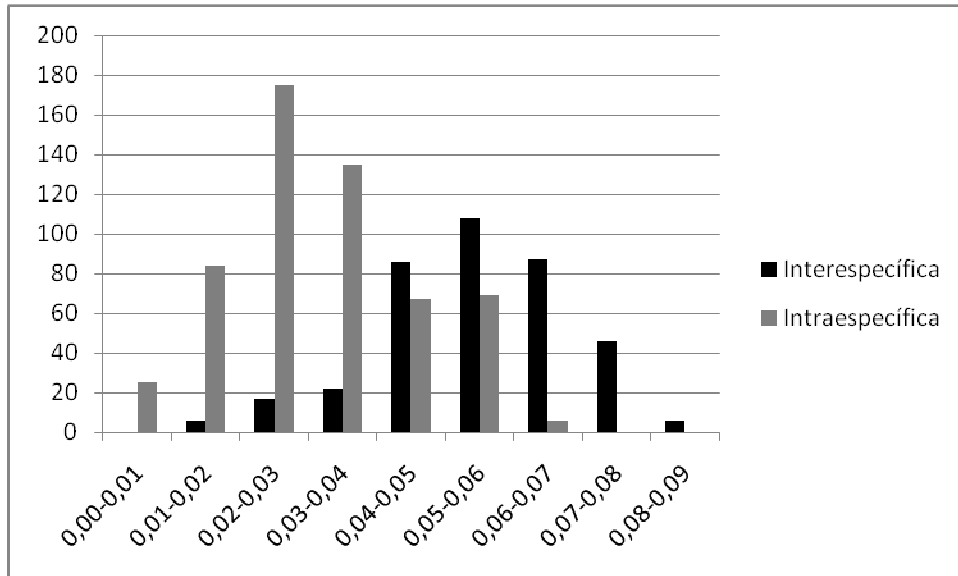


Figura 1 – Distribuição das frequências intraespecíficas e interespecíficas de distância K2P para os dados concatenados (16S, COI e COII) em comparações pareadas entre as espécies de *Aegla* e entre indivíduos de *A. platensis*.

Quando somente as distâncias intraespecíficas de *A. platensis* são comparadas, os valores variam de 0% a 6,4%. No entanto, quando as populações são analisadas separadamente algumas populações apresentam distâncias muito altas, tais populações como a população Itu juntamente com a população da Argentina quando comparadas com outras populações do Brasil (Bacia do Uruguai e do Guaíba) apresentam distâncias que variam de 3,1% com as populações da sub-bacia Ijuí (Bacia do Uruguai) a 6,2% com a população da Bacia do Guaíba. A população Guaíba (Bacia do Guaíba) quando comparada com as outras populações da Bacia do Uruguai apresenta distâncias entre 4,5% e 6,4%.

Estas distâncias apresentadas pelas populações da Argentina, Itu e Guaíba se mostraram muito próximas às distâncias encontradas para as relações interespecíficas, ou seja, entre as espécies do gênero *Aegla*, explicando assim a



pouca sobreposição que existe entre as distâncias intraespecíficas e interespecíficas (Figura 1).

As árvores obtidas a partir dos quatro métodos empregados (*Neighbor-Joining* (NJ), Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV) e Análise Bayesiana (BA)) apresentaram topologias semelhantes. Portanto optou-se por apresentar somente a topologia da árvore obtida da BA, uma vez que as relações filogenéticas são similares nas quatro análises. A confiabilidade medida pelos valores de *bootstrap* bem como a probabilidade posterior dos métodos empregados são apresentados na figura 2.

Os quatro métodos mostram quatro espécies das cinco utilizadas como grupo externo (*A. prado*, *A. intercalata*, *A. rossiana* e *A. Uruguayana*) na base da filogenia, exibindo as últimas duas espécies como as mais próximas de *A. platensis*.

É possível identificar quatro clados bem distintos (A, B, C e D) separados por altos suportes estatísticos. Primeiramente é possível identificar que dentro do clado A existem outros agrupamentos, cada um formado por populações oriundas da mesma sub-bacia, como está representado na figura 3.

O clado B é representado pelas populações de *A. platensis* oriundas somente da sub-bacia Ijuí, no entanto a espécie *A. singularis* que a priori foi utilizada como grupo externo agrupou juntamente com estas populações. Neste mesmo clado é possível verificar ainda que as relações filogenéticas entre as populações Alegre, Potiribú, Cachoeira e Guarani não foram resolvidas por nenhum dos métodos empregados.

As populações Vipos, Membrillos e Itu apresentaram-se agrupadas no clado D, apresentando alto suporte estatístico nos métodos empregados, separando-o claramente dos outros clados. Assim como as populações do clado A, a população Guaíba também se mostra separada das outras populações de *A. platensis* com alto suporte estatístico, e apresenta-se ainda agrupada com as espécies *A. uruguayana* e *A. rossiana*. Tais relações apresentadas pelos clados C e D corroboram os dados obtidos pelas distâncias (K2P) em que as populações apresentam altos valores com relação às outras populações de *A. platensis*.

