

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

Marcio Limberger

**TAXONOMIA E BIOLOGIA POPULACIONAL DE DUAS
ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *HYALELLA* (CRUSTACEA,
AMPHIPODA, HYALELLIDAE)**

Santa Maria, RS, Brasil

2020

Marcio Limberger

**TAXONOMIA E BIOLOGIA POPULACIONAL DE DUAS
ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *HYALELLA* (CRUSTACEA,
AMPHIPODA, HYALELLIDAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas – Área Biodiversidade Animal**.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ângelo Sganzerla Graichen

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela da Silva Castiglioni

Santa Maria, RS, Brasil

2020

Marcio Limberger

Limberger, Marcio
TAXONOMIA E BIOLOGIA POPULACIONAL DE DUAS ESPÉCIES
SIMPÁTRICAS DE HYALELLA (CRUSTACEA, AMPHIPODA,
HYALELLIDAE) / Marcio Limberger.- 2020.
96 p.; 30 cm

Orientador: Daniel Ângelo Sganzerla Graichen
Coorientadora: Daniela da Silva Castiglioni
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2020

1. Taxonomia 2. Biologia populacional 3. Simpatría I.
Ângelo Sganzerla Graichen, Daniel II. da Silva
Castiglioni, Daniela III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MARCIO LIMBERGER, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**TAXONOMIA E BIOLOGIA POPULACIONAL DE DUAS
ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *HYALELLA* (CRUSTACEA,
AMPHIPODA, HYALELLIDAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas – Área Biodiversidade Animal**.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2020:


Daniel Angelo Sganzerla Graichen, Dr.
(Presidente/Orientador)


Sandro Santos, Dr. (UFSM)


Jesser Fidelis de Souza Filho, Dr. (UFPE)

Santa Maria, 18 de fevereiro de 2020

AGRADECIMENTOS

A todos os professores e orientadores que fizeram parte da minha caminhada.

Agradeço imensamente à Profa. Dra. Daniela da Silva Castiglioni pelas infinitas horas dedicadas às nossas conversas regadas com muita alegria, descontração e grandes ensinamentos. Pelo seu apoio incansável durante toda minha jornada. Por me incentivar em todos os momentos, confiando a mim seus ensinamentos e por me apresentar este fantástico mundo que acabou por mudar completamente minha trajetória de vida. Mais do que uma grande mentora, uma grande amiga, sempre dedicada e disposta e me inspirando a cada dia mais com sua incrível paixão pelo seu trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel Ângelo Sganzerla Graichen, por aceitar a missão de me orientar e me proporcionar a grande oportunidade de poder desenvolver este projeto, agradeço de coração por todo o apoio e compreensão nos momentos mais adversos durante toda minha trajetória acadêmica. Pela fantástica capacidade de inspirar alegria e confiança em todos ao seu entorno, nunca nos deixando fraquejar, sempre com determinação e perseverança.

Ao técnico Adriano Alves de Paula, por sua enorme paciência no desenvolvimento dos trabalhos de bancada no Laboratório de Genética Evolutiva (GENEVO). Por dividir comigo seus conhecimentos e pela sua admirável visão científica.

Em especial à Carolina Rangel, “minha fiel escudeira”, que me acompanhou durante todo o desenvolvimento deste trabalho, que dedicou incontáveis horas a este projeto, entre saídas de campo e laboratório, sempre com seu sorriso sincero e sua incrível disposição para tudo.

À Fabiane Dalcin Bosson e Otto Bosson Limberger pela compreensão e apoio nos mais diversos momentos durante todas estas mudanças e novas etapas em nossas vidas, pelo companheirismo nas grandes alegrias e também nos momentos de dificuldades. Obrigado por estarem sempre ao meu lado me proporcionando a paz e o equilíbrio necessários para a realização deste grande sonho, com amor.

À toda minha família, que sempre me apoiou incondicionalmente. Em especial a meus pais e irmãos por seus ensinamentos e grande incentivo para que eu sempre fosse em busca de meus objetivos.

A todos os colegas que fizeram parte de minha vida acadêmica e de certa forma contribuíram para o segmento desta minha trajetória, em especial aos antigos colegas Bárbara Letícia Botura Schünemann, Maico Stochero Fiedler e Rafael Pereira Fontoura, meus grandes companheiros durante a graduação, pelas incansáveis maratonas de estudos e troca de conhecimentos. Mais do que admiráveis pessoas, eternos amigos. Obrigado por fazerem parte desta caminhada.

Em especial à Jéssica Bressan Schwantes, grande amiga e colega, pela parceria nestes dois longos anos. Por sermos os “amuletos da sorte” um do outro nessas empreitadas. E que venha a próxima etapa!

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado, pelo carinho e pelos momentos inesquecíveis que passamos durante todo este tempo, pelos momentos de descontração e por abrirem minha mente para novas perspectivas com constante apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pela oportunidade de aprendizado e acesso à pesquisa desde a graduação até este momento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal pelo apoio e suporte para o desenvolvimento deste projeto de mestrado.

"Age sempre de tal modo que o teu comportamento possa vir a ser princípio de uma lei universal."

(Immanuel Kant)

RESUMO

TAXONOMIA E BIOLOGIA POPULACIONAL DE DUAS ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *HYALELLA* (CRUSTACEA, AMPHIPODA, HYALELLIDAE)

AUTOR: Marcio Limberger
ORIENTADOR: Daniel Ângelo Sganzerla Graichen
CO-ORIENTADORA: Daniela da Silva Castiglioni

Os anfípodos de água doce do gênero *Hyaella* são típicos das águas continentais americanas e apresentam altos níveis de endemidade. No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul apresenta a maior diversidade de espécies para o gênero conhecida até o momento. Este trabalho descreve uma nova espécie, *Hyaella* sp. nov., que ocorre em simpatria com *H. gauchensis* numa nascente do município de Palmeira das Missões, sul do Brasil. Em *Hyaella* sp. nov. observou-se os seguintes caracteres: antena 2 com comprimento que abrange mais da metade do tamanho corpóreo total, gnatopodo 2 apresenta palma irregular com propodo alongado, ramo interno do uropodo 1 do macho com ausência da seta curva apicalmente, pedúnculo do uropodo 3 com sete setas cuspidadas distais fortes com setas acessórias e ramo com dez setas cuspidadas e com setas acessórias. *Hyaella* sp. nov. ocorre em simpatria com *H. gauchensis*, mas estas diferem especialmente em forma e tamanho do gnatopodo 2, presença de seta curva no urópodo 1 dos machos em *H. gauchensis* e ausência em *Hyaella* sp. nov., comprimento da antena (maior em *Hyaella* sp. nov.) e número de setas cuspidadas nos urópodos 1, 2 e 3. A partir deste trabalho, o número de espécies de *Hyaella* encontradas no Brasil é de 29 e 13 para o estado do Rio Grande do Sul. Além da descrição taxonômica, neste trabalho foram analisadas a dinâmica populacional e aspectos reprodutivos de dois morfotipos de *Hyaella* (*Hyaella gauchensis* e *Hyaella* sp. nov.) que vivem em simpatria em uma nascente encontrada na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As coletas foram realizadas no período 12 meses (abril de 2018 a março de 2019) com duração de 10 minutos por coleta com puçá por uma pessoa e transportadas ao laboratório. Todos os indivíduos amostrados foram sexados, mensurados e separados por classes de tamanho de comprimento de cefalotórax (CC) durante todos os meses. Ambas as espécies apresentaram distribuição bimodal na maioria das estações do ano, exceto as fêmeas de *H. gauchensis* que apresentaram distribuição polimodal. A espécie *H. gauchensis* apresentou maior abundância e comprimento médio do cefalotórax superior quando comparada com *Hyaella* sp. nov. Em ambas as espécies os machos apresentaram maior tamanho corpóreo (CC) do que as fêmeas, embora ocorram em menor número. Tanto *H. gauchensis* quanto *Hyaella* sp. nov. tiveram seu pico reprodutivo e de recrutamento durante as estações mais frias do ano (inverno e outono, respectivamente), indicando que a separação temporal destes comportamentos entre as duas populações possa evidenciar diferentes estratégias e/ou adaptações evolutivas para a que as mesmas consigam coexistir.

Palavras chave: *Hyaella*. Taxonomia. Dinâmica populacional. Simpatria. Ecologia.

ABSTRACT

TAXONOMY AND POPULATION BIOLOGY OF TWO *HYALELLA* SYMPATRIC SPECIES (CRUSTACEA, AMPHIPODA, HYALELLIDAE)

AUTOR: Marcio Limberger
ADVISOR: Daniel Ângelo Sganzerla Graichen
CO-ADVISOR: Daniela da Silva Castiglioni

Freshwater amphipods of the genus *Hyaella* are typical in American continental waters and have high levels of endemism. In Brazil, the state of Rio Grande do Sul has the greatest diversity of species for the genus known so far. This work describes a new species, *Hyaella* n. sp., which occurs in sympatry with *H. gauchensis* in a spring in the municipality of Palmeira das Missões, southern Brazil. In *Hyaella* n. sp. the following characters were observed: antenna 2 with a length that covers more than half of the total body size, gnathopod 2 has an irregular palm with an elongated propodus, inner ramus of the male uropod 1 with absence of the apical curve setae, uropod 3 peduncle with seven strong distal spattered setae with accessory setae and ramus with ten cuspidate setae and with accessory setae. *Hyaella* n. sp. occurs in sympatry with *H. gauchensis*, but these differ especially in shape and size from gnathopod 2, presence of curved setae in the uropod 1 of males in *H. gauchensis* and absence in *Hyaella* n. sp., antenna length (largest in *Hyaella* n. sp.) and number of cuspidated setae in the uropods 1, 2 and 3. According to this work, the number of *Hyaella* species found in Brazil is 29 and 13 for the state of Rio Grande do Sul. Since these amphipods are important indicators of environmental quality in the ecosystems where they inhabit, it is of great importance to have knowledge about the biology and population dynamics of these organisms for conservation measures. However, so far there have been few ecological studies about *Hyaella* species from Brazil. These studies could help to assess the impacts of various human activities on freshwater environments. Besides the taxonomic description, this work analyzed the population dynamics and reproductive aspects of two *Hyaella* morphotypes (*Hyaella gauchensis* and *Hyaella* n. sp.) that live in sympatry in a spring found in the northwestern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The collections were carried out during a period of 12 months (April 2018 to March 2019) lasting 10 minutes per collection with hand net by one person and transported to the laboratory. All individuals sampled were sexed, measured and separated by cephalothorax (CC) length size classes during all months, and both morphotypes showed bimodal distribution in most seasons, except the females of *H. gauchensis* that showed polymodal distribution. *H. gauchensis* had a higher abundance and higher average cephalothorax length when compared with *Hyaella* n. sp.. In both species, males body size (CC) was greater than that of females, although they occur in smaller numbers. Both *H. gauchensis* and *Hyaella* n. sp. had their peak breeding and recruitment during the colder seasons of the year (winter and autumn, respectively), indicating that the temporal separation these behaviors between the two populations may highlight different strategies and/or evolutionary adaptations for them to coexist.

Key words: *Hyaella*. Taxonomy. Population dynamics. Sympatry. Ecology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figure 1. Type-locality of *Hyaella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni (spring) in Palmeira das Missões municipality, state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil..... 46
- Figure 2. Male of *Hyaella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Scale -0.60mm 47
- Figure 3. *Hyaella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Male. (A) habitus from holotype; (B) antenna 1; (C) antenna 2; (D) mandible; (E) upper-lip; (F) Lower-lip; (G) maxilla 1; (H) maxilla 2; (I) maxiliped 48
- Figure 4. *Hyaella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Male. (A) gnathopod 1; (B) gnathopod 2. (C) propodus of the gnathopod 2 of male 49
- Figure 5. *Hyaella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Male. (A) peraeopod 3; (B) peraeopod 4; (C) peraeopod 5; (D) peraeopod 6; (E) peraeopod 7; (F) pleopod 50
- Figure 6. *Hyaella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Male. (A) uropod 1; (B) uropod 2; (C) uropod 3; (D) telson..... 51
- Figure 7. *Hyaella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Female. (A) gnathopod 1; (B) gnathopod 2..... 52
- Figure 8. Phylogenetic tree of *Hyaella* species used in this study. A) Maximum likelihood phylogenetic tree using sequences of COI gene (T92+G+I) and *Hyaella azteca* species as an external groups. B) Maximum likelihood phylogenetic tree using sequences of the 16S gene (T92+G+I) and the *H. azteca* species as an external group. 53

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Nascente onde *H. gauchensis* e *Hyaella*. sp. nov. foram amostradas em simpatria na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul..... 58
- Figura 2. Proporção entre *Hyaella gauchensis* e *Hyaella* sp. nov. amostradas ao longo do ano na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. 63
- Figura 3. Distribuição de frequência relativa total (%) por classe de tamanho do comprimento do cefalotórax (CC) de machos, fêmeas e juvenis de *Hyaella gauchensis* na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul..... 65
- Figura 4. Distribuição de frequência relativa total (%) por classe de tamanho do comprimento do cefalotórax (CC) de machos, fêmeas e juvenis de *Hyaella* sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul..... 65
- Figura 5. Distribuição de frequência relativa (%) por classe de tamanho do comprimento do cefalotórax (mm) por estação do ano em *Hyaella gauchensis* na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. 66
- Figura 6. Distribuição de frequência relativa (%) por classe de tamanho do comprimento do cefalotórax (mm) por estação do ano em *Hyaella* sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. 698

Figura 7. Proporção sexual sazonal de <i>Hyaella gauchensis</i> na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. O “*” indica diferenças significativas entre a proporção de machos e fêmeas (p<0,05).	70
Figura 8. Proporção sexual sazonal de <i>Hyaella</i> sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. O “*” indica diferenças significativas entre a proporção de machos e fêmeas (p < 0,05).	71
Figura 9. Proporção sexual por classe de tamanho de cefalotórax (CC) de <i>Hyaella gauchensis</i> na região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. O “*” indica diferenças significativas nas proporções entre machos e fêmeas (p<0,05).	72
Figura 10. Proporção sexual por classe de tamanho de cefalotórax (CC) de <i>Hyaella</i> sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. O “*” indica diferenças significativas nas proporções entre machos e fêmeas (p<0,05).	72
Figura 11. Frequência relativa (%) mensal de casais (indivíduos encontrados em comportamento pré-copulatório) de <i>Hyaella gauchensis</i> e <i>Hyaella</i> sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.	73
Figura 12. Frequência relativa (%) sazonal de casais (indivíduos encontrados em comportamento pré-copulatório) de <i>Hyaella gauchensis</i> e <i>Hyaella</i> sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa (p<0,05) entre as estações, onde letras maiúsculas representam <i>H. gauchensis</i> e letras minúsculas representam <i>Hyaella</i> sp. 1.	73
Figura 13. Frequência relativa (%) de fêmeas ovígeras de <i>Hyaella gauchensis</i> e <i>Hyaella</i> sp. nov. ao longo do ano na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.	74
Figura 14. Frequência relativa (%) sazonal de fêmeas ovígeras de <i>Hyaella gauchensis</i> e <i>Hyaella</i> sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa (p<0,05) entre as estações do ano, onde letras maiúsculas representam <i>H. gauchensis</i> e letras minúsculas representam <i>Hyaella</i> sp. nov.	75
Figura 15. Frequência de juvenis de <i>Hyaella gauchensis</i> e <i>Hyaella</i> sp. nov. ao longo das diferentes estações do ano na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa na frequência de juvenis (p<0,05) entre as estações do ano, onde letras maiúsculas representam a comparação de <i>H. gauchensis</i> e letras minúsculas representam <i>Hyaella</i> sp. nov.	76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table I. Main morphological differences between <i>Hyaella</i> n. sp. from nearby areas in Brazil (state of Rio Grande do Sul) and Argentina	39
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros ambientais do ponto de amostragem de <i>Hyaella gauchensis</i> e <i>Hyaella</i> sp. nov., na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.	61
Tabela 2. Número de indivíduos de <i>Hyaella gauchensis</i> amostrados mensalmente, proporção sexual mensal (machos: fêmeas) e análise de ajuste de bondade (χ^2), na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.....	62
Tabela 3. Número de indivíduos de <i>Hyaella</i> sp. nov. amostrados mensalmente, proporção sexual mensal (machos: fêmeas) e análise de ajuste de bondade (χ^2), na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul	Erro! Indicador não definido.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. REFERÊNCIAS	20
4. CAPÍTULO 1- A NEW SPECIES OF FRESHWATER AMPHIPOD (CRUSTACEA, PERACARIDA, HYALELLIDAE) FROM SOUTHERN BRAZIL.....	26
5. CAPÍTULO 2- BIOLOGIA POPULACIONAL E REPRODUTIVA DE DUAS ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE <i>HYALELLA</i> (CRUSTACEA, AMPHIPODA, HYALELLIDAE), DA REGIÃO SUL DO BRASIL	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
7. ANEXOS	94
7.1 ANEXO A- Supplementary table 1- <i>Hyalella</i> samples used in this study.	94
7.2 ANEXO B- Supplementary table 2. COI distance.....	96
7.3 ANEXO C- Supplementary table 3. 16S distance.....	96

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os crustáceos podem ser considerados um grupo dominante e de grande sucesso evolutivo, exibindo uma impressionante diversidade de hábitos, formas e tamanhos, constituindo um grupo muito heterogêneo, o que pode direcionar e maximizar a sobrevivência das espécies em diferentes circunstâncias, além de possibilitar que habitem todas as profundidades nos diversos ambientes marinhos, salobros e dulcícolas, inclusive com alguns representantes no ambiente terrestre (SASTRY 1983; HARTNOLL & GOULD 1988). Estes organismos possuem uma grande importância nos ecossistemas onde habitam, podendo influenciar nas comunidades de meiofauna e macrofauna, com sua ampla distribuição em regiões tanto polares, como tropicais e temperadas, pode ser considerado um dos mais importantes táxons das comunidades bentônicas, principalmente no que se refere a abundância, biomassa e diversidade (BACHALET 2003).

Dentre os crustáceos, destacam-se os da Superordem Peracarida, que juntamente com a Ordem Decapoda representam a maioria dos representantes da Classe Malacostraca (MARTIN & DAVIS 2001). Dentro da Superordem Peracarida, embora geralmente apresentem um pequeno tamanho corporal, especialmente os anfípodos e isópodos, são abundantes e amplamente distribuídos ao redor do planeta nos mais diferentes ambientes de águas frias e ambientes dulcícolas subterrâneos (OLIVER et al., 1982; VÄINÖLÄ et al., 2008). Com distribuição predominantemente marinha, os anfípodos possuem também alguns representantes em ambientes terrestres e 20% de suas espécies habitam ambientes de água doce (VÄINÖLÄ et al., 2008).