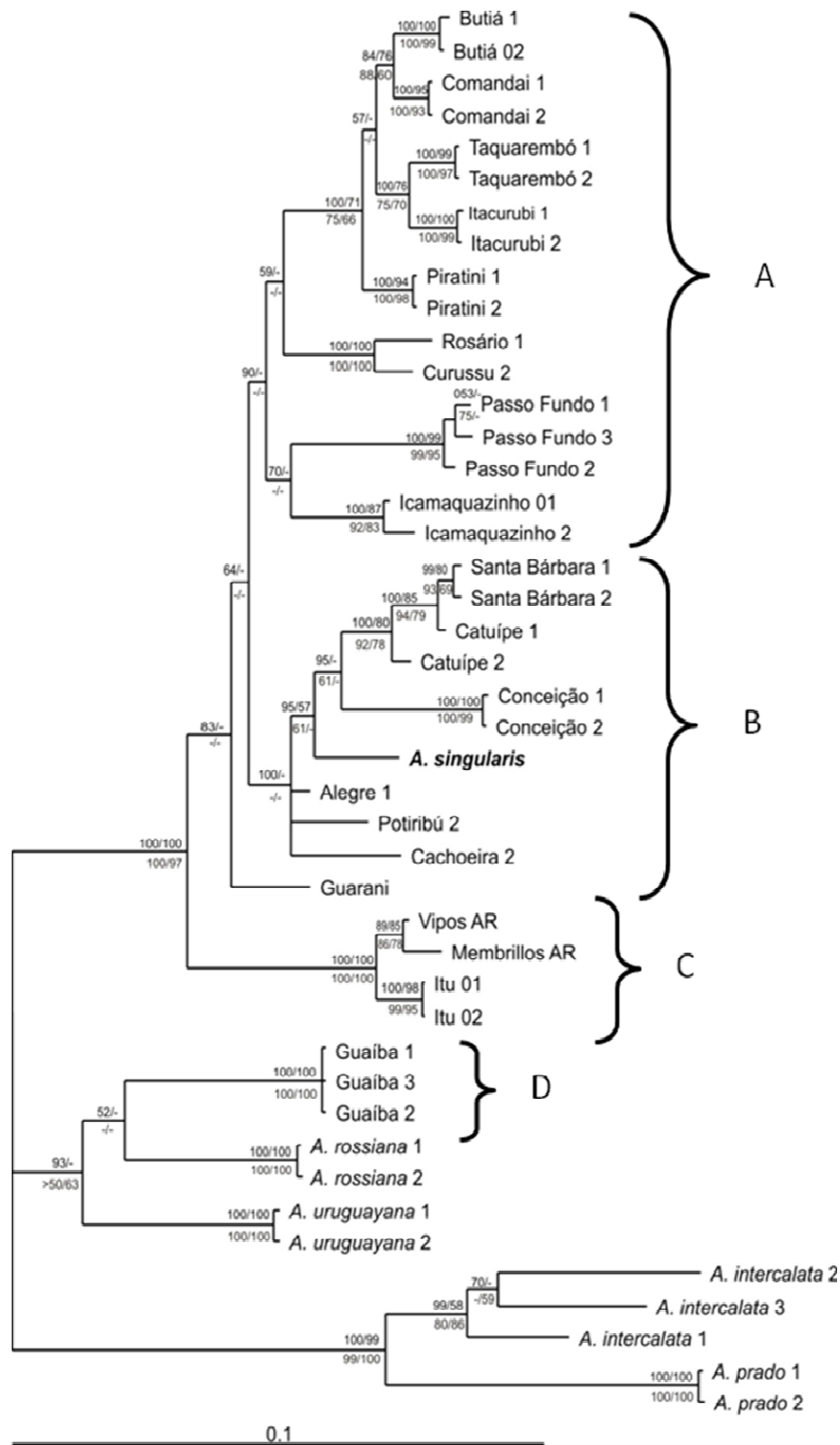


Figura 2 – Relações filogenéticas dos dados concatenados (16S, COI e COII), representada por uma árvore consenso obtida através de análise Bayesiana com o tamanho dos ramos representados, mediante utilização do modelo HKY+I+G, como proposto pelo AIC. Acima dos ramos estão indicados os valores das probabilidades posteriores para Análise Bayesiana (BA) e valores de *bootstrap* para Máxima Parcimônia (MP) e abaixo dos ramos constam os valores de *bootstrap* para *Neighbor-Joining* (NJ) e Máxima Verossimilhança (MV), respectivamente. A espécie *Aegla singularis* está marcada em negrito.

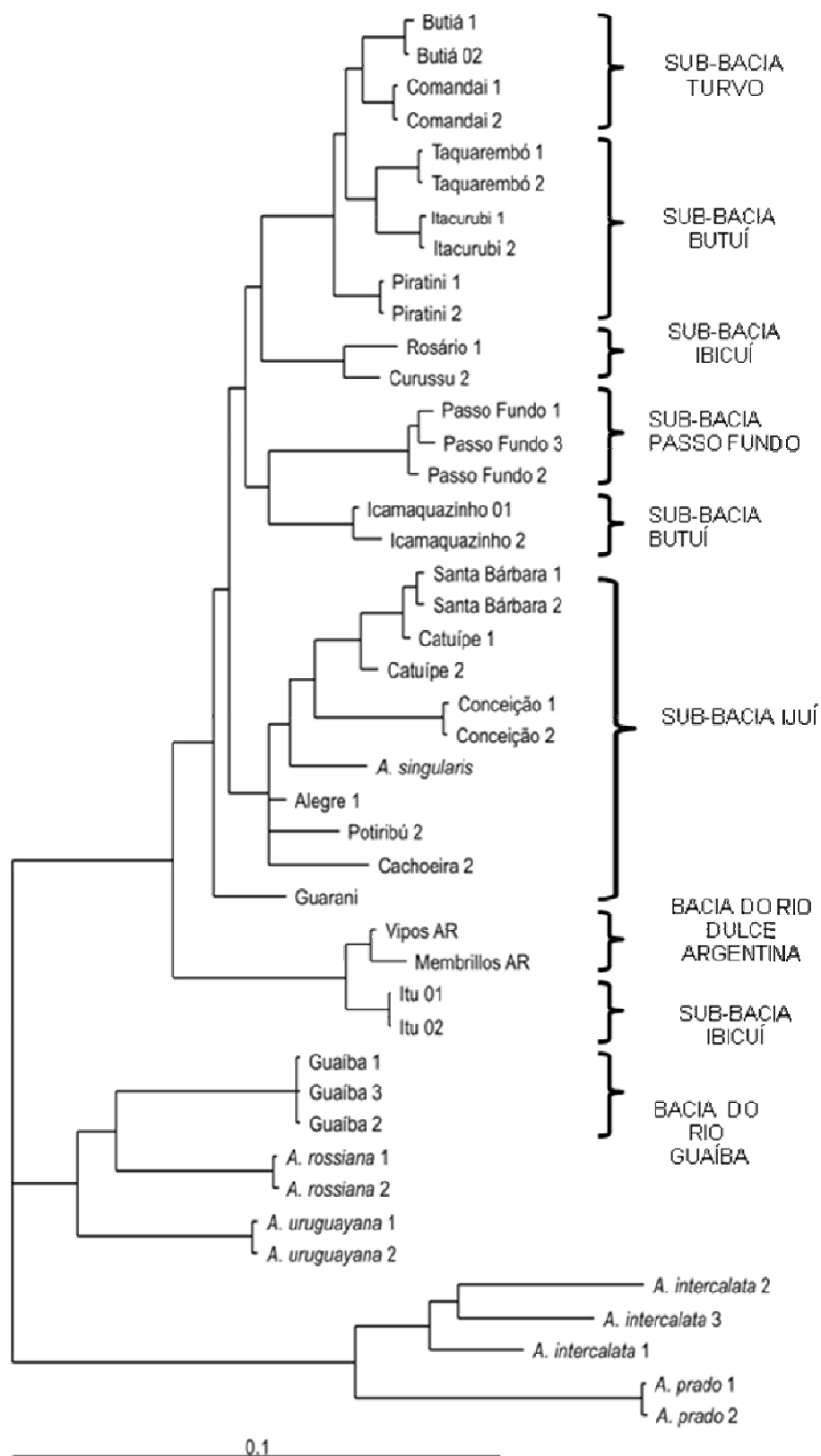


Figura 3 – Análise Bayesiana (BA) representada pelo tamanho dos ramos e pelas populações agrupadas por localidade (sub-bacias e bacias).

## Análises Populacionais de *Aegla platensis*

As análises populacionais foram realizadas para cada um dos genes separadamente, os quais apresentaram após a inspeção do alinhamento das sequências, fragmentos de 473, 827 e 568 pares de bases (pb), para os genes 16S, COI e COII respectivamente.

O número de sequências utilizadas variou de acordo com o gene, devido a algumas amostras não terem apresentado sequências com qualidade, sendo então utilizadas 36, 37 e 37 dos genes 16S, COI e COII respectivamente. Os índices de diversidade (diversidade haplotípica e nucleotídica) para cada gene estão representados na tabela 1.

Os testes de neutralidade não indicaram qualquer sinal de que as sequências tenham evoluído sobre pressões seletivas para nenhum dos genes em nenhum dos diferentes testes.

Os valores de divergência populacional para os três genes foram semelhantes, apresentando as maiores divergências entre as populações Guaíba e o conjunto de populações Itu, Vipos e Membrillos com as demais populações de *A. platensis*, concordando com as outras análises de que estes dois grupos são os mais divergentes.

A AMOVA foi estatisticamente significativa para os três genes (16S, COI e COII) (Tabela 2). Nossos dados revelam que há uma estruturação genética nas populações de *A. platensis* que ocorrem entre as bacias e sub-bacias. A variação observada entre populações dentro dos grupos revelam o baixo fluxo gênico entre as populações de *Aegla platensis*, apoiando os resultados obtidos pelas análises filogenéticas em relação à clara separação dos clados.

Os valores apresentados pelos índices *F<sub>ct</sub>* e *F<sub>sc</sub>* para os três genes indicam que há diferenciação entre grupos e entre as populações do mesmo grupo, sugerindo que mesmo entre populações da mesma bacia ou sub-bacia (ver Figura 3) ocorre baixo fluxo gênico com poucos migrantes, sugerindo um possível isolamento entre estas populações (Tabela 2). Os valores altos de *F<sub>sc</sub>* reforçam ainda que as subdivisões que aparecem no clado A podem estar relacionadas às diferentes sub-bacias da Bacia do Uruguai em que o fluxo gênico é quase inexistente.

Tabela 1 – Índices de Diversidade Haplotípica e Nucleotídica.

Parâmetros	16S	COI	COII
H	11	23	26
Hd	0,852	0,976	0,982
$\Pi$	0,00604	0,03090	0,02857
$\Theta$	0,00851	0,03325	0,03704
k	2,565	9,796	13,854
S	15	44	75
T	425	317	485
S/T	0,03529	0,1388	0,1546
N	36	37	37

Número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (dH), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), theta ( $\theta$ ), número médio de diferenças nucleotídicas (k), número de sítios polimórficos (S), número total de sítios (T) de sequências de três genes mitocondriais, número de sítios polimórficos sobre o número total de sítios (S/T), número de sequências utilizadas (N).

Tabela 2 – Valores percentuais obtidos pela AMOVA referentes aos genes 16S, COI e COII.

Fonte da Variação	Variância	Total (%)	F
16S			
Entre grupos	0,78563	27,38	Fct= 0,27337
Entre populações dentro dos grupos	1,89779	66,13	Fsc= 0,91062
Dentro de populações	0,18627	6,49	Fst= 0,93509
COI			
Entre grupos	0,71052	43,28	Fct= 0,43276
Entre populações dentro dos grupos	0,87247	53,14	Fsc= 0,93684
Dentro de populações	0,05882	3,58	Fst= 0,96417
COII			
Entre grupos	4,44259	40,81	Fct= 0,40809
Entre populações dentro dos grupos	5,67893	52,17	Fsc= 0,88132
Dentro de populações	0,76471	7,02	Fst= 0,92975

A rede de haplótipos foi construída com os dados concatenados utilizando grupo externo (*Aegla singularis*, *Aegla uruguayana*, *Aegla rossiana*, *Aegla intercalata* e *Aegla prado*), estratégia que melhorou a resolução da rede (Figura 4). Os clados se apresentaram os mesmos obtidos na análise Bayesiana, com divisões entre as

populações de *A. platensis* por sub-bacias e/ou bacias e entre as espécies do grupo externo que se mostraram separadas, porém, relacionadas entre si.

Os haplótipos apresentam-se exclusivos das espécies e das populações, no entanto algumas populações de *A. platensis* possuem mais de um haplótipo. As diferenças entre a rede de haplótipos e análise filogenética consistem na posição de um indivíduo da população Comandaí que aparece próximo às populações Alegre e Potiribú da sub-bacia Ijuí.

A rede de haplótipos corroborou os dados obtidos nas análises filogenéticas e de distância, confirmando as relações entre as populações de *A. platensis* assim como a relação de *A. singularis* com as populações da sub-bacia Ijuí e confirmando a separação da população Guaíba e do agrupamento entre a população Itu com as populações argentinas Vipos e Membrillos, sugerindo que estas sejam espécies diferentes de *A. platensis*.