Os anfípodos são comumente encontrados em regiões temperadas, onde frequentemente apresentam dominância nas comunidades bentônicas das zonas profundas dos lagos e ambientes onde habitam (ISHIKAWA & URABE, 2002; VÄINÖLÄ et al., 2008). Além disso, representam a segunda maior Ordem de Peracarida, estando distribuídos em seis Subordens, Pseudingolfiellidea, Hyperiidea, Colomastigidea, Hyperiopsidea, Senticaudata e Amphilochidea. (LOWRY & MYERS, 2017). A Subordem Senticaudata, criada recentemente em uma revisão realizada por Lowry & Myers (2013), encontra-se dividida em seis Infraordens, sendo elas: Carangoliopsida,

Talitrida, Corophiida, Hadziida, Bogidieliida e Gammarida. Por sua vez, a Infraordem Talitrida é a terceira maior dentre Senticaudata, comportando 15 famílias no total, na qual se insere a Família Hyallellidae (LOWRY & MYERS, 2017). De acordo com Fišer et al. (2013) a diversidade de crustáceos anfípodos de água doce na América do Sul é extremamente baixa, quando comparada com outras regiões do planeta, apresentando registro de 10 famílias, 22 gêneros e 74 espécies. Entretanto, a diversidade desses crustáceos é evidentemente mais elevada nos dias atuais, especialmente quando se leva em consideração às espécies pertencentes à família Hyallellidae. Cabe salientar que de acordo com GONZÁLES & WATLING (2003b), apenas no Lago Titicaca existem provavelmente mais de 100 espécies endêmicas a serem descritas.

Os crustáceos anfípodos de água doce da Família Hyallellidae tem como seu único representante o gênero *Hyalella* Smith, 1874. As espécies do gênero podem ser encontradas nos mais diversos tipos de habitats, principalmente junto à vegetação aquática marginal de lagos, lagoas, córregos, açudes e nascentes, e em alguns casos, até mesmo em ambientes aquáticos subterrâneos (GROSSO & PERALTA, 1999; BUENO et al., 2014). Embora as espécies do gênero *Hyalella* apresentem uma ampla distribuição em ecossistemas dulcícolas distintos, elas encontram-se restritas às regiões biogeográficas neártica e neotropical, sendo bastante comum na América do Norte e ocorrendo também na América Central e América do Sul, onde cada vez mais se tem encontrado registros da presença do gênero (GONZÁLEZ & WATLING, 2002a; PEREIRA, 2004; GONZÁLEZ et al., 2006; SANTOS et al., 2008; CARDOSO et al., 2011; STRECK-MARX & CASTIGLIONI, 2020). Além disso, é o único gênero de crustáceos anfípodos encontrados nos ambientes límnicos do Brasil (BENTO & BUCKUP, 1999; BUENO et al., 2014).

Atualmente existem 78 espécies do gênero *Hyalella* descritas para as Américas, com representação de maior diversidade na América do Sul totalizando 64 espécies, sendo que 28 ocorrem no Brasil (BUENO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014; CARDOSO et al., 2015; COLLA; CÉSAR 2015; STRECK et al., 2017; BASTOS-PEREIRA et al., 2018; BUENO et al., 2019; DRUMM & KNIGHT-GRAY, 2019; STRECK-MARX & CASTIGLIONI, 2020). Para o estado do Rio Grande do Sul, foi registrada a ocorrência de 12 espécies, sendo elas: *H. curvispina* Shoemaker, 1942; *H. montenegrinae* Bond-Buckup & Araújo, 1998; *H. pseudoazteca* González & Watling, 2003; *H. pleoacuta* González, Bond-Buckup & Araújo, 2006; *H. castroi* González, Bond-Buckup & Araújo,

2006; *H. bonariensis* Bond-Buckup, Araujo & Santos, 2008; *H. pampeana* Cavalieri, 1968; *H. imbya* Rodrigues & Bueno, 2012; *H. kaingang* Bueno & Araujo, 2013; *H. georginae* Streck & Castiglioni 2017; *H. gauchensis* Streck & Castiglioni, 2017 e *H. palmeirenses* Streck-Marx & Castiglioni 2020 (GONZÁLEZ et al., 2006; CARDOSO et al., 2011; BUENO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; STRECK et al., 2017; STRECK-MARX & CASTIGLIONI, 2020), o que caracteriza o estado com a maior diversidade de espécies conhecidas no país até o presente momento.

Por não possuírem um estágio de vida dispersor, já que apresentam desenvolvimento direto, sem um estágio larval, as espécies de anfípodos de uma forma geral não possuem uma ampla distribuição geográfica (BARNARD & KARAMAN, 1983). Para as espécies de água doce, o endemismo parece ser ainda mais comum, principalmente com relação às que ocorrem em lagos, lagoas e ambientes subterrâneos (VÄINÖLÄ et al., 2008), como no caso dos anfípodos dulcícolas do gênero *Hyaella*.

Mesmo que a existência de complexos de espécies crípticas na América do Sul ainda não tenha sido comprovada, a descrição de espécies crípticas de *Hyaella* na América do Norte demonstra que a real diversidade sul-americana pode estar subestimada (RODRIGUES, 2016). Contudo, não é incomum a ocorrência de diferentes espécies de *Hyaella* em um mesmo corpo d'água, o que nos leva a destacar a importância de estudos sobre o relacionamento ecológico entre estas espécies (CASTIGLIONI & BOND-BUCKUP, 2007; CASTIGLIONI & BOND-BUCKUP, 2008a). Hutchinson (1981) comenta que as variações temporais naturais na estrutura populacional tais como abundância, razão sexual e distribuição de tamanho são informações importantes que possibilitam a compreensão da estabilidade ecológica de uma espécie. De acordo com Castiglioni & Bond-Buckup (2008a), pelo fato de algumas espécies de *Hyaella* serem utilizadas como bioindicadores de qualidade ambiental, é de extrema importância que se conheça o ciclo de vida dessas espécies, especialmente a dinâmica populacional em habitat natural.

Levando em conta a coexistência de diferentes espécies do mesmo gênero em um pequeno espaço geográfico, podemos inferir que algumas espécies de *Hyaella* podem ser consideradas como simpátricas (CASTIGLIONI, 2007). Segundo Ricklefs (1993), a simpatria refere-se às áreas de sobreposição nas distribuições de espécies e, nos casos de simpatria entre duas espécies que tenham uma ecologia semelhante, a competição pode causar maior divergência na área de sobreposição do que nas áreas onde não há

sobreposição. A simpatria de espécies pertencentes ao mesmo gênero pode ser decorrente de diversas adaptações seletivas a partir da competição entre estas espécies (ABRAMS, 1983). Espécies simpátricas frequentemente apresentam características morfológicas distintas, que podem ser interpretadas como adaptações evolutivas em resposta a competição intraespecífica. Se elas de fato diferirem mais do que ao acaso na utilização dos recursos disponíveis, essas diferenças poderiam ser atribuídas a fatores ecológicos e/ou evolutivos (FUTUYMA, 1998). Castiglioni & Bond-Buckup (2008a) sugerem que a co-ocorrência das espécies de *Hyaella* é possível devido a sutís diferenças em traços de sua história de vida, levando em conta especialmente seu tamanho corporal e suas estratégias reprodutivas, como picos diferenciais de acasalamento em estações distintas e variações entre tamanho e número na produção de embriões.

Neste sentido, cabe ressaltar a relevância do conhecimento sobre a biologia reprodutiva destes organismos. Segundo López-Greco & Rodríguez (1999), a grande demanda de energia que os animais investem durante o período de reprodução torna este processo um evento crítico em seu ciclo de vida, tendo em vista que a energia investida pode estar ligada diretamente ao seu sucesso reprodutivo das populações.

Para melhor compreensão acerca da biologia reprodutiva do gênero *Hyaella*, é importante que se conheça também alguns de seus aspectos morfológicos. As características secundárias que compreendem o dimorfismo sexual em anfípodos podem ser identificadas através da presença do marsúpio nas fêmeas, que é formado pelos oostegitos em conjunto com a superfície ventral do tórax, e pelo desenvolvimento/alongamento do segundo par de gnatópodos nos machos, que é utilizado para manutenção do comportamento pré-copulatório e proteção durante o período de acasalamento (KRUSCHWITZ, 1978; MORRIT & SPICER, 1996). Após o desenvolvimento completo destas características morfológicas, acredita-se que os indivíduos possam atingir a maturidade sexual e iniciar o processo de reprodução, entretanto, o comportamento pré-copulatório é o indicativo mais preciso de que os machos e fêmeas estão aptos a se reproduzirem. (BOROWSKY, 1991).

Segundo Borowsky (1991) durante o comportamento pré-copulatório os machos carregam as fêmeas por alguns dias, presas pelo primeiro par de gnatópodos em sua região torácica, permanecendo pareados até o momento de ovulação e fertilização. Após a cópula, os ovos são liberados e fertilizados dentro do marsúpio da fêmea, onde permanecem desde a incubação, até a eclosão dos juvenis, que continuam no marsúpio

até que estejam aptos a serem liberados para o ambiente, apresentando características morfológicas semelhantes à de indivíduos adultos. (STRONG, 1972; BOROWSKY, 1991; STEELE & STEELE, 1991; MORRIT & SPICER, 1996). A permanência dos juvenis dentro do marsúpio das fêmeas pode acarretar na produção de embriões maiores e em menor número quando comparadas as fêmeas de espécies de outros anfípodos que não possuam cuidado parental, mas por outro lado, pode fornecer proteção para a prole contra predadores até o momento da liberação dos indivíduos para o meio (SHEADER, 1977; SHILLAKER & MOORE, 1987; THIEL, 1999).

Embora seja de grande importância o conhecimento sobre seus aspectos biológicos, até o momento percebe-se uma grande carência de pesquisa neste sentido para o gênero *Hyaella* dentro do país. Os trabalhos ecológicos com espécies simpátricas no Brasil restringem-se a estudos sobre biologia populacional e reprodutiva de *H. pleoacuta* e *H. castroi* no estado do Rio Grande do Sul (CASTIGLIONI, 2007; CASTIGLIONI & BOND-BUCKUP, 2007; CASTIGLIONI et al., 2007; CASTIGLIONI & BOND-BUCKUP, 2008a; CASTIGLIONI & BOND-BUCKUP, 2008b; CASTIGLIONI & BOND-BUCKUP, 2009).

No Brasil, a maioria dos trabalhos desenvolvidos com *Hyaella* trata de descrições de novas espécies (GONZÁLEZ & WATLING, 2002a; GONZÁLEZ & WATLING, 2002b; GONZÁLEZ & WATLING, 2002c; GONZÁLEZ & WATLING, 2003a; GONZÁLEZ & WATLING, 2003b; BALDINGER, 2004; PEREIRA, 2004; GONZÁLEZ et al., 2006; CARDOSO et al., 2011; BASTOS-PEREIRA & BUENO, 2012; RODRIGUES et al., 2012; BASTOS-PEREIRA & BUENO, 2013; BUENO et al., 2013; CARDOSO et al. 2015; RODRIGUES et al. 2014; STRECK et al., 2017; BASTOS-PEREIRA et al., 2018; STRECK-MARX & CASTIGLIONI, 2020), o que aponta para a grande necessidade do desenvolvimento de pesquisas relacionadas a uma melhor compreensão dos ciclos biológicos e interações das espécies do gênero *Hyaella* com os ecossistemas onde elas habitam, demonstrando um vasto campo de pesquisa, até então pouco explorado.

Além dos trabalhos desenvolvidos com as espécies simpátricas *H. pleoacuta* e *H. castroi*, a biologia populacional e as estratégias reprodutivas do gênero *Hyaella* no Brasil foram analisadas em *H. bonariensis* (CASTIGLIONI et al., 2016, 2018) em uma população no município de Silveira Martins, no estado do Rio Grande do Sul. Ainda para o mesmo estado, os aspectos reprodutivos de *H. georginae* e *H. gauchensis* foram

analisadas por Ozga & Castiglioni (2017), e posteriormente sua dinâmica populacional (OZGA et al., 2018). Os aspectos reprodutivos também foram observados em populações de *H. carstica* (TORRES et al., 2015) e *H. longistila* (BASTOS-PEREIRA & BUENO, 2016) no estado de Minas Gerais. Além destes trabalhos desenvolvidos dentro do país, Colla & César (2019) analisaram os aspectos ecológicos em populações de *H. pampeana* em uma reserva natural na Ilha de Martins Garcia (Rio de La Plata, Argentina), que se encontra em uma região relativamente próxima ao estado do Rio Grande do Sul.

Vale ressaltar, que também foram desenvolvidos trabalhos sobre a fisiologia de *H. pleoacuta* e *H. castroi* (DUTRA et al., 2007), *H. bonariensis* (CASTIGLIONI et al., 2010) e trabalhos sobre metabolismo e toxicidade de algumas espécies que ocorrem no Estado do Rio Grande do Sul (DUTRA et al., 2008; DUTRA et al., 2009; DUTRA et al., 2011).

Os ambientes dulcícolas podem ser considerados os ecossistemas mais ameaçados do mundo, piorando o cenário para os habitats dulcícolas de tamanho reduzido, como lagos e nascentes, bem como para as espécies endêmicas que ocorrem nesses ambientes. Assim, se acredita que a perda da biodiversidade na água doce exceda muito a dos ambientes marinhos e terrestres (NEL et al., 2009). Entretanto, diversas espécies de água doce estão sendo extintas ao longo dos anos antes mesmo de terem a oportunidade de serem descritas pela ciência, e a situação parece ser ainda mais grave para os invertebrados, como os crustáceos dulcícolas do gênero *Hyaella* (RODRIGUES, 2016). Segundo Bueno et al. (2013), até o momento existem poucos grupos de pesquisa que trabalham com taxonomia de *Hyaella* no Brasil. Além disso, as semelhanças morfológicas das espécies que compõe este grupo, a falta de taxonomistas especializados juntamente com algumas descrições e ilustrações incompletas, acabam por trazer grandes dificuldades no desenvolvimento de novas análises taxonômicas, contribuindo para um lento avanço no conhecimento da diversidade do grupo. Por este motivo, cabe salientar a importância da utilização de análises moleculares para a identificação de novas espécies, pois desta forma, não restariam dúvidas sobre a validade destes táxons (RODRIGUES, 2016).

Contudo, as contínuas descrições de novas espécies de *Hyaella*, principalmente na região sul do Brasil, apontam um grande potencial para o desenvolvimento de novos trabalhos de pesquisa, pois a identificação das espécies e o conhecimento acerca de sua

ecologia representam componentes fundamentais para estudos de biodiversidade em pequena e grande escala e para planejamentos de conservação.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Esta dissertação tem como objetivo analisar o status taxonômico de duas espécies do gênero *Hyaella* encontradas em simpatria em uma nascente do noroeste do estado do Rio Grande do Sul, além de caracterizar e comparar seus aspectos populacionais e reprodutivos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1. Descrever morfológicamente duas espécies de *Hyaella* que ocorrem em simpatria em uma nascente na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul;

2.2.2. Relacionar filogeneticamente duas espécies de *Hyaella* que ocorrem em simpatria com outras espécies encontradas na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

2.2.3. Caracterizar e comparar a dinâmica populacional e reprodutiva de duas espécies simpátricas de *Hyaella* avaliando sua abundância, tamanho corpóreo, maturidade sexual, distribuição de frequência em classes de tamanho, razão sexual, período reprodutivo e recrutamento.

3. REFERÊNCIAS

ABRAMS, P. 1983. The theory of limiting similarity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 14: 359-376.

BACHELET, G.; DAUVIN, J.C.; SORBE, J.C. 2003. An updated checklist of marine and brackish water Amphipoda (Crustacea, Peracarida) of the southern bay of Biscay. **Cahiers de Biologie Marine**, 44: 121-151.

BALDINGER, A.J. 2004. A new species of *Hyaella* (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Ash Springs, Lincoln County, USA, with a key to the species of the genus in North America and the Caribbean region. **Journal of Natural History**, 38: 1087-1096.

BARNARD, J. L.; KARAMAN, G. S. 1983. Australia as a major evolutionary center for Amphipoda (Crustacea). **Australia Museum Memoir**, 18(1): 44-61.

BASTOS-PEREIRA R.; OLIVEIRA, M.P.A.; FERREIRA, R.L. 2018. Anophthalmic and epigean? Description of an intriguing new species of *Hyaella* (Amphipoda, Hyaellidae) from Brazil. **Zootaxa**, 4407(2): 254-266.

BASTOS-PEREIRA, R.; BUENO, A.A.P. 2012. New species and new report of *Hyaella* S. I. Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Dogielinotidae) from Minas Gerais state, Southeastern Brazil. **Zootaxa**, 3350: 58-68.

BASTOS-PEREIRA, R.; BUENO, A.A.P. 2013. A new species of freshwater amphipod (Dogielinotidae, *Hyaella*) from Southeastern Brazil. **Nauplius**, 21: 79-87.

BASTOS-PEREIRA, R.; BUENO, A.A.P. 2016. Reproductive biology and egg production of *Hyaella longistyla* Faxon, 1876 (Amphipoda: Hyaellidae), a freshwater amphipod in southeastern Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, 36(5): 724-730

BENTO, F.M.; BUCKUP, L. 1999. Subordem Gammaridea. In: BUCKUP, L. & G. BOND-BUCKUP (Eds.). **Os Crustáceos do Rio Grande do Sul**: Ed. Universidade, UFRGS, Porto Alegre. p.177- 188.

BOROWSKY, B. 1991. Patterns of reproduction of some amphipod crustaceans and insights into the nature of their stimuli. In: BAUER, R.T. & MARTIN, W. **Journal of Crustacean Sexual Biology**, 355p.

BUENO, A.A.P.; BOND-BUCKUP, G.; GOMES, K.M.; CARDOSO, G.M.; ARAUJO, P.B. 2013. Two new species of *Hyaella* (Amphipoda, Dogielinotidae) from Brazil. **Crustaceana**, 86(7-8): 802-819.

BUENO, A.A.P.; OLIVEIRA, K.M.; WELLBORN, G. 2019. A new species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Oklahoma, USA. **Zootaxa**, 4700(2): 259-269.