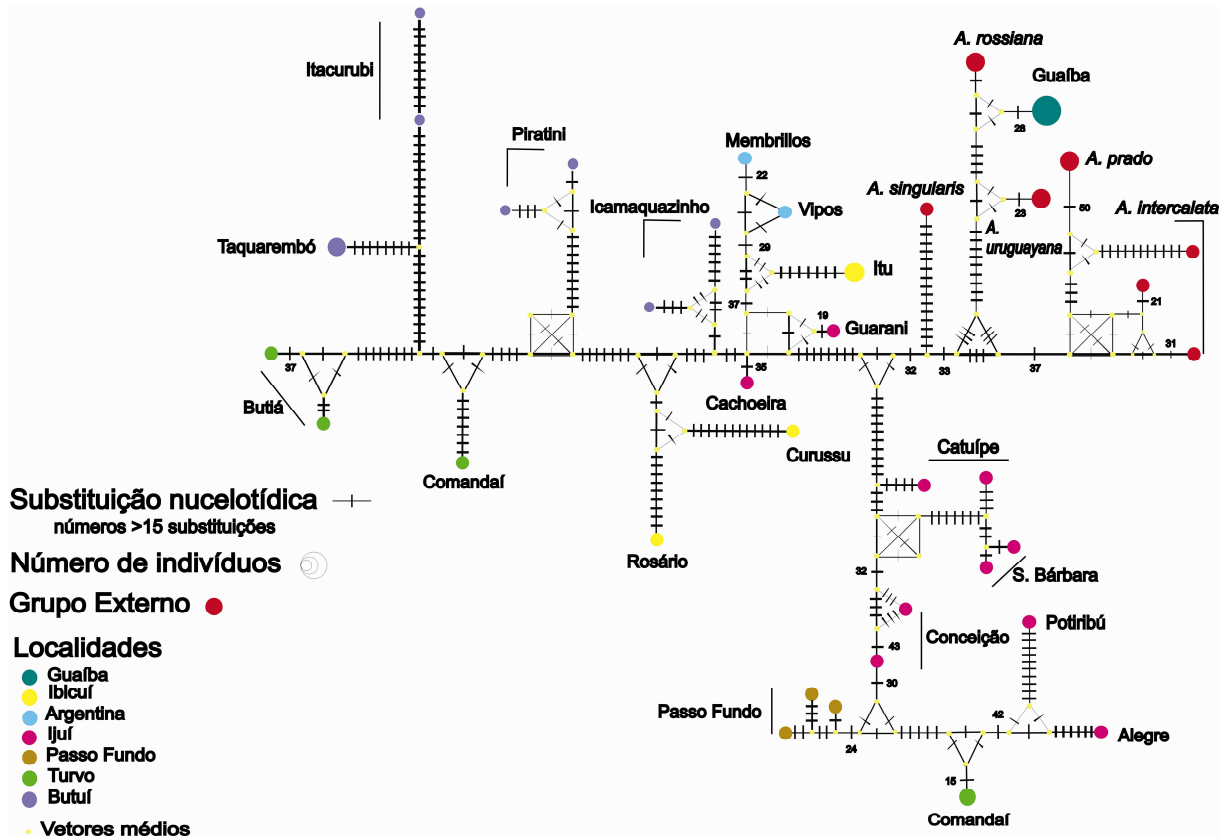


Figura 4 - Rede de haplótipos dos dados concatenados (16S, COI e COII). As cores representam as sub-bacias da bacia do Uruguai, Bacia do Guaíba e as populações da Argentina, além do grupo externo. O diâmetro é relativo ao número de indivíduos carregando um haplótipo único onde o menor círculo é um único indivíduo e o maior são três indivíduos. As linhas entre os haplótipos demonstram as distâncias genéticas entre haplótipos. Cada substituição nucleotídica é representada por um marcador. Havendo mais de 15 substituições, apenas os números de alterações são representados, para simplificação. Os vetores médios são indicados pelo círculo menor em amarelo.

## Discussão

As diferenças significativas das frequências nucleotídicas foram semelhantes às encontradas por Pérez-Losada et al. (2002c) para espécies chilenas de *Aegla*, parecendo ser característico em sequências de genes mitocondriais para o gênero *Aegla*. As sequências são ricas em A+T, observação já registrada para outros crustáceos decápodos para os mesmos genes estudados como, por exemplo, o caranguejo do gênero *Eriocheir*, em que essa tendência ocorre nos genes 16S e COI (CHU et al., 2003).

Analisando os dados obtidos tanto pelas análises filogenéticas como populacionais o clado A parece configurar as verdadeiras populações de *A. platensis*. Entretanto, para se confirmar essa inferência é necessária a análise molecular de exemplares provenientes da localidade-tipo da espécie. Verifica-se ainda que este clado apresenta um alto grau de estruturação genética entre os grupos evidenciando que as populações oriundas de diferentes sub-bacias estão isoladas.

Além disso, o baixo fluxo gênico encontrado entre essas populações também sugere que estas populações estão isoladas, possivelmente devido à ausência de estágio larval em eglídeos, o que poderia dificultar a capacidade de dispersão. Pode-se ainda especular que atualmente a dispersão também possa ser dificultada pelo fato de os eglídeos estarem cada vez mais restritos às nascentes dos rios, onde as águas são mais límpidas e oxigenadas, devido à ação antrópica degradando os ambientes de água doce, (BOND-BUCKUP et al., 2008).

A questão de *A. singularis* apresentar-se muito próxima a *Aegla platensis* já é discutida por Ringuelet (1949), o qual considera que estas são “formas progenitoras mais próximas das ancestrais”, o que contribuiria para esta semelhança, levando em consideração características morfológicas comuns entre as duas espécies. Tais caracteres morfológicos como os seios extraorbitais mais largos e côncavos, espinhos orbitais grandes, rostro proeminente e espinhos ântero-laterais largos, determinam as formas mais primitivas. No entanto, deve-se levar em consideração que esta comparação é baseada em cerca de 20 espécies que até então tinham sido descritas (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994) comparadas com as mais de 60 que hoje são conhecidas (MCLAUGHLIN et al., 2010).

Lopretto (1980) também verifica a proximidade destas duas espécies baseado na morfologia do quinto pereiópodo, estabelecendo um grupo “*platensis*” de eglídeos que inclui as espécies *A. singularis* e *A. platensis*.

Bond-Buckup & Buckup (1994) em seu amplo estudo da Família Aeglidæ realizam uma diagnose referente a cada espécie, entre elas a *A. platensis* e *A. singularis*, apontando vários caracteres morfológicos mais específicos dos que o de Ringuelet, contribuindo com duas chaves de classificação de eglídeos. Alguns destes caracteres são comuns a essas duas espécies como: o espinho ântero-lateral da carapaça alcançando a metade da córnea; rostro carenado em todo o seu comprimento. Além disso, possuem poucas variações em relação a outras



características morfológicas, *A. platensis*, por exemplo, possui os lobos protogástricos moderadamente elevados e o quarto esternito torácico elevado medianamente com escama, em comparação com *A. singularis* que possui os lobos protogástricos elevados e o quarto esternito torácico elevado com escamas.

Nossos dados moleculares corroboram com os dados obtidos por Pérez-Losada et al. (2004), que utilizaram nove amostras de *A. platensis*, sugerindo que *A. singularis* e *A. platensis* são muito próximas geneticamente podendo ser consideradas espécies irmãs. No entanto, a distância encontrada para *A. singularis* e *A. platensis* são muito baixas, sendo encontrada como distância intraespecífica em um estudo com outros crustáceos (COSTA et al., 2007).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a localização do indivíduo de *A. singularis* utilizado nesse trabalho, o qual é oriundo do Rio Caxambú, localizado na sub-bacia do Rio Ijuí, em que se encontram também as populações Santa Bárbara, Catuípe e Conceição.

Portanto em relação à posição de *A. singularis* (clado B), nossos dados sugerem que as populações Conceição, Catuípe e Santa Bárbara constituam na verdade indivíduos de *A. singularis*, porém possuem características morfológicas muito semelhantes aos indivíduos de *A. platensis*. Outra possibilidade que não pode ser descartada, é que os indivíduos destas populações representam híbridos entre as duas espécies.

Já as populações, Alegre, Potiribú, Cachoeira e Guarani, também encontradas no clado B, não apresentaram suas relações filogenéticas resolvidas por nenhum dos métodos utilizados. É possível que isso se deva à falta de amostragem em outras localidades, ou ainda, ao tamanho amostral. Entretanto, outras populações estudadas, como as de Rosário e Curussu também estão representadas por apenas uma amostra, e apesar disso, as suas relações filogenéticas estão bem resolvidas com 100% de confiabilidade nos quatro métodos empregados.

A utilização de *A. singularis*, *A. uruguayana*, *A. rossiana*, *A. intercalata* e *A. prado* como grupo externo se deve às relações filogenéticas investigadas por Pérez-Losada et al. (2004). Em nossas análises estas espécies apresentam-se muito próximas, apresentando valores de distâncias mais baixos do que os registrados para 31 gêneros de crustáceos estudados, os quais variaram de 4,92% a 23,66% (COSTA et al., 2007). Embora nossos valores pareçam baixos quando comparados

com o trabalho de Costa et al. (2007), alguns estudos discutem que altos limiares podem estar superestimados, fenômeno frequente em crustáceos (BENSASSON et al., 2000; BENSASSON et al., 2001).

A divergência encontrada entre as populações da Bacia do Guaíba e as populações da Bacia do Uruguai é compatível com o fato de pertencerem a bacias diferentes. Tais divergências também são registradas para populações de *Aegla longirostri* oriundas da Bacia do Uruguai e do Guaíba, em estudos realizados com heteroduplex e microssatélites (SANDRO SANTOS, dados não publicados).

A topologia filogenética encontrada por Pérez-Losada et al. (2004) para o gênero *Aegla* não coincide exatamente com o atual padrão das drenagens dos rios onde as espécies ocorrem, como por exemplo, *A. intercalata* do Rio Dulce no noroeste da Argentina é mais proximamente relacionada à *A. prado* do Rio La Plata do Uruguai e à *A. violacea* da Bacia do Guaíba do Brasil do que *A. humahuaca* ou *A. platensis* do Rio Dulce na Argentina. Os autores atribuíram as inconsistências encontradas entre filogenia e distribuição geográfica atual às modificações nas paleodrenagens ocorridas na América do Sul meridional durante o final do Terciário.

Nossos resultados levantam outra explicação possível, relacionada à amostragem em poucos locais, as quais não permitiram identificar a extensão da variação intraespecífica. Isto pode ser especialmente verdadeiro para as espécies com distribuição muito ampla, presentes em mais de uma bacia hidrográfica, as quais não mantêm comunicação entre si há um grande período de tempo, como é o caso de *A. platensis*. A amostragem mais ampla desta espécie no presente estudo mostrou a presença de variação intraespecífica significativa, além de revelar a possibilidade de *A. platensis* compreender um complexo de espécies.

A discussão levantada por Pérez-Losada et al. (2004), de que modificações nos sistemas de drenagem seriam responsáveis por diferenças entre filogenia e distribuição das espécies atuais, também seria plausível para explicar o agrupamento encontrado neste estudo entre as populações Itu da Bacia do Rio Uruguai e Vipos e Membrillos do Rio Dulce no noroeste argentino e para a população Guaíba que agrupa juntamente com as espécies *A. rossiana* e *A. uruguayana* que pertencem ao Rio Mampituba (divisa entre Santa Catarina e Rio Grande do Sul-Brasil) e ao rio Uruguai no Uruguai, respectivamente.

Seguido do conceito de que espécies devem constituir grupos monofiléticos (ex.: CRACFT, 1983), a separação dos clados C e D permite inferir que constituam

espécies diferentes a *A. platensis*, os quais aparentemente apresentam um antigo padrão de radiação em relação aos atuais padrões de drenagens, concordando com a hipótese de Pérez-Losada et al. (2004) para algumas espécies.

Se de fato constituírem diferentes espécies, pode-se ainda inferir que talvez *A. platensis* não ocorra nas três Bacias Hidrográficas do Rio Grande do Sul, conforme atualmente aceito. Aparentemente, esta espécie parece ocorrer somente na Bacia Hidrográfica do Uruguai, que geograficamente é mais próxima ao local onde foram coletados seu holótipo e o parátipo, em “Isla Flores” na Província de Buenos Aires, encontrada por Schmitt (1942 apud BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994, p. 190). No entanto, deve-se ressaltar que neste trabalho não foi utilizado nenhum indivíduo da Bacia Litorânea em que *A. platensis* também ocorre.

Os indivíduos do noroeste Argentino e da Bacia Hidrográfica do Guaíba configuram-se como sendo espécies novas, além dos espécimes do clado B que parecem ser *A. singularis*. Pode-se supor que essas espécies novas possuam algum grau de endemismo, uma vez que aparentemente são restritas a um local e que os valores de divergência entre os grupos mostraram-se bastante altos. Os eglídeos em geral possuem distribuição restrita, com 36 espécies endêmicas do sul do Brasil. Esta restrição tem aumentado consideravelmente devido à rápida degradação dos habitats que eles ocupam (BOND-BUCKUP et al., 2008). No entanto, é necessário um outro estudo com estas novas espécies para verificar esta hipótese.

## **Referências Bibliográficas**

AB’SABER, A. N. Províncias Geológicas e Domínios Morfológicos o Brasil. **IGE-USP, Série Morfologia**, São Paulo, p. 20, 1970.

AKAIKE, H. A New Look at the Statistical Model Identification. **IEEE Transactions Automatic Control**, n. 19, p. 716-723, 1974.

BANDELT, H.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining Networks for Intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48, 1999.

BENSASSON, D.; ZHANG, D. X.; HEWIT, G. M. Frequent Assimilation of Mitochondrial DNA by Grasshopper Nuclear Genomas. **Molecular Biology and Evolution**, n. 17, p. 406-415, 2000.

BENSASSON, D. et al. Mitochondrial Pseudogenes: Evolution's Misplaced Witnesses. **Trends in Ecology and Evolution**, n. 16 p. 314-321, 2001.

BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L. A Família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**, v. 32, n. 4, p.159-346, 1994.

BOND-BUCKUP, G. et al. Global Diversity of Crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in Freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 267-273, 2008.

BOND-BUCKUP, G. et al. New Species and New Records of Endemic Freshwater Crabs from the Atlantic Forest in Southern Brazil (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 30, n. 3, p. 495-502, 2010.

CASSINI, M. H. et al. Scale-dependent Analysis of an Otter-Crustacean System in Argentina Patagonia. **Naturwissenschaften**, v. 96, p. 593-599, 2009.

CHU, K. H. et al. Molecular Phylogenetics of the Mitten Crab Species in *Eriocheir, Sensu Lato* (Brachyura: Grapsidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, n. 3, p. 738-746, 2003.

COSTA, F. O. et al. Biological Identifications Through DNA Barcodes: The Case of the Crustacea. **Canadian Journal Aquatic Science**, v. 64, p. 272-295, 2007.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. Arlequin Suite ver. 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analysis under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FERREIRA, B. D. P. et al. Perfil Metabólico de *Aegla platensis* Schmitt, (Crustacea, Aeglidae, Anomura) Submetida a Dietas Ricas em Carboidratos ou Proteínas. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 1, p. 161-168, 2005.

FLUXUS TECHNOLOGY LTD. Disponível em <<http://www.fluxus-engineering.com/>>. Acesso em: março de 2010.