- BUENO, A.A.P.; RODRIGUES, S. G.; ARAUJO, P. B. 2013. O estado da arte do gênero *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Senticaudata, Hyaellidae) no Brasil. In: HAYASHI, C. (Ed.). **Tópicos de Atualização em Ciências Aquáticas**. Uberaba: UFMT, p. 57-88.
- CARDOSO, G.M.; ARAUJO, P.B.; BUENO, A.A.P.; FERREIRA, R.L. 2015. Two new subterranean species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Brazil. **Zootaxa**, 3814(3): 353-368.
- CARDOSO, G.M.; BUENO, A.A.P.; FERREIRA, R.L. 2014. Two new subterranean species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Brazil. **Zootaxa**, 3814: 253-348.
- CARDOSO, G.M.; BUENO, A.A.P.; FERREIRA, R.L. 2011. A new troglotrophic species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from Southeastern Brazil. **Nauplius**, 19(1) 17-26.
- CASTIGLIONI D. S.; BOND-BUCKUP, G. 2007. Reproductive strategies of two sympatric species of *Hyaella* Smith, 1874 (Amphipoda, Dogielinotidae) in laboratory conditions. **Journal of Natural History**, 41(25-28): 1571-1584.
- CASTIGLIONI, D. S. 2007. **Os ciclos biológicos de duas espécies simpátricas de *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Peracarida, Amphipoda, Dogielinotidae)**. 2007. 256 p. Tese (Doutorado Biologia Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CASTIGLIONI, D.S.; BOND-BUCKUP, G. 2008a. Ecological traits of two sympatric species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from southern Brazil. **Acta Oecologica**, 33: 36-48.
- CASTIGLIONI, D.S.; BOND-BUCKUP, G. 2008b. Pairing and reproductive success in two sympatric species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from southern Brazil. **Acta Oecologica**, 33: 49-55.
- CASTIGLIONI, D.S.; BOND-BUCKUP, G. 2009. Egg production of two sympatric species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in aquaculture ponds in southern Brazil. **Journal of Natural History**, 43: 1273-1289.
- CASTIGLIONI, D.S.; DUTRA, B.K.; CAHANSKY, A.; RODRÍGUEZ, E.; OLIVEIRA, G.T.; BOND-BUCKUP, G. 2010. Variations in Biochemical Composition and Lipoperoxidation Levels of *Hyaella bonariensis* maintained in laboratory with different diets. **Animal Biology**, 60: 349-360.
- CASTIGLIONI, D.S.; GARCIA-SCHROEDER, D.; BARCELOS, D.F.; BOND-BUCKUP, G. 2007. Intermolt duration and postembryonic growth of two sympatric species of *Hyaella* (Amphipoda, Dogielinotidae) in laboratory conditions. **Nauplius**, 15(2): 57-64.
- CASTIGLIONI, D.S.; STRECK, M.T.; RODRIGUES, S.G.; BUENO, A.A.P. 2018. Reproductive strategies of a population of a freshwater amphipod (Crustacea,

Amphipoda, Hyalellidae) from southern Brazil. **Biota Neotropica**. 18(2): e20170470. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0470>

CASTIGLIONI, D.S.; STRECK, M.T.; RODRIGUES, S.G.; BUENO, A.A.P. 2016. Reproductive strategies of a population of a freshwater amphipod (Crustacea, Amphipoda, Hyalellidae) from southern Brazil. **Biota Neotropica**. 18(2): e20170470. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0470>

COLLA, M.F.; CESAR, I.I. 2015. A new species os *Hyalella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from the the Atlantic Forest of Misiones, Argentina. **Zookeys**, 481(1): 25-38.

COLLA, M.F.; CÉSAR, I.I. 2019. Ecological aspects of natural populations of *Hyalella pampeana* (Crustacea, Amphipoda, Hyalellidae) from the Natural Reserve Island of Martín García (Río de La Plata, Argentina). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 91: e20170928. DOI 10.1590/0001-3765201920170928.

DRUMM D.T.; KNIGHT-GRAY J. 2019 A new species of the *Hyalella* 'azteca' complex (Crustacea: Amphipoda: Hyalellidae) from Florida. **Zootaxa**, 4545(1): 093-104. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4545.1.5>

DUTRA, B.K., FERNANDES, F.A.; LAUFFER, A.L.; OLIVEIRA, G.T. 2009. Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology**, 149 (4): 640-646.

DUTRA, B.K.; CASTIGLIONI, D.S.; SANTOS, R.B.; BOND-BUCKUP, G.; OLIVEIRA, G.T. 2007. Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyalella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. **Comparative Biochemistry and Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology**, 148: 239-247.

DUTRA, B.K.; FERNANDES, F.A.; FAILACE, D.M.; OLIVEIRA, G.T. 2011. Effect of roundup (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). **Ecotoxicology**, 20: 255- 263.

DUTRA, B.K.; SANTOS, R.B.; BUENO, A.A.P.; OLIVEIRA, G.T. 2008. Seasonal \variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyalella curvispina* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). **Comparative Biochemistry and Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology**, 151: 322-328.

FIŠER, C., ZAGMAJSTER, M. & FERREIRA, R.L. 2013 Two new amphipod families recorded in South America shed light on an old biogeographical enigma. **Systematics and Biodiversity**, 11:2, 117-139.

FUTUYMA, D. 1998. Biologia evolutiva. Riberão Preto: **Sociedade Brasileira de genética – SBG**, 3ª ed. 832 p.

GONZÁLEZ, E.R.; BOND-BUCKUP, G.; ARAUJO, P.B. 2006. Two new species of *Hyaella* from southern Brazil (Amphipoda: Hyaellidae) with a taxonomic key. **Journal of Crustacean Biology**, 26(3): 355-365.

GONZÁLEZ, E.R.; WATLING, L. 2002a. A new species of *Hyaella* from the Andes in Perú (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae). **Revista de Biología Tropical**, 50(2): 649-658.

GONZÁLEZ, E.R.; WATLING, L. 2002b. Redescription of *Hyaella azteca* from its type locality, Vera Cruz, Mexico (Amphipoda: Hyaellidae). **Journal of Crustacean Biology**, 22(1): 173-183.

GONZÁLEZ, E.R.; WATLING, L. 2002c. Redescription of the freshwater amphipod *Hyaella* from Costa Rica (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae). **Revista de Biología Tropical**, 50(27): 659-667.

GONZÁLEZ, E.R.; WATLING, L. 2003a. A new species of *Hyaella* from Brazil (Crustacea: Amphipoda), and redescription of three other species in the genus. **Journal of Natural History**, 37(17): 2045 - 2076.

GONZÁLEZ, E.R.; WATLING, L. 2003b. A new species of *Hyaella* from Colombia, and the redescription of *H. meinerti* Stebbing, 1899 from Venezuela (Crustacea: Amphipoda). **Journal of Natural History**, 37(17): 2095-2111.

GROSSO, L.E.; PERALTA, M. 1999. Anfípodos de água Dulce sudamericanos. Revisión Del gênero *Hyaella* Smith. I. **Acta Zoológica Lilloana**, 45: 79-98.

HARTNOLL, R.G.; GOULD, P. 1988. Brachyuran life history strategies and the optimization of egg production. **Symposia of the Zoological Society of London**, 59: 1-9.

HUTCHINSON, G.E. 1981. **Introducción a la Ecología de Poblaciones**. Barcelona, Blume Editorial, 492p.

ISHIKAWA, T.; URABE, J. 2002. Population dynamics and production of *Jesogammarus annandalei*, an endemic amphipod, in Lake Biwa, Japan. **Freshwater Biology**, 47: 1935-1943.

KRUSCHWITZ, L.G. 1978. Environmental factors controlling reproduction of the amphipod *Hyaella azteca*. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, 58: 16-21.

LÓPEZ-GRECO, L.S.; RODRÍGUEZ, E.M. 1999. Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). **Cahiers de Biologie Marine**, 40: 155-164.

LOWRY, J.K.; MYERS, A.A. 2013. A Phylogeny and Classification of the Senticaudata subord. nov. Crustacea: Amphipoda). **Zootaxa**, 3610(1). doi:10.11646/zootaxa.3610.1.1

LOWRY, J.K.; MYERS, A.A. 2017. A Phylogeny and Classification of the Amphipoda with the establishment of the new order Ingolfiellida (Crustacea: Peracarida). **Zootaxa**, 4265(1), 1. doi:10.11646/zootaxa.4265.1.1

MARTIN, J.W.; DAVIS, G.E. 2001. An Updated Classification of the Recent Crustacea. **Natural History Museum of Los Angeles County**, Los Angeles, 124p.

MORRIT, D.; SPICER, J.I. 1996. The culture of eggs and embryos of amphipod crustaceans: implications for brood pouch physiology. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 76: 361-376.

NEL, J.L.; ROUX, D.J.; ABELL, R.; ASHTON, P.J.; COWLING, R.M.; HIGGINS, J.V.; THIEME, M.; VIERS, J.H. 2009. Progress and challenges in freshwater conservation planning. **Aquatic Conservation, Marine and Freshwater Ecosystems**, 19(1): 474-485.

OLIVER, J.S.; OAKDEN, J.M.; SLATTERY, P.N. 1982. Phoxocephalid amphipod crustaceans as predators on larvae and juveniles in marine soft-bottom communities. **Marine Ecology Progress Series.**, 7: 179-184p.

OZGA A.V.; CASTIGLIONI D.S. 2017. Reproductive biology of two species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from southern Brazil, **Journal of Natural History**, 51(41-42), 2509-2521

OZGA, A.V.; CASTRO, V.S.; CASTIGLIONI, D.S. 2018. Population structure of two freshwater amphipods (Crustacea: Peracarida: Hyaellidae) from southern Brazil. **Nauplius**, 26: e2018025. doi:10.1590/2358-2936e2018025

PEREIRA, V.F.G. 2004. *Hyaella dielaii* sp. nov. from São Paulo Brazil (Amphipoda, Hyaellidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 21(2): 179-184.

RICKLEFS, R.E. 1993. *A Economia da Natureza*. 3ª Edição. Editora **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 470p.

RODRIGUES, S.G. 2016. **Filogenia molecular, biogeografia e dinâmica populacional de anfípodos de água doce (Crustacea) da América do Sul**. 124 p. Tese (doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RODRIGUES, S.G.; BUENO, A.A.P.; FERREIRA, R.L. 2012. The first hypohelminth Crustacea (Amphipoda, Dogielinotidae, *Hyaella*) from South America. **Zookeys**, 236: 65-80.

RODRIGUES, S.G.; BUENO, A.A.P.; FERREIRA, R.L. 2014. A new troglolithic species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, hyaellidae) with a taxonomic key for the Brazilian species. **Zootaxa**, 3815(2): 200-214.

SANTOS, A.L.F.; ARAUJO, P.B.; BOND-BUCKUP, G. 2008. New species and new reports of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from Argentina. **Zootaxa**, 1760: 24-36.

- SASTRY, A.N. 1983. Ecological aspects of reproduction, p. 179-270. In: F.J. W.B. VERNBERG (Ed.). **The biology of crustacea: environmental adaptations**. New York, Academic Press. 7: 70-255.
- SHEADER, M. 1977. Breeding and marsupial development in laboratory-maintained *Parathemisto gaudichaudi* (Amphipoda). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 57: 943-954.
- SHILLAKER, R.O.; MOORE, P.G. 1987. The biology of brooding in the amphipods *Lembos websteri* Bate and *Corophium bonnellii* Milne-Edwards. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 110: 113-132.
- STEELE, D.H.; STEELE, V.J. 1991. Morphological and environmental restraints on egg production in amphipods. In: WENNER, A. & A. KURIS (Eds.). **Crustacean Egg production** - Crustacena Issues 7. A. A. Balkema, Rotterdam.
- STRECK, M.T.; CARDOSO, G.M.; RODRIGUES, S.G.; GRAICHEN, D.A.S.; CASTIGLIONI, D.S. 2017. Two new species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) from state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Zootaxa**, 4337(2) : 263-278.
- STRECK-MARX, M.T.; CASTIGLIONI, D.S. 2020. A new species of freshwater amphipod (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) from state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Biota Neotropica**, 20(1), e20190802. <https://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2019-0802>
- STRONG, JR. D.R. 1972. Life history variation among populations of an amphipod (*Hyaella azteca*). **Ecology**, 53: 1103-1111.
- THIEL, M. 1999. Extended parental care behavior in crustaceans - a comparative overview. **Crustacean Issues**, 12: 211-226.
- TORRES, S.H.S.; BASTOS-PEREIRA, R.; BUENO, A.A.P. 2015. Reproductive aspects of *Hyaella carstica* (Amphipoda: Hyaellidae) in a natural environment in southeastern Brazil. **Nauplius**, 23(2): 159-165.
- VÄINÖLÄ, R.; WITT, J.D.S.; GRABOWSKI, M.; BRADBURY, J.H.; JAZDZEWSKI, K.; SKET, B. 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. **Hydrobiologia**, 595(1): 241-255.

4. CAPÍTULO 1

Capítulo formatado de acordo com as normas da revista *Biota Neotropica*.

A new species of freshwater amphipod (Crustacea, Peracarida, Hyalellidae) from Southern Brazil

Marcio Limberger^{1,2,3*}, Daniela da Silva Castiglioni¹ & Daniel Ângelo Sganzerla Graichen^{2,3}.

¹*Laboratório de Zoologia e Ecologia, Campus de Palmeira das Missões, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Independência, 3751, 983000-000, Palmeira das Missões, RS, Brazil.*

²*Laboratório de Genética Evolutiva (GENEVO), Campus de Palmeira das Missões, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Independência, 3751, 983000-000, Palmeira das Missões, RS, Brazil.*

³*Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

**Corresponding author: Marcio Limberger, e-mail: limbergermarcio@gmail.com*

Abstract: The freshwater amphipod of genus *Hyalella* is typical from continental American waters and show high levels of endemicity and Brazil has the second largest diversity. A new species is described here, *Hyalella* n. sp. that occurs in sympatry in a spring of southern Brazil in the municipality of Palmeira das Missões, in the northwestern region of Rio Grande do Sul, southern Brasil. *Hyalella* n. sp. show the following characters: antenna 2 more than half body length, gnathopod 2 propodus elongated, uropod 1 inner ramus of male without curvae apically setae, uropod 3 peduncle with seven strong distal setae with accessory setae, ramus with ten cuspidate setae with accessory setae. *Hyalella* n. sp. occurs in sympatry with *H. gauchensis*, but these differ especially in size and shape of gnathopod 2, presence of curved setae in uropod 1 in *H. gauchensis* and absence in *Hyalella* n. sp. , antenna length (longer in *Hyalella* n. sp.) and number of

cuspidate setae on uropods 1, 2, and 3. Besides the morphological differences, *Hyaella* n. sp. presented genetic differences always above 19% for the COI gene and 29 % for the 16s gene, when compared with other species found in the northwestern region of the state of Rio Grande do Sul, showing that it is really a species not yet described by science.

Keywords: *diversity, Hyaella, state of Rio Grande do Sul, taxonomy.*

Uma nova espécie de anfípodo de água doce (Crustacea, Peracarida, Hyaellidae) do sul do Brasil

Resumo: Os anfípodos de água doce do gênero *Hyaella* são típicos das águas continentais americanas e apresentam altos níveis de endemidade e o Brasil possui a segunda maior diversidade. Uma nova espécie é descrita aqui, *Hyaella* sp. nov. que ocorre em simpatria em uma nascente no município de Palmeira das Missões, região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. *Hyaella* sp. nov. mostra os seguintes caracteres: antena 2 com alongamento superior a metade do corpo, própodo do gnatopodo 2 alongado, ramo interno do uropodo 1 do macho sem seta curva apicalmente, pedúnculo do uropodo 3 com sete setas distais fortes com setas acessórias e ramo com dez setas cuspidadas com setas acessórias. *Hyaella* sp. nov. ocorre em simpatria com *H. gauchensis*, mas estas diferem especialmente em tamanho e forma de gnatopodo 2, presença de seta curva no uropodo 1 em *H. gauchensis* e ausência em *Hyaella* sp. nov. , comprimento da antena (maior em *Hyaella* sp. nov) e número de sedas cuspidadas nos uropodos 1, 2 e 3. Além das diferenças morfológicas, *Hyaella* sp. nov. apresentou diferenças genéticas sempre acima de 19% para o gene COI e 29 % para o gene 16s, quando comparada com outras espécies encontradas na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, demonstrando que se trata realmente de uma espécie ainda não descrita pela ciência.

Palavras-chave: *diversidade, Hyaella, estado do Rio Grande do Sul, taxonomia.*

Introduction

The species of *Hyaella* Smith, 1874 inhabit different freshwater environments, associated with either the bottom sediments (benthic fauna) or the aquatic vegetation, wetlands or in subterranean environments (Poi de Neiff 1992, Grosso & Peralta 1999; Bueno et al. 2013), where these amphipods constitute a fundamental link in the transfer of matter and energy in those ecosystems (Casset et al. 2001, González et al. 2006, Castiglioni & Bond-Buckup 2008, Bueno et al. 2013).

Actually, the freshwater amphipod of the genus *Hyaella* includes approximately 80 species (Baldinger 2004, Fiser et al. 2013, Bueno et al. 2014, Colla & César 2015, Streck et al. 2017, Rodrigues et al. 2017, Bastos-Pereira et al. 2018, Drumm & Knight-Gray 2019, Worms 2019, Peralta & Miranda 2019, Bueno et al. 2019, Streck-Marx & Castiglioni 2020). Besides, the state of Rio Grande do Sul (Southern Brazil) has highest known diversity in this country, with eleven species described according to Bueno et al. (2014) and Streck et al. (2017): *H. bonariensis* Bond-Buckup, Araujo & Santos, 2008; *H. castroi* González, Bond-Buckup & Araujo, 2006; *H. curvispina* Shoemaker, 1942; *H. imbya* Rodrigues & Bueno, 2012; *H. kaingang* Araujo & Cardoso, 2013; *H. gauchensis* Streck & Castiglioni, 2017; *H. georginae* Streck & Castiglioni, 2017; *H. montenegrinae* Bond-Buckup & Araujo, 1998; *H. pampeana* Cavalieri, 1968; *H. pleoacuta* González, Bond-Buckup & Araujo, 2006; *H. pseudoazteca* González & Watling, 2003. Recently, a diversity of the genus has been increased at the state of Rio Grande do Sul by the descriptions of a new species (*H. palmeirensis* Streck-Marx & Castiglioni, 2020) totalizing twelve species of *Hyaella* for this state of the southern Brazil (Streck-Marx & Castiglioni 2020). Probably this figure could be higher due to a high number of difficult to identify cryptic species, this underscores the importance of genetic studies, which have proven to be essential tools in taxonomy and in describing the diversity of problem taxons, as well as in creating conservation programs for endangered freshwater aquatic environments. (Witt et al. 2006).

The aim of this work was to describe a new species of freshwater amphipod of the genus *Hyaella* from the northwest region of state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil.

Material and Methods

Amphipods were sampled in December 2014 at the spring (27°51'38.1"S-53°15'12.0W), municipality of Palmeira das Missões, locality of Distrito de Santa Rosa, Capão Alto, state of Rio Grande do Sul (southern Brazil) with the aid of a handnet, which collected macrophytes and the sediment.

In the laboratory, the cephalothorax length (CL) and total body length (TL) of 22 specimens (11 males and 11 females) was measured under a stereoscopic microscope with a millimetric scale. The total body length was made from the tip of the head to the base of telson (this convention was chosen because of the variable position of the tip of the telson in different specimens). Fifteen adult amphipods (ten males and five females) were preserved in ethanol 70%, colored with Rose Bengal, dissected and the appendages were mounted on semipermanent slides, which were used to illustrate and describe the new species.