FU, Y. Statistical Tests of Neutrality of Mutations against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection, **Genetics**, n. 147, p. 915-925, 1997.

LIBRADO, P. & ROZAS, J. DnaSP v. 5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LOPRETTO, E. C. Análisis de las Características del Quinto Pereiópodo em las Especies de *Aegla* del Grupo “*platensis*” (Crustacea, Anomura, Aeglidae). **Physis (Buenos Aires)**, v. 39, n. 96, p.37-56, 1980.

MCLAUGHLIN, P. A.; LEMAITRE, R.; CRANDALL, K. A. Annotated Checklist of Anomuram Decapod Crustacean of the World (Exclusive of the Kiwaoidea and Families Chirostyliidae and Galatheidae of the Galatheaidea) Part III – Aegloidea. **The Raffles Bulletin of Zoology**, n. 23, p. 131-137, 2010.

MOREIRA, A. A. N. & LIMA, G. R. Relevô In: **Geografia do Brasil, Região Sul**, Rio de Janeiro: Fundação IBGE, v. 5. P. 01-34, 1977.

NYLANDER, J. A. A. **MrModelTest v. 2**. Program Distributed by the Author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.

PEREIRA, P. R. B. et al. Contribuição à Geografia Física do Município de Santa Maria: Unidades de Paisagem. **Geografia, Ensino e Pesquisa**, v. 3, p. 37-68, 1989.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Phylogenetic Relationships among the Species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) Freshwater Crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 2, p. 304-313, 2002c.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Molecular Systematics and Biogeography of the Southern South American Freshwater “Crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) Using Multiple Heuristic Tree Search Approaches. **Systematic Biology**, v. 53, n. 5, p. 767-780, 2004.

POSADA D. & CRANDALL K. ModelTest: Testing the Model of DNA Substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

RINGUELET, R. Los “cangrejos” Argentinos del Género *Aegla* de Cuyo y la Patagonia, en **Rev. Mus. La Plata** (N. S.), V, Secc. Zool., n° 34, 297-349, 2 figs., 25 láms. La Plata 1949.

RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

SAITOU, N. & NEI, M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 406-425, 1987.

SANTOS, S. et al. *Aegla manuiinflata*, a New Species of Freshwater Anomuran (Decapoda: Anomura: Aegliidae) from Brazil, Determined by Morphological and Molecular Characters. **Zootaxa**, v. 2088, p. 31 - 40, 2009.

SWOFFORD, D. L. **PAUP\* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)** Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2003.

TAJIMA, F. The Effect of Change in Population Size on DNA Polymorphism. **Genetics**, n. 123, p. 597-601, 1989.

TAMURA, K. et al. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

YOTOKO, K. S. C.; VALE, T. B.; BONATTO, S. L. **PhyCon**. Viçosa, 2007.

## Apêndice A

Tabelas 1 – Locais de coleta na Bacia do Uruguai, com suas respectivas coordenadas geográficas e número de indivíduos referentes a cada população (N).

<b>Locais de Coleta – População (Sub-bacia)</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>	<b>N</b>
Rio Rosário (Ibicuí)	29°07'39"S, 54°48'48"W	2
Rio Curussu (Ibicuí)	29°33'29"S, 54°51'39"W	2
Rio Itu (Ibicuí)	29°17'22"S, 54°57'08"W	2
Rio Icamaquãzinho (Butuí)	28°46'36"S, 54°55'57"W	2
Rio Taquarembó (Butuí)	28°52'31"S, 54°56'23"W	2
Rio Itacurubi (Butuí)	28°56'31"S, 55°01'58"W	2
Rio Piratini (Butuí)	28°27'06"S, 54°57'27"W	2
Rio Catuípe (Butuí)	28°14'43"S, 54°06'59"W	2
Arroio Santa Bárbara (Ijuí)	28°15'53"S, 54°12'26"W	2
Rio Guarani (Ijuí)	28°10'58"S, 54°31'33"W	2
Rio Alegre (Ijuí)	28°12'40"S, 53°30'15"W	2
Rio Cachoeira (Ijuí)	28°14'21"S, 53°45'12"W	2
Rio Conceição (Ijuí)	28°27'49"S, 53°57'19"W	2
Rio Potiribú (Ijuí)	28°33'29"S, 53°36'35"W	2
Rio Comandai (Turvo)	27°57'56"S, 54°52'44"W	2
Arroio Butiá (Turvo)	28°01'18"S, 54°53'17"W	2
Rio Passo Fundo (Passo Fundo)	28°14'06"S, 52°24'54"W	3

Tabela 2 – Número de acesso no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) das populações localizadas fora da Bacia Hidrográfica do Rio Uruguai .

<b>Populações</b>	<b>Número de acesso</b>		
	<b>16S</b>	<b>COI</b>	<b>COII</b>
ARGENTINA	AY595917.1	AY595663.1	AY595788.1
	AY595916.1	AY595662.1	AY595787.1
	AY595805.1	AY595551.1	AY595676.1
GUAÍBA	AY595804.1	AY595550.1	AY595675.1
	AY595803.1	AY595549.1	AY595674.1

Tabela 3 - Espécies utilizadas como grupo externo e o número de acesso no GenBank.

Espécies	Nº de acesso GenBank		
	16S	COI	COII
<i>Aegla uruguayana</i>	AY595885.1 AY595886.1	AY595631.1 AY595632.1	AY595756.1 AY595757.1
<i>Aegla rossiana</i>	AY595877.1 AY595878.1	AY595623.1 AY595624.1	AY595748.1 AY595749.1
<i>Aegla intercalata</i>	AY595918.1 AY595919.1 AY595920.1	AY595664.1 AY595665.1 AY595666.1	AY595789.1 AY595790.1 AY595791.1
<i>Aegla prado</i>	AY595887.1 AY595888.1	AY595634.1 AY595633.1	AY595758.1 AY595759.1
<i>Aegla singularis</i>	AY595868.1	AY595614.1	AY595739.1

Tabela 4 – Amostras sequenciadas no laboratório do Dr. Keith Crandall, Brigham Young University, USA referentes aos genes 16S, COI e COII

Indivíduos	16S	COI	COII
Passo Fundo 01			
Passo Fundo 02			
Passo Fundo 03			
Butiá 01			
Butiá 02			
Alegre 01			
Alegre 02			
Itu 01			
Itu 02			
Taquarembó 01			
Taquarembó 02			
Cachoeira_01			
Cachoeira_02			
Catuípe 01			
Catuípe 02			
S. Bárbara 01			
S. Bárbara 02			
Guarani 01			
Guarani 02			



Conceição 01

Conceição 02

Potiribú 01

Potiribú 02

Comandai 01

Comandai 02

Piratini 01

Piratini 02

Icamaquazinho 01

Icamaquazinho 02

Itacurubi 01

Itacurubi 02

Rosário 01

Rosário 02

Curussu 01

Curussu 02



## 4 CONCLUSÃO

Nenhum estudo amplo com *A. platensis* tinha sido realizado até o momento, mas os indícios de que esta espécie poderia constituir um táxon parafilético, apesar das poucas amostras utilizadas (PÉREZ-LOSADA et al., 2004) e os indícios de variações morfológicas (SANDRO SANTOS, dados não publicados), eram suficientes para a revisão do *status* taxonômico de *A. platensis*.