The morphological description of new species was made based on characteristic Brazilian species of *Hyaella*, such as shape, number and arrangement of the setae of buccal appendages, antennae, gnathopods, pereopods, uropods and telson, according to González & Watling (2003a b), González et al. (2006), Rodrigues et al. (2012), Bastos-Pereira & Bueno (2013), Bueno et al. (2013), Rodrigues et al. (2014), Streck et al. (2017), and Streck-Marx & Castiglioni (2020). Watling (1989, 1993), Zimmer et al. (2009) for used to terminology of setae and classification of the mandibles, respectively.

Representative specimens of *Hyaella* n. sp. were destined to analysis of the sequences of COI (8 specimens) and the 16S (5 specimens) genes. For comparison purposes, specimens of *H. palmeirensis* Streck-Marx & Castiglioni, 2020 (2 for COI and 3 for 16s), *H. gauchensis* Streck & Castiglioni, 2017 (19 for COI and 23 for 16s), *H. bonariensis* Bond-Buckup, Araujo & Santos, 2008 (3 for COI and 3 for 16s) and *H. georginae* Streck & Castiglioni, 2017 (2 for COI and 1 for 16s) were also analyzed (Supplementary Table 1). The total DNA was extracted using the DNA extraction protocol by saline precipitation, described by Bruschi et al. (2012) and the mitochondrial markers were amplified by PCR using the 16Samphi-f and 16Samphi-r primers according to Colgan et al. (1998) originating a fragment with approximately 650 base pairs of the 16S gene and with the HCO and LCO primers, according to Folmer (1994), originating a fragment with approximately 740 base pairs of the COI gene.

The electropherogram assemblies and the necessary editions were performed using the Staden package (Staden, 1996), and the identity was confirmed by BLASTn. The sequence alignments and phylogenetic comparisons were performed on MEGAX program (Kumar et al. 2018) by Maximum Likelihood analysis. As external groups was used the species *H. azteca* Saussure, 1858 (Supplementary Table 1).

Type material and paratypes is deposited on Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) and Coleção do Laboratório de Zoologia e Ecologia (CLZE), Campus de Palmeira das Missões, Universidade Federal de Santa Maria, municipality of Palmeira das Missões, state of Rio Grande do Sul, Brazil respectively.

Results

Taxonomy

Order Amphipoda Latreille, 1816

Suborder Senticaudata Lowry & Myers, 2013

Family Hyalellidae Bulycheva, 1957

Genus *Hyalella* Smith, 1874

Hyalella n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni

Type material: *Holotype* male, head length 0.62 mm, total body length 5.23 mm, Brazil, state of Rio Grande do Sul, municipality of Palmeira das Missões, locality of Capão Alto, Distrito de Santa Rosa (27°51'38.1"S-53°15'12.0W), MNRJ 028999, December, 04 2014, Castiglioni, D.S & Streck-Marx, M.T. colls. *Allotype* female, head length 0.50 mm, total body length = 4.19 mm, Brazil, state of Rio Grande do Sul, municipality of Palmeira das Missões, locality of Capão alto, Distrito de Santa Rosa (27°51'38.1"S-53°15'12.0W), MNRJ 029000, December, 04 2014, Castiglioni, D.S. & Streck-Marx, M.T. colls.

Paratypes: MNRJ 029001 (10 males and 10 females), with the same place and data as holotype. Measurements from paratypes: males - mean total body length 4.60 mm,

mean head length 0.54 mm (n= 10); females - mean total body length 3.91, mean head length 0.46 mm (n= 10).

Type locality: Brazil, state of Rio Grande do Sul, municipality of Palmeira das Missões, Distrito de Santa Rosa, locality of Capão Alto (27°51'38.1"S-53°15'12.0W), spring, (Várzea river basin), 526 m (Fig. 1).

Diagnosis: Body surface smooth, epimeral plates not acuminate. Eyes pigmented. Antenna 1 shorter than antenna 2. Antenna 2 more than half body length. Mandible incisor toothed. Maxilla 1 palp minute, reaching less than half length the distance between base of palp and tip of setae on outer plate; inner plate slender, with two papposerrate apical setae. Maxilla 2, inner margin of inner plate with two papposerrate setae, being one them stronger and longer. Gnathopod 1 propodus hammer shape, inner face with seven serrate setae, denticles as comb scales on distoposterior margin, posterior lobe of carpus with border pectinate. Gnathopod 2 propodus, elongated, irregular palm and with a triangular space between propodus and dactylus when this is closed, distoposterior margin of denticles as comb-scales, posterior lobe of carpus with border pectinate. Uropod 1 inner ramus of male without curved setae apically. Uropod 3 peduncle with seven strong distal setae with accessory setae, ramus with ten cuspidate setae with accessory setae. Telson longer than wider, apically rounded, with two simple setae and two small cuspidate setae with accessory setae on distal margin. Sternal gills on segments 2 to 7.

Description of male: Mean body length= 4.45 mm, mean head length= 0.53 mm (n=10) (Fig. 2). Body surface smooth. Epimeral plate not acuminate (Fig. 3A). Head smaller than first two thoracic segments, typically gammaridean, rostrum absent Eyes pigmented, medium, ovoid, located between insertion of antenna 1 and 2 (Fig. 3A).

Antenna 1 less than half of body length, shorter than antenna 2, longer than peduncle of antenna 2; peduncle longer than head; flagellum of 11 to 12 articles, longer than peduncle, basal article not elongated; aesthetascs on flagellum, found on articles 5 (2), 6 (2), 7 (2), 8 (2) and 9 (2) distally (Fig. 3B).

Antenna 2 more than half body length; peduncle longer than head; flagellum of 19 to 20 articles (Fig. 3C).

Upper lip margin rounded, distal margin covered by several short setules on ventral and dorsal faces (Fig. 3D).

Mandible; without palp; incisor toothed; left *lacinia mobilis* with five teeth; setae row on left mandible with three pappose setae, right mandible with two pappose setae; molar large, cylindrical, and triturative, accessory seta present (Fig. 3E).

Lower lip lobes rounded without notches or excavations, with several small setules on dorsal and ventral faces (Fig. 3F).

Maxilla 1 palp uniarticulate, short, reaching less than half length the distance between base of palp and tip of setae on outer plate, inner plate slender, smaller than outer plate, with two papposerrate apical setae and several simple setae on the margin; outer plate with nine serrate setae (Fig. 3G).

Maxilla 2 inner plate subequal in length to outer plate, inner plate more slender than outer plate and with two papposerrate setae, being one them stronger and longer, some serrulate and several simple apical setae; outer plate with abundant long simple apical seta; outer and inner plates with several setules distal (Fig. 3H).

Maxilliped inner plates apically truncated, with three strong cuspidate distal setae, several pappose and simple setae apically and medially; outer plates larger than inner plates, apically truncated, apical, medial and facial simple setae; palp longer than outer plate, with four articles with several simple setae on margin; dactylus unguiform, smaller than third article, with simple setae and without comb-scales and distal nail (Fig. 3I).

Gnathopod 1 subchelate; coxal plate longer than wide with short simple setae on the anteromarginally; basis, ischium and merus with simple setae and without comb scales posteromarginally; carpus longer than wide, longer and wider than propodus, with strong and wide posterior lobe with margin with polygonal pattern (border pectinate), two rows of denticles as comb-scales and a row of serrate setae, four serrate setae on ventral face; propodus length about two times maximum width (rectangular), hammer shape, inner face with seven serrate setae, distoposterior border with two cuspidate setae and denticles as comb-scales and three simple setae, anteroposterior border without comb-scales but with several simple setae; dactylus claw-like not surpassing the palm, with denticles as comb scales, with one plumose setae, and some simple setae on inner margin (Fig. 4A).

Gnathopod 2 subchelate; coxal plate longer than wide and with short simple setae on the margin; basis (long), ischium and merus with simple setae and without comb-scales posteromarginally; carpus wider than longer, narrow posterior lobe and with margin elongated with border pectinate with one row of serrate setae and two rows of denticles as comb scales; propodus elongated (length 1.65 maximum width), palm shorter than

posterior margin, slope oblique, palm with irregular margin, with several long and short cuspidate setae with accessory setae and some simple setae, posterior margin with denticles as comb scales and two short and strong cuspidate setae with accessory setae and some simple setae; dactylus claw-like, shorter than propodus, with a few endal setae and one plumose setae dorsally; triangular space between propodus and dactylus when this is closed (Fig. 4B and 4C).

Peraeopods 3 to 7 simple with merus, carpus and propodus posterior margins with clusters of 2-3 cuspidate setae with accessory setae; peraeopods 3 to 7 dactylus less than half-length of propodus; peraeopods 3 to 6 with similar size and pereopod 7 slightly longer than other (Fig. 5A P3; Fig. 5B P4; Fig. 5C P5, Fig. 5D P6; Fig. 5E P7). Pleopods not modified; peduncle slender; longest ramus longer than peduncle, with two coupling setae (Fig. 5F).

Uropod 1 longer than uropod 2; peduncle longer than rami with five cuspidate setae with accessory setae; rami sub-equal; inner ramus slightly longer than outer ramus with three cuspidate setae with accessory setae, six apical cuspidate setae (four with accessory setae), male without curved setae on inner side of the ramus; outer ramus with four dorsal cuspidate seta with accessory seta and four distal cuspidate setae (two with accessory setae) (Fig. 6A).

Uropod 2 outer ramus shortened; inner ramus with three dorsal cuspidate setae with accessory seta and six distal cuspidate setae (four with accessory setae); outer ramus with three dorsal and three distal setae; peduncle with three cuspidate setae with accessory setae (Fig. 6B).

Uropod 3 peduncle rectangular, wider than ramus, with seven strong cuspidate setae with accessory setae distally and one marginal simple seta the other side; inner ramus absent; outer ramus uniaarticulate, same length as peduncle, with seven to ten cuspidate setae (some longer than others) with accessory setae apically (Fig. 6C).

Telson wider than long, entire, apically rounded, with two long simple setae and two small cuspidate setae with accessory setae on distal margin, and three small plumose setae laterally close to each distal seta. (Fig. 6D)

Coxal gills saclike, on segments 2 to 6. Sternal gills tubular, on segments 2 to 7.

Female: Mean body length= 3.92 mm, mean head length= 0.46 mm (n=10). Antenna 1 flagellum with ten to eleven articles. Antenna 2 similar in shape to male, flagellum with fourteen to eighteen articles. Gnathopod 1 greater than gnathopod 2;

similar to male gnathopod 1 in size and shape; dactylus claw-like with one plumose setae and with comb-scales; propodus inner face with five serrate setae, simple setae on the inner margin and comb-scales on distoposterior border and little comb-scales on distoanterior border; carpus with pectinate lobe with comb-scales and several serrate setae and three serrate setae on ventral face; basis, ischium and merus without comb-scales (Fig. 7A). Gnathopod 2 different from male gnathopod 2 in shape and smaller; propodus length two times maximum width, anterodistal and posterodistal margins with comb-scales and seven (eight) and three simple setae, respectively; propodus inner face with two serrate setae; carpus with pectinate lobe with comb-scales and two serrate setae and on ventral face; basis, ischium and merus without comb-scales (Fig. 7B).

Molecular analysis: The specimens of *Hyaella* n. sp. submitted to sequencing analysis presented a single haplotype for both COI and 16S genes. When these haplotypes were compared to sequences of other species, they always presented distances greater than 19% (COI) and 29% (16S). In comparison to the sympatric species *H. gauchensis*, the genetic distance was 21% for COI gene and 31% for 16S gene. The differences between other species from the region varied from 19% with *H. georginae* to 38% with *H. palmeirensis* for COI gene and 29% with *H. bonariensis* to 31% with *H. gauchensis* (supplementary table 2 and supplementary table 3). In phylogenetic comparisons, both using COI and 16S genes, the tree topologies placed *Hyaella* n. sp. in an isolated clade from the other species (Fig. 8) with statistical support above 46 % bootstrap.

Habitat and ecological conservation: Freshwater, epigeal, spring.

Several male (n= 46) and females (n= 38) specimens of *Hyaella* n. sp., including ovigerous females (n= 3) and couples in pre-copulation behaviour (n= 5) were sampled in the locality type (spring), December, 04 2014, in which there is cattle raising. The spring had no riparian forest, but there were macrophytes of the genus *Polygonum* Linnaeus, 1753 and *Lemna* Linnaeus, 1753. Spring water at the time of amphipod sampling had 19.8 °C of temperature, 6.5 of pH, 51.1 µS/cm of conductivity and 7,9 mg/L of dissolved oxygen. It should be noted that the source is located at about 200 m from the residence and the water is collected to be used for human consumption. Beyond the spring, *Hyaella* n. sp. specimens were also sampled in a stream, two dams and in another spring on the same farm. It should be noted that on the rural property in which *Hyaella* n. sp. specimens were sampled, there aren't any soybean plantation areas, but dairy cattle

farming. However, in the surroundings there are several properties that cultivate especially soybeans, wheat and oats.

Remarks: Among the species of *Hyaella* found in South America, especially at the Brasil, *Hyaella* n. sp. has similarities at the gnathopod 2 morphology (irregular palm of the propodus) to *H. pampeana* Cavalieri, 1968, *H. minensis* Bastos-Pereira & Bueno, 2013 and *H. longistila* Faxon, 1876. Besides the propodus of the gnathopod 2 is elongated similar to *H. pampeana* and *H. longistila*, and have a triangular space between propodus and dactylus, character similar to *H. pampeana*. The new species has antenna 2 longer than other species that occurs at the state of Rio Grande do Sul, Brazil, but similar to *H. kaigang* Bueno & Araujo 2013, that has antenna 2 with 18 to 24 articles). Besides, it is the only species of state of Rio Grande do Sul, which does not have curved setae in the uropod 1, characteristics shared with the other species with occurrence in other Brazilian states. The species *Hyaella* n. sp. have a several cuspidate setae in the uropod 3, similar characteristic to *H. imbya* Rodrigues & Bueno, 2012, another species found in state of Rio Grande do Sul and *H. xakriaba* Bueno & Araujo, 2013, specie that occur in state of Minas Gerais.

The state of Rio Grande do Sul is located geographically very close to Argentina, a country where ten species of *Hyaella* are known, of which three species also occur in Brazil (*H. curvispina* Shoemaker, 1942, *H. pampeana* and *H. bonariensis*). Of the species that occurs in Argentina, *Hyaella* n. sp. resembles *H. misionensis* Colla & César, 2015 mainly by the absence of the curved seta on the inner side of the inner ramus of uropod 1 of males, propodus of gnathopod 2 with irregular palm and with a triangular space between the propodus and dactylus, telson shape and number of apical setae, sternal gills present on thoracic segments 2 to 6 and maxilla 2 with two pappose setae. However, *Hyaella* n. sp. differs from *H. misionensis* by size of antenna 2, number of serrate setae on inner face of propodus, number of cuspidate setae on ramus of uropod 1 and 2 and number of cuspidate setae on ramus of uropod 3 (Table 1).

Discussion

In the last decade, taxonomic studies about *Hyalessa* have grown substantially in Brazil, which currently has 28 species (Bueno et al. 2013, Cardoso et al. 2014, Streck et al. 2017, Bastos-Pereira et al. 2018, Streck-Marx & Castiglioni 2020). The species *Hyalessa* n. sp. is the fourth species of the genus described for the Várzea River basin, located in the Northwestern region of the state of Rio Grande do Sul. The description of a new species of *Hyalessa* brings the number of species known for state of Rio Grande do Sul for 13 species with about half of the species occurring in Brazil (29 species – 41.9%), showing that the diversity of the genus *Hyalessa* is underestimated. In the last 15 years, the richest country in species of *Hyalessa* increased from 8 to 29 known species, probably due to significant increase in the number of taxonomic researches realized in the Brazil (González & Watling, 2003a, González et al., 2006, Bueno et al., 2014, Cardoso et al. 2011, Rodrigues et al. 2012, Bastos-Pereira & Bueno 2012, 2013, Rodrigues et al. 2014, Cardoso et al. 2014, Streck et al. 2017, Rodrigues et al. 2017, Bastos-Pereira et al. 2018, Streck-Marx & Castiglioni 2020).

The species described here have clear differences with the other species of *Hyalessa* nearby areas in Brazil (state of Rio Grande do Sul) and Argentina, especially in the morphology and number of setae of the gnathopods, uropods and telson (Table 1). A remarkable feature of *Hyalessa* males that occurs in Brazil is the presence of curved setae in uropod 1, characteristic that is absent in *Hyalessa* n. sp. and shared with other species - occurring in other states of Brazil and at Argentina (country neighboring the state of Rio Grande do Sul) (Table 1). In addition to this, most of the *Hyalessa* species that occur in Brazil have only one cuspidate seta on the uropod 3 ramus, while *Hyalessa* n. sp. has 7 to 10, a characteristic similar to *H. xakriaba* (5 to 6 cuspidated setae).

Considering that *Hyalessa* n. sp. live sympatrically with *H. gauchensis*, we were expecting some differences in the morphology of the buccal appendages (reflecting some trophic niche differences). However, these appendages are very similar, but these species differ in the morphology (size and shape) of gnathopod 2, presence of curved seta in *H. gauchensis* and absence in *Hyalessa* n. sp., antenna length (longest in *Hyalessa* n. sp.) - and number of cuspidate setae on uropod 1, 2, and 3 (Streck et al. 2017). González et al. (2006) described two new sympatric species of *Hyalessa* (*H. pleocuta* and *H. castroi*) occurring in Campos de Cima da Serra, region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil;

no morphological difference of the buccal appendages was found, which could be the result of differences in trophic niches, allowing, thus, their coexistence. However, Castiglioni & Bond-Bukup (2008) observed differences in population and reproductive dynamics of these species, which may contribute to the sympathy occurrence of the two species.

Jones *et al.* (1992) demonstrated that in cave populations of *Gammarus minus* Say, 1818, the elongation of antennas could provide increased sensory ability when compared to epigeal populations. Where in male amphipod individuals, the antennas would be able to detect pheromones through specialized structures (aesthetascs), facilitating the detection of females for reproduction. In addition, elongated appendages that provide greater extension away from the body can improve the perception of water movements, chemical signals, and a more precise location of the source of stimuli (Trontelj *et al.* 2012), which could be advantageous for individuals living in small populations or that are susceptible to predation, providing a greater perception in relation to the environment.

Hyaella n. sp. has antenna 2 and its length is more than half of the total body size, featuring 19-20 articles, unusual feature in Brazilian species, which generally have smaller antennas and fewer articles (Table 1). The size of antenna 2 and the number of articles of *Hyaella* n. sp. resembles *H. kaingang* (18-24), *H. montenegrinae* Bond-Bukup & Araujo, 1998 (14-19), *H. castroi* (14-18), *H. neonoma* Stock & Platvoet, 1991 (25) e *H. pampeana* (up to 18), but it differs from these in several ways, mainly because of the presence/absence of the curved setae on the inner ramus of uropod 1, except for *H. neonoma*, which also shows absence of the curved setae, but differs in number of sawed setae in this same appendix, in addition to having an evidently higher number of articles on antenna 2 (Table 1).

Other evidences that support that *Hyaella* n. sp. is a distinct species, are the divergence of nucleotide sequences from the species found in the same region, where *Hyaella* n. sp. always showed divergence higher than 19% for COI gene and 29% for 16S gene. High nucleotide differences between *Hyaella* species in the state of Rio Grande do Sul were previously observed by Streck *et al.* (2017), where the analyzed species diverged by at least 12.6% between *H. gauchensis* and *H. georginae*. However, in this study we observed even more significant differences, being *H. georginae* the

closest, showing 19% divergence for COI gene and 30% for 16S gene, which places *Hyalella* n. sp. in an isolated clade of the other species found in the region.

Another important fact to note is that recently (April 2018) field trips have been made on the rural property where *Hyalella* n. sp. and *H. gauchensis* were initially sampled, but this time both species were found only in a spring within the property (place from which types, paratypes and allotypes were sampled). Although inside the property there is no direct planting, which according to Rolon & Maltchik (2010), can cause fragmentation and deterioration of natural ecosystems, most of the properties around them grow soybeans, wheat and oats (personal observation). In addition, there's risk of water contamination by pesticides, which could directly affect the *Hyalella* populations present at the site, because these amphipods are highly sensitive to contaminants (Duan et al. 1997). Besides, there were changes in the physical structures of the property (personal observation), which directly impacted the freshwater ecosystems found there. Therefore, it's relevant to point the importance of public conservation measures for the rural community, raising awareness about the relevance of freshwater environments to biodiversity and the possible impacts of anthropic actions.

Future studies on the population and reproductive dynamics of *Hyalella* n. sp. and *H. gauchensis* may contribute to the knowledge of the strategies developed by the species to live in sympathy.

Table I. Main morphological differences between *Hyalella* n. sp. from nearby areas in Brazil (state of Rio Grande do Sul) and Argentina.

Species	Inner margin of maxila 2	Curved setae in inner ramus of uropod 1	Antenna 1	Antenna 2	Sternal gills	Inner face of propodus of gnathopod 1	Denticles on distal margin carpus pf gnathopod 2	Setae on peduncle of uropod 3	Telson
<i>Hyalella curvispina</i>	Two plumose setae	Present	11	13	3–7	5–7 serrate setae	Polygonal patterns with two rows	3	Wider than long, with 3 simple spines.
<i>Hyalella pampeana</i>	Two bipectinada setae	Present	11–12	Up to 18	2–7	5–6 serrate setae		5 to 7	As wide as long, apically rounded, with 2–5 spines.
<i>Hyalella falklandensis</i>		Present	10	12	2–6	5 serrate setae			Wider than long, broadly rounded apex with 4–5 short fine spines.
<i>Hyalella bonariensis</i>	Two pappose setae	Present	9–12	12–15	2–7	5 serrate setae	Pectinate border and a row of several serrate setae	6	Quadrangular, with 2–3 cuspidate setae apically.
<i>Hyalella kochi</i>	One strong pappose seta	Present	9	11	3–7	7 serrate setae		4	As wide as long, apically truncated, with two long simple setae.
<i>Hyalella fossamancinii</i>	One strong pappose seta	Absent	9–10	9–14	3–7	More than 10 serrate setae		4	Wider than long, with more than two small or minute setae.
<i>Hyalella neonoma</i>		Absent	12	25	3–7	8–10 serrate setae			Wider than long, with 3–4 very

									small slender spines.
<i>Hyalella araucana</i>	Two apposed strong pappose setae	Absent	9	12	3–7	10–11 serrate setae		4	As wide as long, with more than two small or minute setae.
<i>Hyalella misionensis</i>	Two strong pappose setae	Absent	10–11	13–14	2–7	6–9 serrate setae	Lobe with cuticular denticles and with several serrate setae	5	As long as wide, with two long simple setae on distal margin.
<i>Hyalella rionegrina</i> (female)		?	4	5	2–7	?			Semieliptic, with 4 simple spines.
<i>Hyalella georginae</i>	Two robust papposerrate setae	Present	15	16	2–7	9 serrate setae	Lobe with pectinate border and one row of serrate setae, without polygonal pattern or comb-scales	9	Apically rounded, as wide as long, with seven apical cuspidate setae with an accessory seta distributed in two clusters (two setae and other side five four setae)
<i>Hyalella gauchensis</i>	One papposerrate setae	Present	11	15	2–7	5 long serrate setae and 9–10 short serrate setae	Lobe with pectinate border, one row of serrate setae and one row of denticles in comb-scales	6	Apically rounded, as wide as long, with six cuspidate setae apically distributed in three clusters of two setae each
<i>Hyalella palmeirensis</i>	One strong papposerrate setae	Present	11–12	10–12	3–7	5 serrate setae		3	As long as wide, with two long simple setae

<i>Hyalella pleoacuta</i>	Two strong pappose setae	Present	14	15	2-7	9 pappose setae	Lobe with border pectinate with several plumose setae	4	As wide as long with 2 strong setae
<i>Hyalella pseudoazteca</i>	One strong pappose setae	Absent	10	8-9	3-7	1 to 3 pappose setae	Lobe with border pectinate with several pappose setae	2	As wide as long with 2 long simple setae
<i>Hyalella castroi</i>	One strong pappose seta	Present	10-17	14-18	2-7	More than 10 pappose setae	Lobe with border pectinate with several plumose setae	7	Wider than long with 8 long and short simple setae
<i>Hyalella montenegrinae</i>	One strong pappose setae	Present	14-16	14-19	3-7		Lobe with border pectinate with plumose setae	4-5	Wider than long with 7 to 9 cuspidate setae with accessory setae
<i>Hyalella kaingang</i>	Two papposerrate setae	Present	17-18	18-24	2-7	Two rows of serrate setae	Lobe with indenticles in polygonal pattern with 2 rows and several serrate setae	6	Wider than long with 6 or 7 cuspidate setae with accessory setae
<i>Hyalella imbya</i>	Two long papposerrate setae	Present	18-23	14-16	3-7	7 serrate setae	Border pectinate with several short serrate setae	1	1.2 times wider than long with 2 long simple apical setae
<i>Hyalella n. sp.</i>	Two papposerrate setae, being one them	Absent	11-12	19-20	2-7	7 serrate setae	border pectinate with one row of serrate setae and two rows of	7	apically rounded, with two long simple setae and two short cuspidate setae

	stronger and longer						denticles as comb scales		with accessory setae on distal margin
--	---------------------	--	--	--	--	--	--------------------------	--	---------------------------------------

Acknowledgments

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by financial support (PROACAD 55259720112). We also thank to Carolina Rangel and Adriano Alves de Paula for helping with the field and laboratory works.

References

- BALDINGER, A.J. 2004. A new species of *Hyaella* (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Ash Springs, Lincoln County, USA, with a key to the species of the genus in North America and the Caribbean region. *J. Nat. Hist.* 38:1087-1096.
- BASTOS-PEREIRA, R. & BUENO, A.A.P. 2012. New species and new report of *Hyaella* S. I. Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Dogielinotidae) from Minas Gerais state, Southeastern Brazil. *Zootaxa.* 3350: 58-68.
- BASTOS-PEREIRA, R., OLIVEIRA, M.P.A. & FERREIRA, R.L. 2018. Anophthalmic and epigeal? Description of an intriguing new species of *Hyaella* (Amphipoda, Hyaellidae) from Brazil. *Zootaxa.* 4407(2):254-266.
- BASTOS-PEREIRA, R. & BUENO, A.A.P. 2013. A new species of freshwater amphipod (Dogielinotidae, *Hyaella*) from Southeastern Brazil. *Nauplius.* 21: 79-87.
- BRUSCHI, D.P., BUSIN, C.S., SIQUEIRA, S. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2012. Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). *Hereditas.* 149:34-40.
- BUENO, A.A.P., ARAUJO, P.B., CARDOSO, G.M., GOMES, K.M. & BOND-BUCKUP, G. 2013. Two new species of *Hyaella* (Amphipoda, Dogielinotidae) from Brazil. *Crustaceana.* 86(7-8):802-819.
- BUENO, A.A.P., OLIVEIRA, K.M. & WELLBORN, G. 2019. A new species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Oklahoma, USA. *Zootaxa.* 4700(2):259-269.
- BUENO, A.A.P., RODRIGUES, S.G. & ARAUJO, P.B. 2014. O estado da arte do gênero *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Senticaudata, Hyaellidae) no Brasil. In: Carmine Hayashi. (Org.). *Tópicos de Atualização em Ciências Aquáticas.* 1ed. Uberaba: UFTM. 1:57-88.
- CARDOSO, G.M., A.A.P. BUENO & FERREIRA, R.L. 2011. A new troglobiotic species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from Southeastern Brazil. *Nauplius.* 19(1):17-26.
- CARDOSO, G.M., A.A.P. BUENO & FERREIRA, R.L. 2014. Two new subterranean species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Brazil. *Zootaxa.* 3814:253-348.

- CASSET, M.A., MOMO, F.R. & GIORGI, A.D.N. 2001. Dinámica poblacional de dos especies de anfípodos y su relación con la vegetación acuática en un microambiente de la cuenca del río Luján (Argentina). *Asociación Argentina de Ecología. Ecol. Austral.* 11:79-85.
- CASTIGLIONI, D. S. & BOND-BUCKUP, G. 2008. Ecological traits of two sympatric species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from southern Brazil. *Acta Oecol.* 33(1):36-48.
- COLGAN, D.J., MCLAUCHLAN, A., WILSON, G.D.F., LIVINGSTON, S.P., EDGECOMBE, G.D., MACARANAS, J., CASSIS, G. & GRAY, M. R. 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool. Victoria.* 46(1):419-437.
- COLLA, M.F. & CESAR, I.I. 2015. A new species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from the the Atlantic Forest of Misiones, Argentina. *Zookeys.* 481(1):25-38.
- DRUMM, D. T. & KNIGHT-GRAY, J. 2019. A new species of the *Hyaella* 'azteca' complex (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Florida, *Zootaxa.* 4545 (1) 93-104.
- DUAN, Y., GUTTMA, S.I. & ORIS, J.T. 1997. Genetic differentiation among laboratory populations of *Hyaella azteca*: implications for toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:691-695.
- FIŠER, C., ZAGMAJSTER, M. & FERREIRA, R.L. 2013 Two new amphipod families recorded in South America shed light on an old biogeographical enigma. *Biodivers.* 1-23.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3:294-299.
- GONZÁLEZ, E.R. & WATLING, L. 2003a. A new species of *Hyaella* from Brazil (Crustacea: Amphipoda), and redescriptions of three other species in the genus. *J. Nat. Hist.* 37(17):2045-2076.
- GONZÁLEZ, E.R., BOND-BUCKUP, G. & ARAUJO, P.B. 2006. Two new species of *Hyaella* from southern Brazil (Amphipoda: Hyaellidae) with a taxonomic key. *J. Crustacean Biol.* 26(3):355-365.
- GONZÁLEZ, E.R., & WATLING, L. 2003b. A new species of *Hyaella* from Colombia, and the redescription of *H. meinerti* Stebbing, 1899 from Venezuela (Crustacea: Amphipoda). *J. Nat. Hist.* 37(17):2095-2111.
- GROSSO, L.E. & PERALTA, M. 1999. Anfípodos de água Dulce sudamericanos. Revisión Del gênero *Hyaella* Smith. I. *Acta Zool. Lilloana,* 45:79-98.
- JONES R.D., CULVER D.C. & KANE T.C. 1992. Are parallel morphologies of cave organisms the result of similar selection pressures? *Evolution,* 46:353-365.

- KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., & TAMURA K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35:1547-1549.
- PERALTA, M. A. & MIRANDA, A.V.I., 2019. A new species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) from the Puna biogeographic province in Argentina, *ZooKeys* 865: 87-102.
- POI DE NEIFF, A. 1992. Invertebrados asociados a los macrófitos sumergidos de los esteros del Iberá (Corrientes, Argentina). *Amb. Subtropical.* 2:45-63.
- RODRIGUES, S.G., SENNA, A.R., QUADRA, A. & BUENO, A.A.P. 2017. A new species of *Hyaella* (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Itatiaia National Park, Brazil: an epigeal freshwater amphipod with troglomorphic traits at 2,000 meters of altitude. *Zootaxa*, 4344(1): 147-159.
- RODRIGUES, S.G., BUENO, A.A.P. & FERREIRA, R.L. 2014. A new troglomorphic species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, hyaellidae) with a taxonomic key for the Brazilian species. *Zootaxa*, 3815(2):200-214.
- RODRIGUES, S.G., BUENO, A.A.P. & FERREIRA, R.L. 2012. The first hypohelminth Crustacea (Amphipoda, Dogilinotidae, *Hyaella*) from South America. *Zookeys*, 236:65-80.
- ROLON, AS. & MALTCHIK, L. 2010. Does flooding of rice fields after cultivation contribute to wetland plant conservation in southern Brazil? *Appl. Veg. Sci.* 13(1):26-35.
- STADEN, R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol*, 5:233-241.
- STRECK, M.T., CARDOSO, G.M., RODRIGUES, S.G., GRAICHEN, D.A.S. & CASTIGLIONI, D.S. 2017. Two new species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) from state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Zootaxa*, 4337(2):263-278.
- STRECK-MARX, M.T. & CASTIGLIONI, D.S. 2020. A new species of freshwater amphipod (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) from state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Biota Neotrop.* 20(1):e20190802.
- TRONTELJ, P., BLEJEC, A. & FIŠER, C. 2012. Ecomorphological convergence of cave communities. *Evolution.* 66:3852-3865.
- WATLING, L. 1993. Functional morphology of the amphipod. *J. Nat. Hist.* 27: 37-849.
- WATLING, L. 1989. A classification system for crustacean setae based on the homology concept, p. 15-27. In: B.E. FELGENHAUER; L. WATLING & A.B. THISTLE (Eds). *Functional morphology of feeding and grooming in Crustacea*. Rotterdam, A.A. Balkema, *Crustacean Iss.* 6, X+225p.
- WITT, J.D.S., THRELOFF, D.L. & HEBERT, P.D.N. 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Mol. Ecol.* 15(10): 3073-3082.

WORMS Editorial Board. 2019. World Register of Marine Species. <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=158103> (last access in 18/12/2019).

ZIMMER, A., ARAUJO, P.B. & BOND-BUCKUP, G. 2009. Diversity and arrangement of the cuticular structures of *Hyalella* (Crustacea: Amphipoda: Dogielinotidae) and their use in taxonomy. *Zoologia*. 26(1):127-142.

Figures and Legends



Figure 1. Type-locality of *Hyalella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni (spring) in Palmeira das Missões municipality, state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil.



Figure 2. Male of *Hyalella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Scale -0.60mm

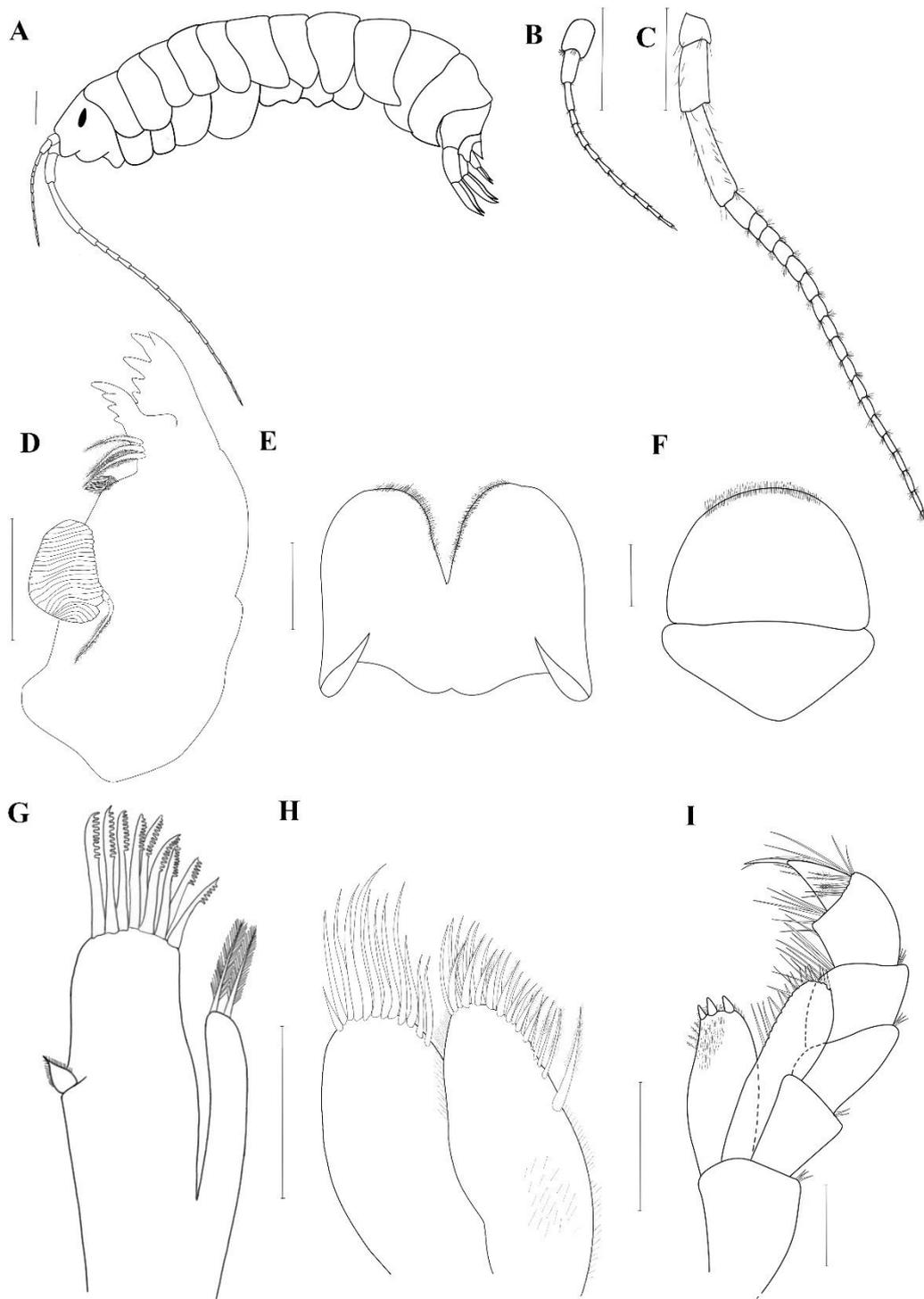


Figure 3. *Hyalella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Male. (A) habitus from holotype; (B) antenna 1; (C) antenna 2; (D) mandible; (E) upper-lip; (F) Lower-lip; (G) maxilla 1; (H) maxilla 2; (I) maxiliped. Scales: 2A - 0.65 mm; 2B and 2C – 0.05 mm; 2D to 2I – 0.02 mm.