Este estudo configura-se pioneiro na tentativa de elucidar o *status* taxonômico de *A. platensis* com a utilização de um amplo número de espécimes e de análises moleculares. Nossos resultados suportam a conclusão de que *A. platensis* constitui um complexo de espécies. A clara separação entre os clados revelados pelas análises filogenéticas e pela rede de haplótipos construída para os dados concatenados revela ao menos duas putativas novas espécies, além das distâncias serem estatisticamente significativas.

Estudos de morfometria geométrica podem contribuir para a diagnose destas espécies novas corroborando assim com os dados encontrados neste trabalho.

A possibilidade de algumas populações identificadas como *A. platensis* serem na verdade *A. singularis* deve ser mais estudada com utilização de mais amostras de *A. singularis* para efetiva comprovação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SABER, A. N. Províncias Geológicas e Domínios Morfológicos o Brasil. **IGE-USP, Série Morfologia**, São Paulo, p. 20, 1970.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª Ed. Editora Artmed: Porto Alegre, 2004.

ALMERÃO, M. P.; HEUSER-FACCIONE, M.C.; BOND-BUCKUP, G. An Ultrastructural Study of Tegumental Glands of the Fifth Pereiopods of *Aegla platensis* (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 27, n. 4, p. 529-533, 2007.

ALMERÃO, M. P.; BOND-BUCKUP, G.; MENDONÇA Jr., M. de S. Mating Behavior of *Aegla platensis* (Crustacea, Anomura, Aeglidae) under Laboratoty Conditions. **Journal of Ethology**, v. 28, p. 87-94, 2010.

ARENAS, R. L. La Cordillera de la Costa Como Refugio de la Fauna Dulcícola Preglacial. **Archivos de Biología y Medicina Experimentales**, v. 10 p. 1-40, 1976.

ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D. O DNA Mitocondrial em Estudos Populacionais Evolutivos de Meliponídeos. In: **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Editora UNESC: Criciúma, 2003.

ATLAS SOCIOECONÔMICO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em <<http://www.scp.rs.gov.br/ATLAS/>>. Acesso em: janeiro de 2010.

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

BAHAMONDE, N. & LÓPEZ, M. T. Estudios Biológicos em La Problación de *Aegla leavis leavis* (Latreille) de El Monte. **Investigaciones Zoológicas Chilenas**, v. 7, p. 19-58, 1961.

BALLARD, J. W. O & WHITLOCK, M. C. The Incomplete Natural History of Mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 729-744, 2004.

BANDELT, H.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining Networks for Intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48, 1999.

BOND-BUCKUP, G. Família Aeglidae. In: MELO, Gustavo S. de. **Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**, 2003.

BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L. A Família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**, v. 32, n. 4, p.159-346, 1994.

BOND-BUCKUP, G.; BUENO, A. P.; KEUNECKE, K. Morphological Characteristics of Juvenile Specimens of *Aegla* (Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress**, Koninklijke Brill NV, Leiden, p. 372-381, 1999.

BOND-BUCKUP, G. et al. Global Diversity of Crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in Freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 267-273, 2008.

BOND-BUCKUP, G. et al. New Species and New Records of Endemic Freshwater Crabs from the Atlantic Forest in Southern Brazil (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 30, n. 3, p. 495-502, 2010.

BOORE, J. L. Animal Mitochondrial Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 8, p. 1767-1780, 1999.

BORTOLUZZI, L. R. et al. Anomuros do Gênero *Aegla* Leach, 1820 (Crustacea: Decapoda: Aeglidae) como Bioindicador no Arroio Imbaá, Uruguaiana, Rio Grande do Sul. **Biodiversidade Pampeana**, PUCRS, Uruguaiana, v. 5, n. 2, p. 9-13, 2007.

BUCKLIN, A. et al. DNA Barcodes for Species Identification of Euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). **Journal of Plankton Research**, v. 29, n. 6, p. 483-493, 2007.

BUCKUP, L. & BOND-BUCKUP, G. Família Aeglidae (caranguejos anomuros de água doce). In: **Os Crustáceos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade, UFRGS, p. 362-382, 1999.

BUENO, A. A. P. & BOND-BUCKUP, G. Dinâmica Populacional de *Aegla platensis* Schmitt (Crustacea, Decapoda, Aeglidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n.1, p. 43-49, 2000.

BUENO, A. A. P. & BOND-BUCKUP, G. Estrutura da Comunidade de Invertebrados Bentônicos em Dois Cursos D'água da Bacia do Guaíba, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 1, p. 115-125, 2003.

BUENO, A. A. P. & BOND-BUCKUP, G. Natural Diet of *Aegla platensis* Schmitt and *Aegla ligulata* Bond-Buckup & Buckup (Crustacea, Decapoda, Aeglidae) from Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 16, n. 2, p. 115-127, 2004.

BUENO, A. A. P.; BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. Crescimento de *Aegla platensis* em Ambiente Natural (Crustacea, Decapoda, Aeglidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 51-60, 2000.

BUENO, S. L. de S.; SHIMIZU, R. M.; ROCHA, S. S. da. Estimating the Population Size of *Aegla franca* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) by Mark-Recapture Technique from an Isolated Section of Barro Preto Stream, County of Claraval, State of Minas Gerais, Southeastern Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 27, n. 4, p. 553-559, 2007.

COSTA, F. O. et al. Biological Identifications through DNA Barcodes: The Case of the Crustacea. **Canadian Journal Aquatic Science**, v. 64, p. 272-295, 2007.

COX, A. J. & HEBERT, P. D. N. Colonization, Extinction and Phylogeographic Patterning in a Freshwater Crustacean. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 371-386, 2001.

DANIELS, S. R. et al. Phylogenetic Relationships of the Southern African Freshwater Crab Fauna (Decapoda: Potamonautidae: *Potamonautes*) Derived from Multiple Data Sets Reveal Biogeographic Patterning. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 511-523, 2002.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. Arlequin Suite ver. 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analysis under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FELDMANN, R. M. *Haumuriaegla glaessneri* n. gen. and sp. (Decapoda: Anomura: Aeglidae) from Haumurian (Late Cretaceous) Rocks Near Cheviot, New Zealand. **New Zealand Journal of Geology and Geophysics**, v. 27, p. 3379-385, 1984.