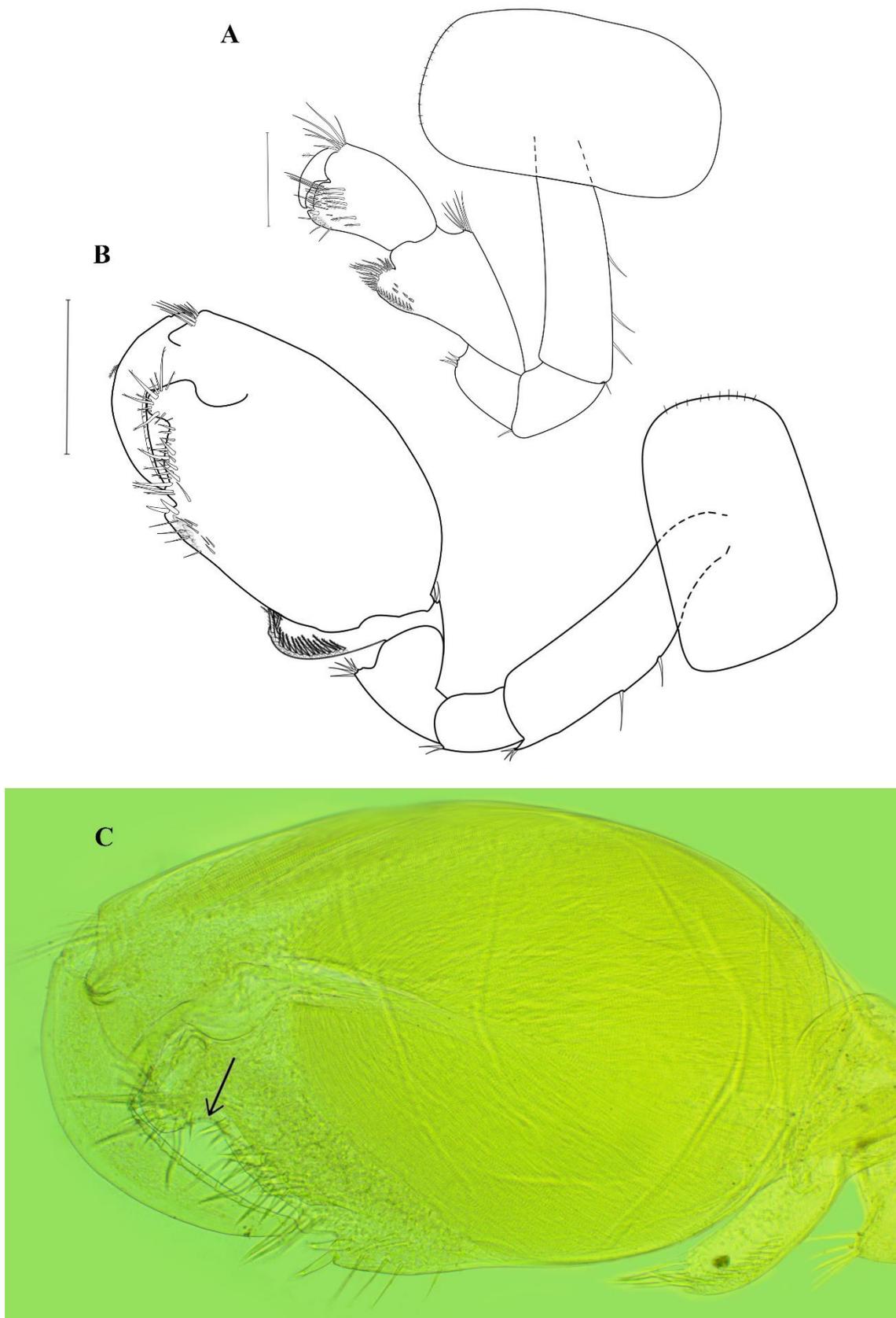


Figure 4. *Hyalella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Male. (A) gnathopod 1; (B) gnathopod 2. (C) propodus of the gnathopod 2 of male. Arrow indicates triangular space between propodus and dactylus. Scales: 3A – 0.02 mm; 3B – 0.05 mm.

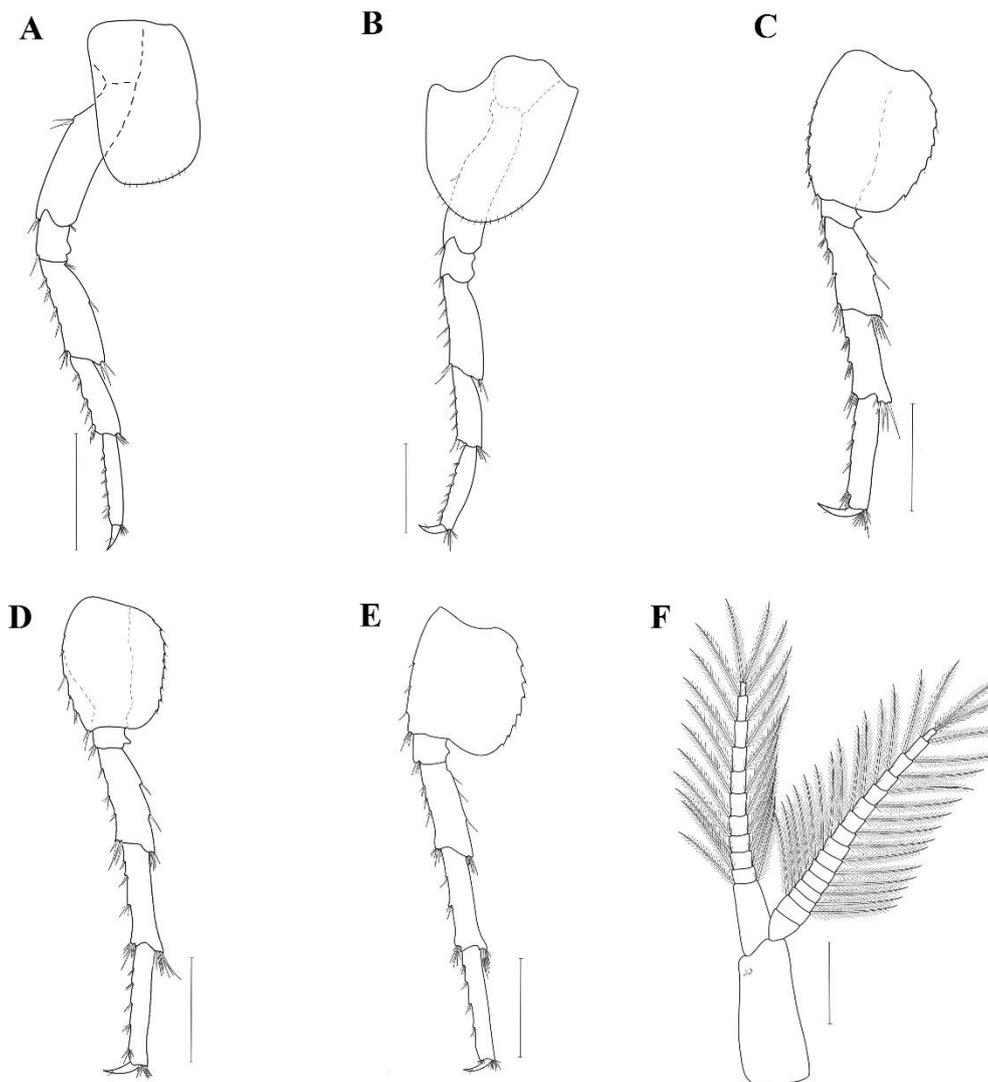


Figure 5. *Hyalella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Male. (A) peraeopod 3; (B) peraeopod 4; (C) peraeopod 5; (D) peraeopod 6; (E) peraeopod 7; (F) pleopod. Scales 4A to 4E – 0.05 mm; 4F – 0.02 mm.

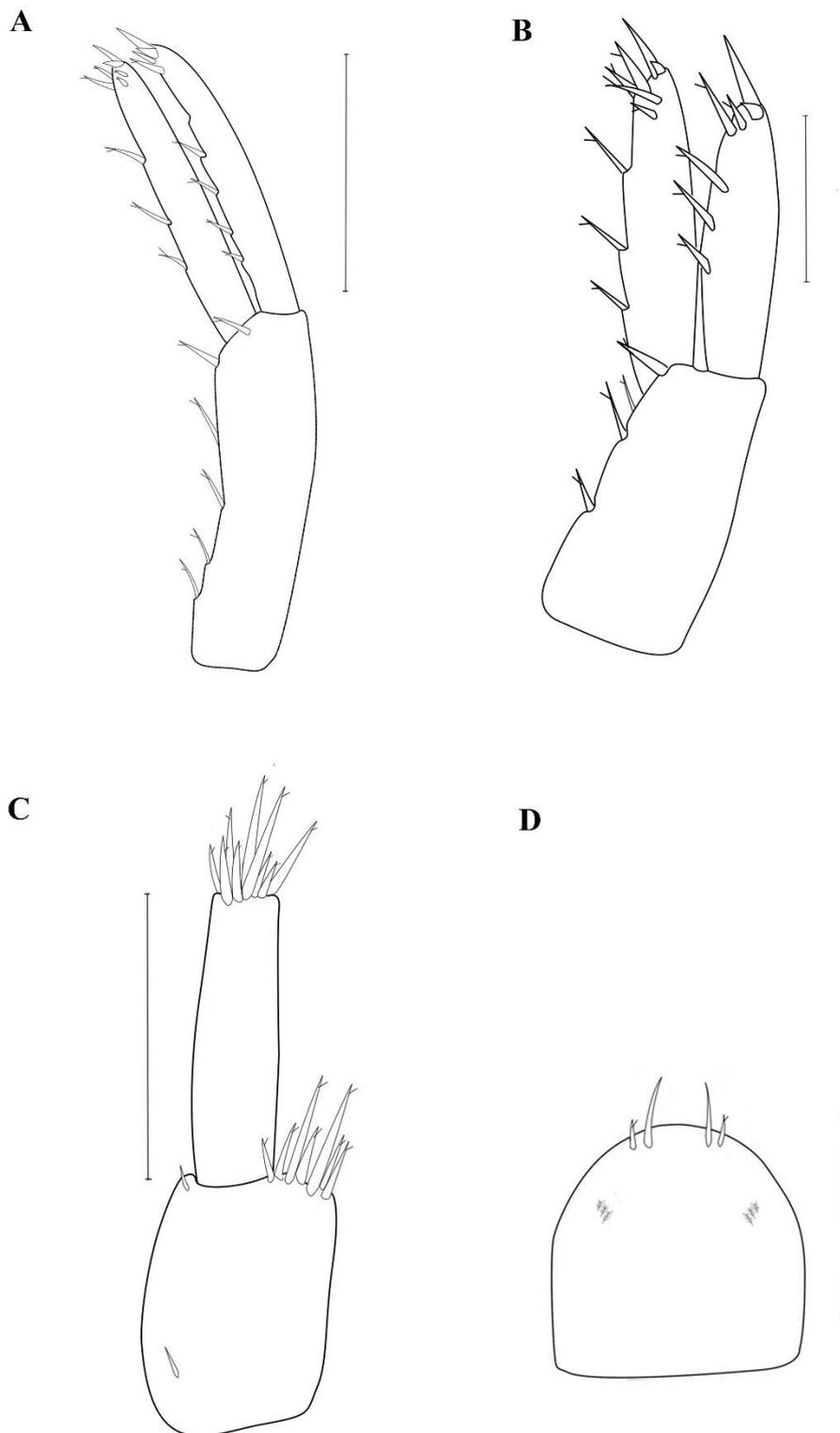


Figure 6. *Hyalella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Male. (A) uropod 1; (B) uropod 2; (C) uropod 3; (D) telson. Scales: 5A – 0.05 mm; 5B to 5D – 0.02 mm.

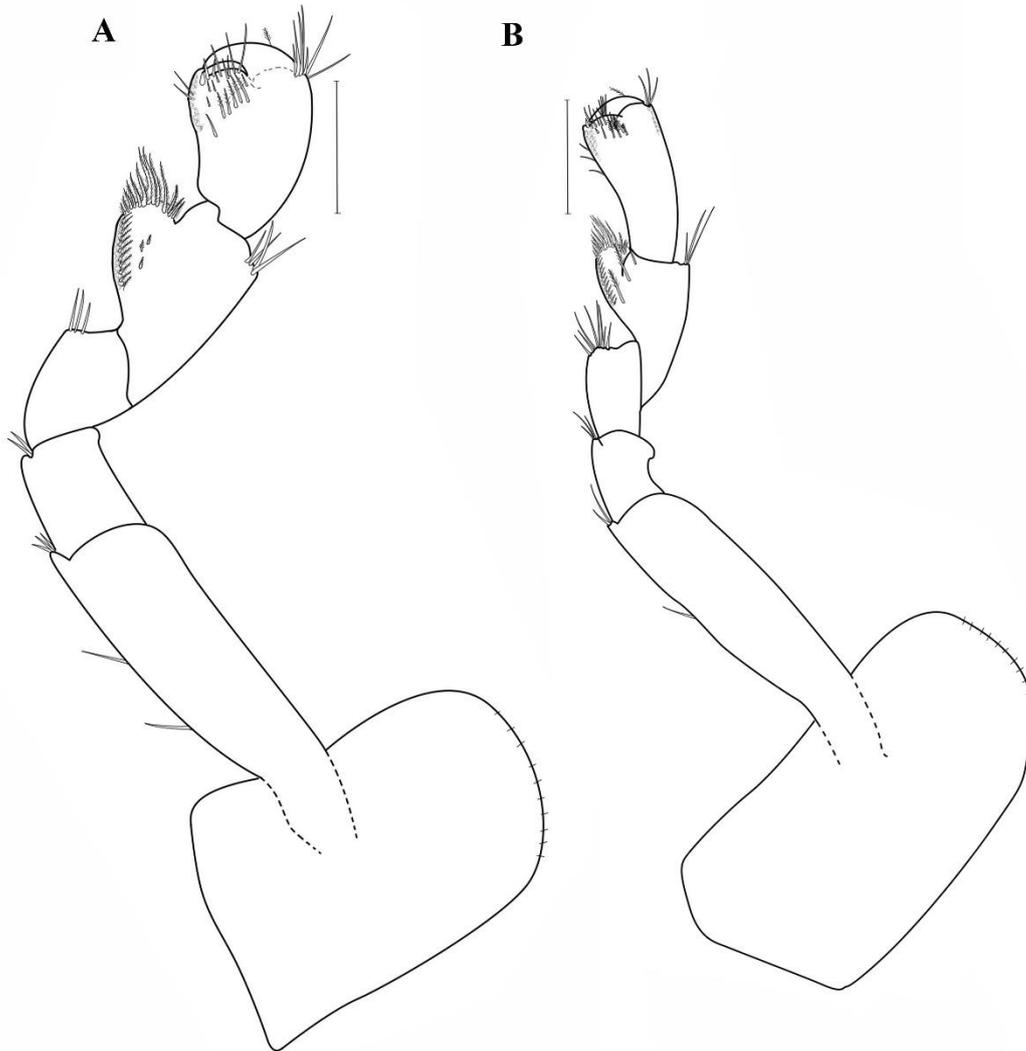
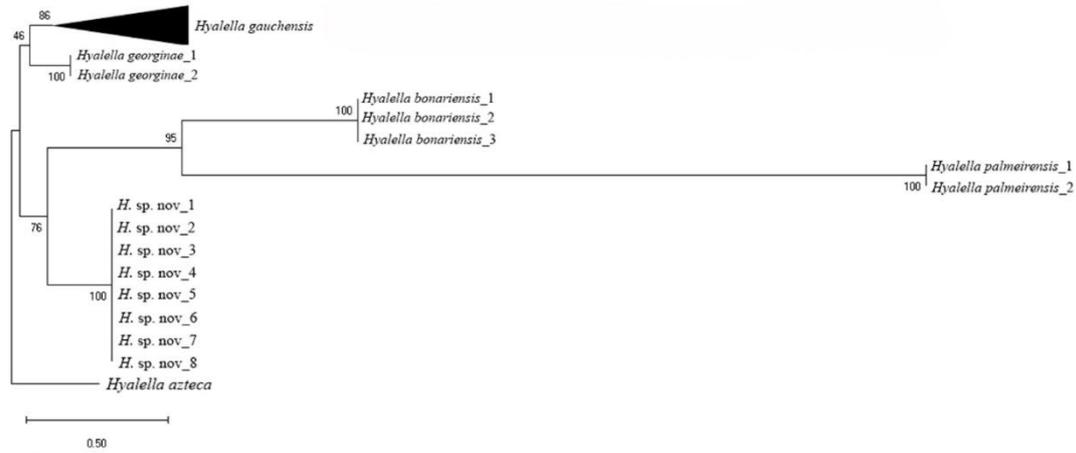


Figure 7. *Hyalella* n. sp. Limberger, Graichen & Castiglioni. Female. (A) gnathopod 1; (B) gnathopod 2. Scales: 6A and 6B – 0.02 mm.

A



B



Figure 8. Phylogenetic tree of *Hyalella* species used in this study. A) Maximum likelihood phylogenetic tree using sequences of COI gene (T92+G+I) and the *H. azteca* species as an external group. B) Maximum likelihood phylogenetic tree using sequences of the 16S gene (T92+G+I) and the *H. azteca* species as an external group.

5. CAPÍTULO 2

Capítulo formatado de acordo com as normas da revista Acta Oecologica

BIOLOGIA POPULACIONAL E REPRODUTIVA DE DUAS ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *HYALELLA* (CRUSTACEA, AMPHIPODA, HYALELLIDAE), DA REGIÃO SUL DO BRASIL

**LIMBERGER^{1,2}, M.; RANGEL², C.; GRAICHEN^{1,3}, D.A.S. & CASTIGLIONI²,
D.S.**

¹*Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

²*Laboratório de Zoologia e Ecologia, Campus de Palmeira das Missões, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Independência, 3751, 983000-000, Palmeira das Missões, RS, Brazil.*

³*Laboratório de Genética Evolutiva (GENEVO), Campus de Palmeira das Missões, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Independência, 3751, 983000-000, Palmeira das Missões, RS, Brazil.*

RESUMO

Neste trabalho foram analisadas a biologia populacional e aspectos reprodutivos de duas espécies simpátricas em uma nascente encontrada na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As coletas foram realizadas por uma pessoa durante 10 minutos com puçá no período doze meses (março de 2018 a abril de 2019) e transportadas ao laboratório. Todos os indivíduos amostrados foram sexados, mensurados e separados por classes de tamanho de comprimento do cefalotórax (CC) durante todos os meses. Com exceção das fêmeas de *Hyaella gauchensis* que apresentaram distribuição polimodal ambas as espécies apresentaram distribuição predominantemente bimodal, com juvenis, machos, fêmeas, fêmeas ovígeras e casais em pré-cópula encontrados durante todas as estações do ano. *Hyaella gauchensis* demonstrou maior abundância e comprimento do

cefalotórax médio significativamente superior quando comparada com *Hyaletta* sp. nov. Machos apresentaram maior tamanho corpóreo (CC) que as fêmeas, embora ocorram em menor número em ambas as espécies. Tanto *H. gauchensis* quanto *Hyaletta* sp. nov. tiveram seu pico de recrutamento e período reprodutivo durante as estações mais frias do ano (inverno e outono, respectivamente), entretanto, houve separação temporal sazonal dos picos de intensidade entre as duas espécies, o que poderia indicar diferentes estratégias e/ou adaptações evolutivas para a coexistência das mesmas.

Palavras- chave: Amphipoda dulcícola, dinâmica populacional, simpatria, ecologia.

ABSTRACT

In this work, the population dynamics and reproductive aspects of two sympatric species in a spring located in the northwestern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil were analyzed. The collections were made by one person for 10 minutes with hand net in a twelve-month period (March 2018 to April 2019) and transported to the laboratory. All individuals sampled were sexed, measured and separated by cephalothorax (CC) length size classes during every month. Except for the females of *Hyaletta gauchensis* which presented polymodal distribution, both species presented predominantly bimodal distribution, with juveniles, males, females, ovigerous females and pre-copulated couples found during all seasons. *Hyaletta gauchensis* showed higher abundance and significantly longer average cephalothorax when compared to *Hyaletta* n. sp. Males had a larger body size (CC) than females, although they occur in smaller numbers in both species. Both *H. gauchensis* and *Hyaletta* n. sp. had their peak recruitment and breeding season during the colder seasons of the year (winter and autumn, respectively), However, there was seasonal temporal separation of the intensity peaks between the two species, which could indicate different strategies and/or evolutionary adaptations for their coexistence.

Keywords: Freshwater amphipoda, population dynamics, sympathy, ecology.

INTRODUÇÃO

Os ambientes dulcícolas podem ser considerados os ecossistemas mais ameaçados do mundo, com cenário mais crítico em habitats de tamanho reduzido, como lagos e nascentes, bem como para as espécies endêmicas que ocorrem nesses ambientes. Assim,

se acredita que a perda da biodiversidade na água doce exceda muito a dos ambientes marinhos e terrestres (Nel et al., 2009).

Dentre a fauna bentônica dos ambientes dulcícolas, podemos destacar as espécies do gênero *Hyaella* Smith, 1874 como importantes membros, facilitando o fluxo de energia no ambiente aquático e desempenhando assim um papel significativo na cadeia trófica (Wen, 1992; Väinölä et al., 2008). Apresentando uma distribuição restrita às regiões biogeográficas neártica e neotropical (González & Watling, 2002; Pereira, 2004; González et al., 2006), as espécies gênero *Hyaella* são comumente encontradas na América do Norte, ocorrendo também na América Central e América do Sul. Além disso, o gênero *Hyaella* é o único de crustáceos anfípodos encontrado nos ambientes límnicos do Brasil (Bueno et al., 2013).

Por não possuírem um estágio de vida dispersor, as espécies de anfípodos de uma forma geral não possuem uma ampla distribuição geográfica (Barnard & Karaman, 1983). O endemismo parece ser ainda mais evidente em espécies que habitam ambientes dulcícolas, principalmente com relação às que ocorrem em lagos, lagoas e ambientes subterrâneos (Väinölä et al., 2008), como no caso dos crustáceos anfípodos do gênero *Hyaella*.

Como geralmente suas populações ocorrem em altas densidades, apresentando um ciclo curto de vida e grande sensibilidade a contaminantes (Sampaio, 1988; Wang et al., 2004), os crustáceos anfípodos podem ser utilizados como bioindicadores na avaliação dos impactos causados pelas diversas atividades humanas nos ambientes aquáticos (Cooper, 1965; Strong, 1972; Borowsky, 1991; Severo, 1997; Rinderhagen et. al., 2000; Dutra et al., 2009). Tanto seus aspectos reprodutivos, comportamento pré-copulatório, como outras respostas comportamentais dos crustáceos, podem ser indicativos de sensibilidade destes organismos as variações ambientais, fornecendo importantes informações para a avaliação de dados referentes às mais diversas mudanças no ambiente (Rinderhagen et. al., 2000).

Atualmente existem aproximadamente 80 espécies do gênero *Hyaella* descritas para as Américas, sendo que 28 ocorrem no Brasil (Bueno et al., 2013; Bueno et al., 2014; Cardoso et al., 2014; Cardoso et al., 2015; Colla & César, 2015; Streck et al., 2017; Bastos-Pereira et al., 2018; Streck-Marx & Castiglioni, 2020). Os estudos sobre biologia populacional e estratégias reprodutivas do gênero *Hyaella* no Brasil foram realizados em

H. bonariensis Bond-Buckup, Santos & Araujo, 2006 (Castiglioni et al., 2016, 2018) em uma população no município de Silveira Martins, no estado do Rio Grande do Sul. Ainda para o mesmo estado, os aspectos reprodutivos de *H. georginae* Streck & Castiglioni, 2017 e *H. gauchensis* Streck & Castiglioni, 2017 foram analisadas por (Ozga & Castiglioni, 2017), e posteriormente sua dinâmica populacional (Ozga et al., 2018). Os aspectos reprodutivos também foram observados em populações de *H. carstica* Bastos-Pereira & Bueno, 2012 (Torres et al., 2015) e *H. longistila* Faxon, 1876 (Bastos-Pereira & Bueno, 2016)

Entretanto, os trabalhos ecológicos com espécies simpátricas do gênero *Hyaella* restringem-se a estudos sobre biologia populacional e reprodutiva de *H. pleoacuta* González, Bond-Buckup & Araujo, 2006, e *H. castroi* González, Bond-Buckup & Araujo, 2006, no estado do Rio Grande do Sul (Castiglioni, 2007; Castiglioni & Bond-Buckup, 2007; Castiglioni et al., 2007; Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a; Castiglioni & Bond-Buckup, 2008b; Castiglioni & Bond-Buckup, 2009). De acordo com Castiglioni & Bond-Buckup (2008a) sugere-se que a co-ocorrência das espécies de *Hyaella* é possível devido a sutis diferenças em traços de sua história de vida, levando em conta especialmente seu tamanho corporal e suas estratégias reprodutivas. Dessa forma, o conhecimento do ciclo biológico, e especialmente a avaliação da dinâmica populacional e reprodutiva pode ajudar na interpretação do estado de conservação das populações e também auxiliar em políticas de preservação dos ecossistemas dulcícolas (Rodrigues, 2016).

Neste sentido, este estudo tem como objetivo realizar a caracterização e comparação da biologia populacional e reprodutiva de duas espécies do gênero *Hyaella*, encontrados em simpatria em uma nascente na região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem:

O trabalho de campo foi desenvolvido em uma nascente na bacia hidrográfica do Rio da Várzea, em propriedade particular na região de Capão Alto, Distrito de Santa Rosa, localizado na cidade de Palmeira das Missões, estado do Rio Grande do Sul (27°51'38"S - 53°15'11"W), com uma altitude de 526m acima do nível do mar. O clima da região é

do tipo Cfa, subtropical, com verões quentes e chuvas bem distribuídas ao longo do ano, com temperatura média de 22° C no período mais quente (MORENO, 1961). Sendo uma região predominantemente agrícola, possui grande parte de seu território ocupado por lavouras de soja e trigo com plantio alternado de acordo com as respectivas épocas de safra e entressafra (IBGE, 2019).



Figura 1. Nascente onde *Hyaella. gauchensis* e *Hyaella. sp. nov.* foram amostradas em simpatria na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

As amostragens dos exemplares de *Hyaella* tiveram duração de 10 minutos e foram realizadas de forma mensal, com início em abril de 2018 e término em março de 2019, no período que constituiu o intervalo de um ano. As coletas foram efetuadas no período da manhã por uma pessoa com o auxílio de puçá (rede de mão) e posteriormente armazenada em sacos plásticos, depositados em caixa térmica com gelo para o devido transporte até o laboratório. Fêmeas ovíferas e casais em comportamento pré-copulatório foram individualizados em microtubos ainda em campo.

Juntamente com a amostragem dos exemplares de *Hyaella*, foi realizada mensalmente a amostragem de alguns parâmetros ambientais. Com o auxílio de um pHmetro, foram mensurados o pH e a temperatura da água, já a temperatura do ambiente, foi mensurada através da utilização de um termômetro digital.

Análise das características ecológicas das espécies de *Hyaella*

Os animais foram separados em quatro grupos distintos: machos (indivíduos com desenvolvimento evidente do gnatópodo 2, fêmeas (gnatópodo 2 sem desenvolvimento secundário aparente e presença de oostegitos), fêmeas ovígeras (fêmeas com presença de ovos ou juvenis dentro do marsúpio) e juvenis (indivíduos sem características sexuais secundárias como desenvolvimento do gnatópodo 2 ou presença de oostegitos) (Castiglioni & Bond-Buckup, 2007). Posteriormente todos os exemplares foram mensurados através da utilização de microscópio com ocular micrométrica para a determinação do comprimento do cefalotórax (CC) em mm (Borowsky, 1991; Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a).

Posteriormente foram analisados os seguintes aspectos populacionais e reprodutivos de *Hyaella gauchensis* e *Hyaella* sp. nov.: tamanho corpóreo de machos e fêmeas, maturidade sexual (tamanho do menor macho e fêmea formando casais em pré-cópula e tamanho da menor fêmea ovígera), distribuição de frequência em classes de tamanho, razão sexual, período reprodutivo (frequência de fêmeas ovígeras e casais) e recrutamento.

A abundância de cada espécie de *Hyaella* foi estimada mensalmente para cada grupo etário e posteriormente foi calculada a proporção mensal de *H. gauchensis* e *Hyaella* sp. nov. Um teste de ajuste de bondade (χ^2) foi utilizado para avaliar a proporção das espécies ($\alpha=0,05$; Zar, 2010).

O tamanho corpóreo foi determinado pelos tamanhos máximo, médio e mínimo (\pm desvio padrão) do comprimento do cefalotórax (CC) de machos, fêmeas, fêmeas ovígeras e juvenis das duas espécies de *Hyaella*. Em sequência, foi feita a comparação entre os sexos ao nível de significância de 5% por meio de um teste *t* para cada espécie ($\alpha=0,05$) (Zar, 2010). Além disto, foi realizada a comparação de tamanho de CC de machos e fêmeas entre as duas espécies utilizando-se um teste *t* ($\alpha=0,05$) (Zar, 2010).

A maturidade sexual foi determinada através de dois métodos: a) a análise do comprimento do cefalotórax dos menores machos e fêmeas encontrados em comportamento pré-copulatório (Borowsky, 1991; Ozga & Castiglioni, 2017); b)

tamanho da menor fêmea ovígera encontrada na população de cada espécie de *Hyalella* (Ozga & Castiglioni, 2017).

Para caracterização da estrutura das populações, todos os exemplares amostrados para cada população foram agrupados em classes de tamanho 0,05 mm (20 classes de tamanho de comprimento do cefalotórax) após a mensuração. O número de classes de tamanho foi determinado através do valor de um quarto do desvio padrão do comprimento do cefalotórax dos anfípodos amostrados ao longo do estudo (Markus, 1971).

A distribuição de frequência por classe de tamanho de cada grupo de interesse (juvenis, machos e fêmeas) foi analisada para o total da população de cada espécie de *Hyalella* amostrada e também por estação do ano, durante o período de um ano, a fim de acompanhar as variações temporais da distribuição de frequência etária das populações e também para analisar a sazonalidade de processos como reprodução e recrutamento das espécies. A normalidade das distribuições de frequência foi analisada através do teste de Shapiro-Wilk ($\alpha= 0,05$) (Zar, 2010).

A razão sexual total, mensal, sazonal e por classes de tamanho de CC foi estimada como o número total de machos dividido pelo número total de fêmeas (machos: fêmeas). Com a finalidade de verificar se a razão sexual segue a proporção de 1:1 ou se difere do padrão 1:1 foi utilizado um teste de ajuste de bondade (χ^2) com nível de significância de 5% (Zar, 2010).

O período reprodutivo foi determinado pela frequência relativa (%) mensal e sazonal de fêmeas ovígeras e frequência relativa (%) de casais em comportamento pré-copulatório. Posteriormente, a proporção de fêmeas ovígeras e de casais foram comparadas utilizando-se uma análise de proporções multinomiais ao nível de significância de 5% (Curi & Moraes, 1981).

Para a análise do recrutamento (entrada de juvenis na população), foram considerados juvenis os indivíduos machos e fêmeas que apresentaram o comprimento do cefalotórax inferior ao padrão determinado para a maturidade sexual de cada espécie de *Hyalella*. Posteriormente, as proporções de juvenis foram comparadas entre os meses e estações do, usando o teste de proporções multinomiais (MANAP) (Curi & Moraes, 1981), com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Durante o período de amostragem, o pH sofreu poucas alterações, apresentando o valor mínimo de 6,42 no mês de março/19 e valor máximo de 6,99 em fevereiro/19. A temperatura da água sofreu variações com mínima de 13° C em junho/18 e máxima de 23,1° C em fevereiro/19. Já a temperatura do ambiente variou entre 9° C em junho de 2018 e 25,9° C em dezembro de 2018 (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros ambientais do ponto de amostragem de *Hyaella gauchensis* e *Hyaella* sp. nov., na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

Mês	pH	Temperatura da água (° C)	Temperatura do ar (° C)
Abr/18	6,68	21,7	22,1
Mai/18	6,55	18,0	21,2
Jun/18	6,61	13,0	9,0
Jul/18	6,59	14,5	13,9
Ago/18	6,62	22,4	24,9
Set/18	6,5	16,3	18,1
Out/18	6,65	18,9	20,5
Nov/18	6,52	18,4	21,6
Dez/18	6,63	21,4	25,9
Jan/19	6,8	20,9	23,5
Fev/19	6,99	23,1	24,8
Mar/19	6,42	22,0	26,6

No período de um ano foram amostrados 19.998 indivíduos de *H. gauchensis*, sendo 12.462 juvenis, 2.200 machos e 4.513 fêmeas, onde 823 fêmeas eram ovígeras (Tabela 1). Para *Hyaella* sp. nov. foram amostrados um total de 880 indivíduos, sendo 277 juvenis, 254 machos, 282 fêmeas, sendo 67 fêmeas ovígeras (Tabela 2). Ambas as espécies de *Hyaella* foram amostradas durante todos os meses do ano (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Número de indivíduos de *Hyaella gauchensis* amostrados mensalmente, proporção sexual mensal (machos: fêmeas) e análise de ajuste de bondade (χ^2), na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

Mês	Machos	Fêmeas	Fêmeas ovígeras	Juvenis	Total	M/F	χ^2
Abr/18	119	198	40	349	706	0,50	39,67*
Mai/18	128	135	24	869	1156	0,81	3,35
Jun/18	113	244	41	624	1022	0,40	74,33*

Jul/18	375	855	140	1805	3175	0,38	280,58*
Ago/18	256	775	103	2231	3365	0,29	341,17*
Set/18	224	473	140	1431	2268	0,37	180,79*
Out/18	306	725	130	2975	4136	0,36	259,60*
Nov/18	86	221	75	479	861	0,29	115,45*
Dez/18	145	356	33	810	1344	0,37	111,49*
Jan/19	154	185	39	271	649	0,69	12,96*
Fev/19	138	204	7	353	702	0,65	15,27*
Mar/19	156	142	51	265	614	0,81	3,92*
Total	2200	4513	823	12462	19998	0,41	1305,00*

Nota: o “**” indica diferença significativa na proporção entre machos e fêmeas ($p < 0,05$).

Tabela 3. Número de indivíduos de *Hyalella* sp. nov. amostrados mensalmente, proporção sexual mensal (machos: fêmeas) e análise de ajuste de bondade (χ^2), na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

Mês	Machos	Fêmeas	Fêmeas ovíferas	Juvenis	Total	M/F	χ^2
Abr/18	42	60	7	7	116	0,63	5,73*
Mai/18	13	13	3	10	39	0,93	0,04
Jun/18	43	55	16	85	199	0,61	6,88*
Jul/18	38	39	11	48	136	0,76	1,64
Ago/18	10	11	5	29	55	0,63	1,38
Set/18	13	19	6	26	64	0,68	1,13
Out/18	10	9	4	0	23	0,77	0,39
Nov/18	20	26	3	30	79	0,57	4,09*
Dez/18	11	13	4	12	40	0,58	2,13
Jan/19	6	11	0	0	17	0,55	1,47
Fev/19	9	7	0	2	18	1,29	0,25
Mar/19	39	19	8	28	94	1,44	2,18
Total	254	282	67	277	880	0,73	14,97*

Nota: o “**” indica diferença significativa na proporção entre machos e fêmeas ($p < 0,05$).

A espécie *H. gauchensis* apresentou maior abundância em todos os meses amostrados, demonstrando-se 22,7 vezes mais abundante que *Hyalella* sp. nov. no total ($\chi^2 = 17497,43$; $p < 0,05$) (Figura 2).

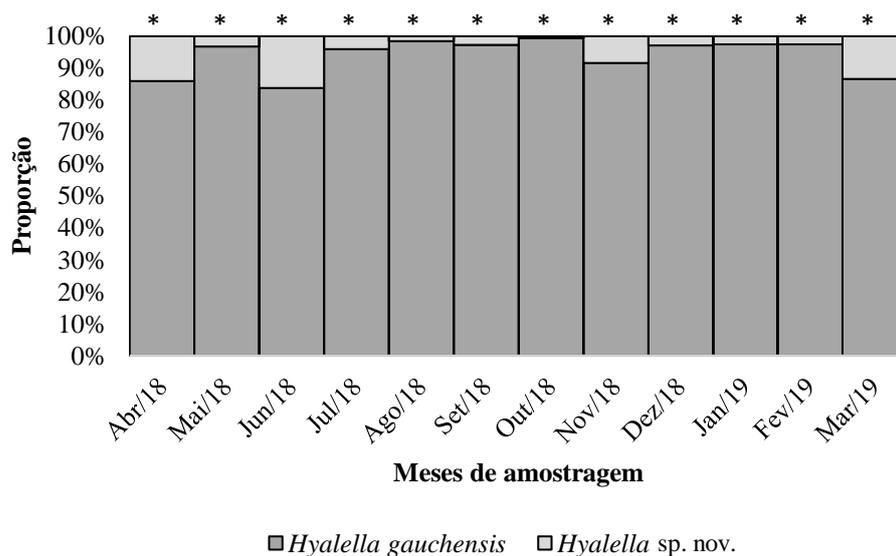


Figura 2. Proporção entre *Hyalella gauchensis* e *Hyalella sp. nov.* amostradas ao longo do ano na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. O “*” indica diferenças significativas na proporção entre as duas espécies de *Hyalella* ($p < 0,05$).