FELDMANN, R. M. et al. Early Cretaceous Arthropods from the Thayúa Formation at Tepexi de Rodríguez, Puebla, México. **Journal of Paleontology**, v. 72, n. 1, p. 79-90, 1998.

FERREIRA, B. D. P. et al. Perfil Metabólico de *Aegla platensis* Schmitt, (Crustacea, Aeglidae, Anomura) Submetida a Dietas Ricas em Carboidratos ou Proteínas. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 1, p. 161-168, 2005.

FLUXUS TECHNOLOGY LTD. Disponível em <<http://www.fluxus-engineering.com/>>. Acesso em: março de 2010.

FU, Y. Statistical Tests of Neutrality of Mutations against population Growth, Hitchhiking and Background Selection, **Genetics**, n. 147, p. 915-925, 1997.

GRAVE, S. de. Et al. A Classification of Living and Fossil Genera of Decapod Crustaceans. **Raffles Bulletin of Zoology**, n. 21, p. 1- 109, 2009.

GRECO, L. S. L. et al. Juvenile Hatching and Maternal Care in *Aegla uruguayana* (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 24, n.2, p. 309-313, 2004.

JARA, C. G. *Aegla rostrata* n. sp. (Decapoda, Aeglidae), Nuevo Crustáceo Dulceacuícola Del Sur de Chile. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 12, p. 165-176, 1977.

JARA, C. G. *Aegla denticulata lacustris*, New Subspecies, from Lake Rupanco, Chile (Crustacea: Decapoda: Anomura: Aeglidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 102, p. 385-393, 1989.

KAESTNER, A. **Invertebrate Zoology**. Huntington, New York: Robert E. Krieger Publishing Company, vol.3, 523p., 1980.

KARTAVTSEV, Y. P. & LEE, J-S. Analysis of Nucleotide Diversity at the Cytochrome *b* and Cytochrome Oxidase 1 Genes at the Population, Species and Genus Levels. **Russian Journal of Genetics**, v. 42, n. 4, p. 341-362, 2006.

KNOWLTON, N. & WEIGT, L. A. New Dates and New Rates for Divergence Across the Isthmus of Panama. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B**, v. 265, p. 2257–2263, 1998.

LIBRADO, P. & ROZAS, J. DnaSP v. 5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LIU, M-Y.; CAI, Y-X.; TZENG, C-S. Molecular Systematics of the Freshwater Praw Genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) Inferred from mtDNA Sequences with Emphasis on East Asian Species. **Zoological Studies**, v. 46, n.3, p. 272-289, 2007.

LÓPEZ, M. T. Estudos Biológicos em *Aegla odebrechtii paulensis* Schmitt (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Boletim de Zoologia da Faculdade de Ciências e Letras de São Paulo**, v. 25, p. 301-314, 1965.

MAGNI, S. T. & PY-DANIEL, V. *Aegla platensis* Schmitt, 1942 (Decapoda, Anomura) um Predador de Imaturos de Simuliidae (Diptera: Culicomorpha). **Revista de Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p. 258-259, 1989.

MARQUES, A. A. B. et al. **Lista das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul**. Decreto nº 41.672, de 11 de junho de 2002. Porto Alegre, FZB/MCT-PUCRS/PANGEA. 52p., 2002. (Publicações avulsas FZB, 11).

MARTIN, J. W. & ABELE, L. G. Phylogenetic Relationships of the Genus *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae), with Comments on Anomuran Phylogeny. **Journal of Crustacean Biology**, v. 6, n. 3, p. 576-616, 1986.

MARTIN, J. W. & ABELE L. G. External Morphology of the Genus *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 453, p. 46, 1988.

MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. (editor). Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001.

MCLAUGHLIN A. P.; LEMAITRE, R.; SORHANNUS U. Hermit Crab Phylogeny: A Reappraisal and Its “Fall-out”. **Journal of Crustacean Biology**, v. 27, n.1, p. 97-115, 2007.

MCLAUGHLIN, P. A.; LEMAITRE, R.; CRANDALL, K. A. Annotated Checklist of Anomuram Decapod Crustacean of the World (Exclusive of the Kiwaoidea and Families Chirostyliidae and Galatheidae of the Galatheoidea) Part III – Aegloidea. **The Raffles Bulletin of Zoology**, n. 23, p. 131-137, 2010.

MORRONE, J. J. & LOPRETTO, E. C. Distributional Patterns of Freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) in Southern South America: A Panbiogeographic Approach. **Journal of Biogeography**, v. 21, p. 97-109, 1994.

NYLANDER, J. A. A. **MrModelTest v. 2**. Program Distributed by the Author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.

PEREIRA, P. R. B. et al. Contribuição à Geografia Física do Município de Santa Maria: Unidades de Paisagem. **Geografia, Ensino e Pesquisa**, v. 3, p. 37-68, 1989.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Phylogenetic Relationships among the Species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) Freshwater Crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 2, p. 304-313, 2002c.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Conservation Phylogenetics of Chilean Freshwater Crabs *Aegla* (Anomura: Aeglidae): Assigning Priorities for Aquatic Habitat Protection. **Biological Conservation**, v. 105, p. 345-353, 2002b.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Molecular Systematics and Biogeography of the Southern South American Freshwater "Crabs" *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) Using Multiple Heuristic Tree Search Approaches. **Systematic Biology**, v. 53, n. 5, p. 767-780, 2004.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Conservation Assessment of Southern South American Freshwater Ecoregions on the Basis of the Distribution and Genetic Diversity of Crabs from the Genus *Aegla*. **Conservation Biology**, 2009.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Phylogenetic Position of the Freshwater Anomuran Family Aeglidae. **Journal of Crustacean Biology**, v.22, n.3, p. 670-676, 2002a.

POSADA D. & CRANDALL K. ModelTest: Testing the Model of DNA Substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3ª ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2006. 752p.

RONQUIST, F. & HUelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

SANTOS, S. et al. Natural Diet of the Freshwater Anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). **Journal of Natural History**, v. 42, p. 1027 - 1037, 2008.

SANTOS, S. et al. *Aegla manuinflata*, a New Species of Freshwater Anomuran



(Decapoda: Anomura: Aeglidae) from Brazil, Determined by Morphological and Molecular Characters. **Zootaxa**, v. 2088, p. 31 - 40, 2009.

SAITOU, N. & NEI, M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 406-425, 1987.

SWOFFORD, D. L. **PAUP\* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)** Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2003.

TAMURA, K. et al. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAJIMA, F. The Effect of Change in Population Size on DNA Polymorphism. **Genetics**, n. 123, p. 597-601, 1989.

WILSON, G. D. F. et al. Monsoon-influenced Speciation Patterns in a Species Flock of *Eophreatoicus Nicholls* (Isopoda; Crustacea). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 349-364, 2009.

YOTOKO, K. S. C., VALE, T. B.; BONATTO, S. L. **PhyCon**. Viçosa, 2007.