O comprimento do cefalotórax dos machos de *H. gauchensis* variou entre 0,35 e 0,99 mm, das fêmeas entre 0,35 e 0,99 mm, fêmeas ovígeras entre 0,40 e 0,99 mm e juvenis entre 0,02 e 0,32 mm. O tamanho médio de machos dentro da população ($0,69 \pm 0,11$ mm) foi significativamente superior ao tamanho médio das fêmeas ($0,54 \pm 0,14$ mm) ($t=44,38$; $p < 0,05$). As fêmeas ovígeras apresentam um tamanho médio maior ($0,66 \pm 0,8$ mm) do que fêmeas não ovígeras ($0,50 \pm 0,13$ mm) ($t=-28,73$; $p < 0,05$). Juvenis apresentam um tamanho médio de $0,21 \pm 0,06$ mm.

Em *Hyalella sp. nov.* a variação do comprimento do cefalotórax dos machos foi 0,30 e 0,72 mm, nas fêmeas entre 0,25 e 0,67 mm, nas fêmeas ovígeras entre 0,30 e 0,79 mm e juvenis entre 0,07 e 0,27 mm. O tamanho médio de machos dentro da população ($0,49 \pm 0,08$ mm) foi superior ao tamanho médio das fêmeas ($0,46 \pm 0,09$ mm) ($t=4,83$; $p < 0,05$). As fêmeas ovígeras ($0,53 \pm 0,7$ mm) apresentam um tamanho médio significativamente inferior ao das fêmeas não ovígeras ($0,44 \pm 0,09$ mm) ($t=-7,68$; $p < 0,05$). Juvenis apresentam um tamanho médio de $0,19 \pm 0,06$ mm.

Na comparação entre as duas espécies de *Hyaletella*, tanto os machos ($t=28,01$) quanto as fêmeas ($t=10,67$) de *H. gauchensis* apresentaram um tamanho médio de CC significativamente superior ao de *Hyaletella* sp. nov. ($p<0,05$).

Levando-se em consideração o tamanho do menor macho e menor fêmea de *H. gauchensis* encontrados formando casal em comportamento pré-copulatório, a maturidade sexual foi estimada em 0,47 e 0,35 mm, respectivamente. Já em *Hyaletella* sp. nov. a maturidade sexual foi de 0,42 mm em machos e 0,30 mm em fêmeas. Além disto, a maturidade sexual das fêmeas foi estimada a partir do tamanho da menor fêmea ovígera amostrada, sendo este valor de 0,40 mm em *H. gauchensis* e 0,30 mm em *Hyaletella* sp. nov.

A frequência total em classes de tamanho de comprimento do cefalotórax não apresentou uma distribuição normal ($p<0,05$) para ambas as espécies de *Hyaletella* (*H. gauchensis*: machos – $W= 0,96$ e fêmeas $W= 0,97$; *Hyaletella* sp. nov. – machos $W= 0,95$ e fêmeas $W= 0,95$). Além disto, a distribuição total de *H. gauchensis* apresentou-se bimodal para machos e juvenis, enquanto nas fêmeas apresentou-se polimodal (Figura 3). Já em *Hyaletella* sp. nov. a distribuição foi bimodal tanto para machos, como para fêmeas e juvenis (Figura 4). Os machos de ambas as espécies apresentaram maior frequência nas classes de tamanho superiores onde *H. gauchensis* apresentou picos de frequência entre 0,70--I 0,75 mm e 0,65--I 0,70 mm e *Hyaletella* sp. nov. nas classes entre 0,50--I 0,55mm e 0,55--I 0,60 mm (Figura 3 e 4). Já para as fêmeas, as duas espécies demonstraram maior frequência nas classes intermediárias, sendo que *H. gauchensis* apresentou três picos de frequência entre 0,35--I 0,40 mm, 0,50--I 0,55 mm e 0,70--I 0,75 mm, enquanto fêmeas de *Hyaletella* sp. nov. apresentaram dois picos, um entre 0,50--I 0,55 mm e 0,35--I 0,40 mm. Juvenis de ambas as espécies de *Hyaletella* foram mais frequentes nas classes de 0,10--I 0,15 mm e 0,25--I 0,30 mm (Figuras 3 e 4).

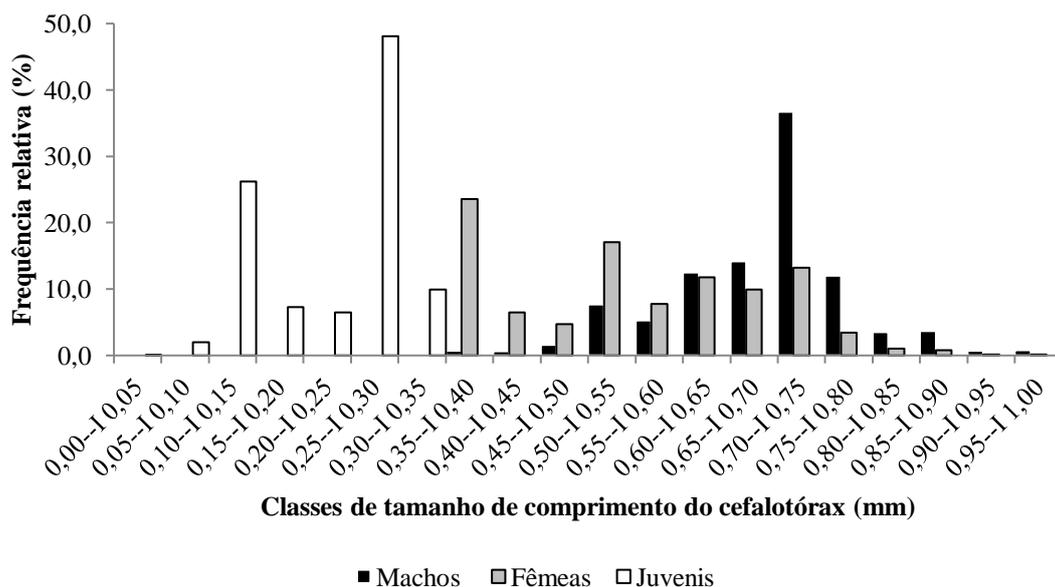


Figura 3. Distribuição de frequência relativa total (%) por classe de tamanho do comprimento do cefalotórax (CC) de machos, fêmeas e juvenis de *Hyalella gauchensis* na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

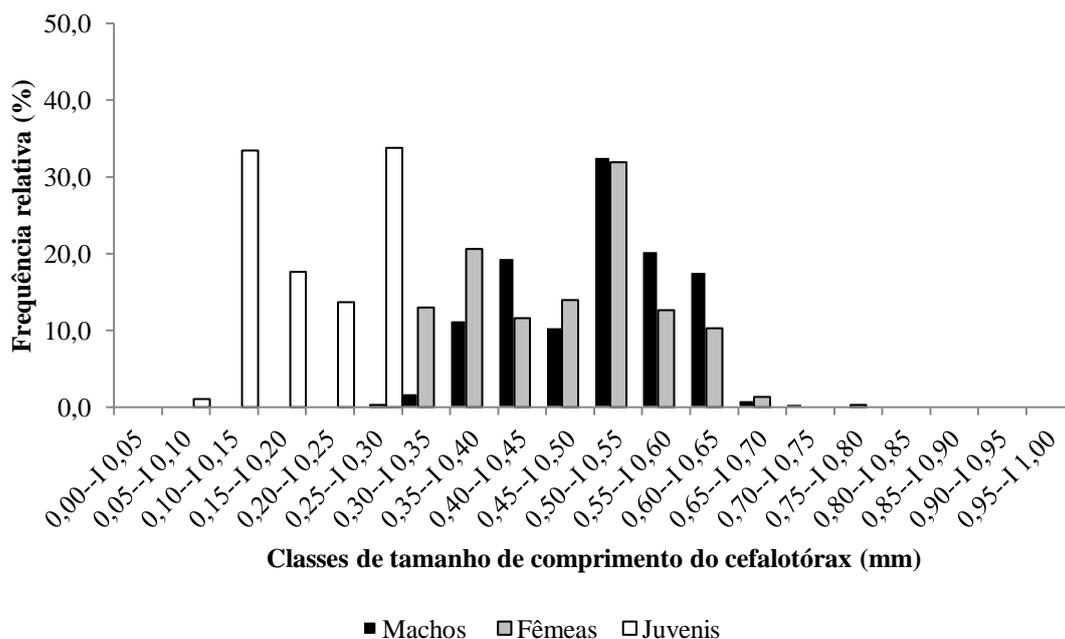
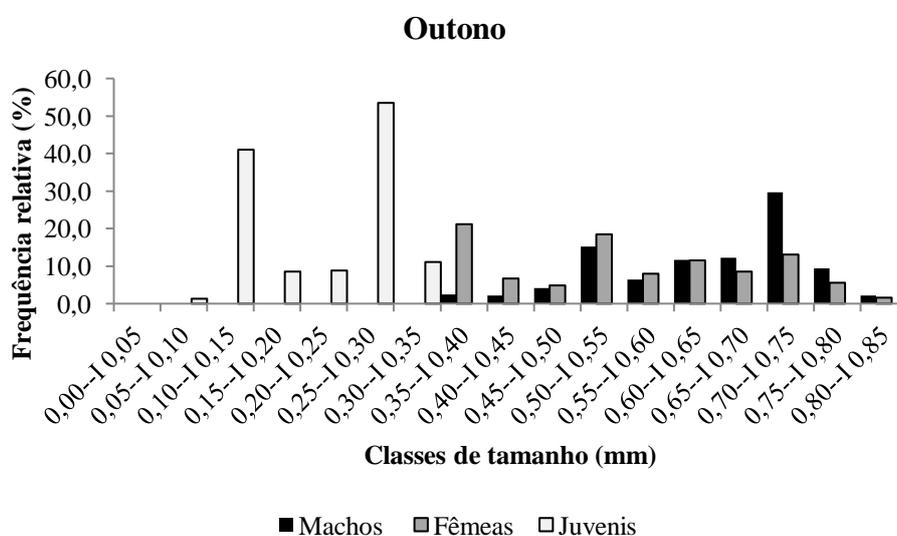


Figura 4. Distribuição de frequência relativa total (%) por classe de tamanho do comprimento do cefalotórax (CC) de machos, fêmeas e juvenis de *Hyalella sp. nov.* na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

Durante todas as estações do ano, foram amostrados juvenis, machos e fêmeas para ambas as espécies, porém com picos de frequência em diferentes classes de tamanho de CC. A distribuição de *H. gauchensis* foi bimodal em todas as estações do ano para juvenis, enquanto machos apresentaram distribuição bimodal apenas no outono e unimodal para as demais estações. No entanto, as fêmeas de *H. gauchensis* apresentaram uma distribuição polimodal em todas as estações do ano (Figura 5). Já em *Hyalella* sp. nov. a distribuição de frequência em classes de tamanho de CC apresentou uma maior variação ao longo das estações do ano. Para juvenis foi unimodal no inverno e primavera e bimodal no verão e no outono. Os machos apresentaram uma distribuição unimodal apenas no outono e apresentando-se bimodal para as demais estações ao longo do ano. As Fêmeas apresentaram distribuição unimodal na primavera e verão e bimodal para as demais estações (Figura 6).



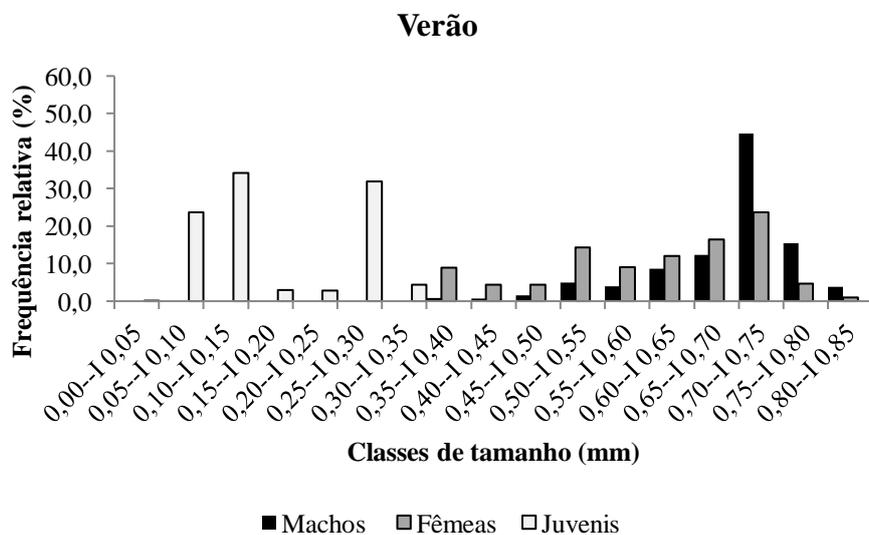
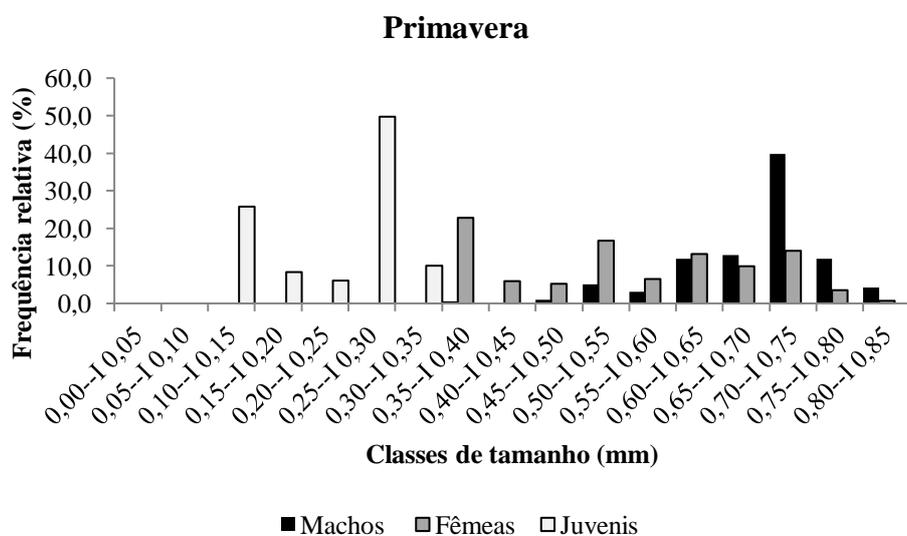
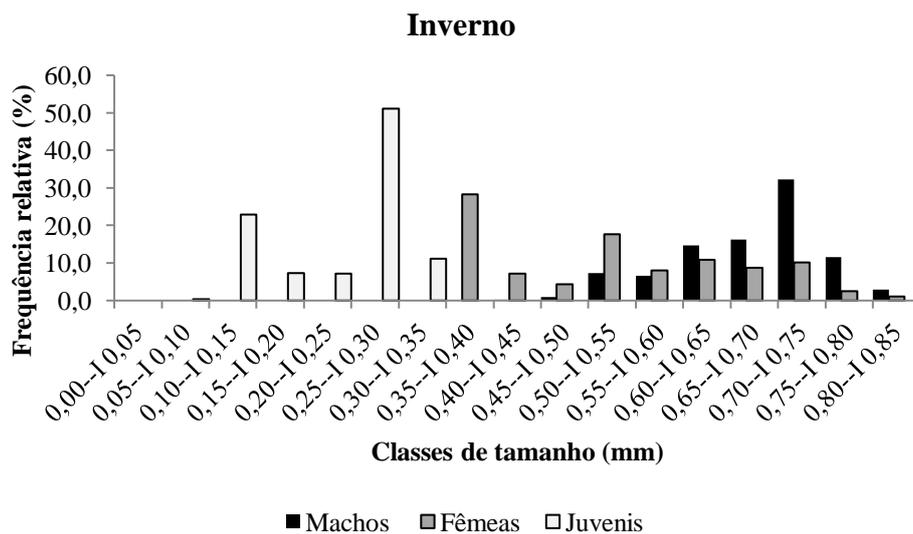
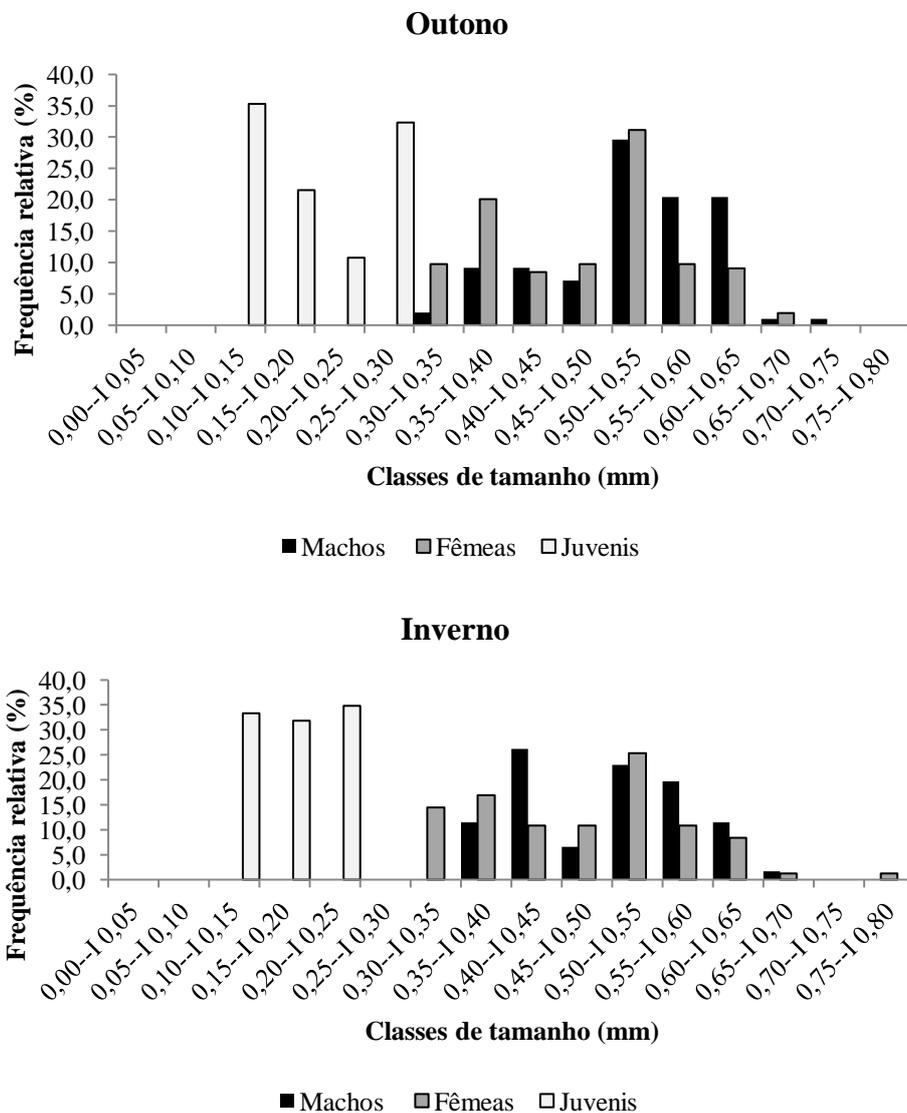


Figura 5. Distribuição de frequência relativa (%) por classe de tamanho do comprimento do cefalotórax (mm) por estação do ano em *Hyalella gauchensis* na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.



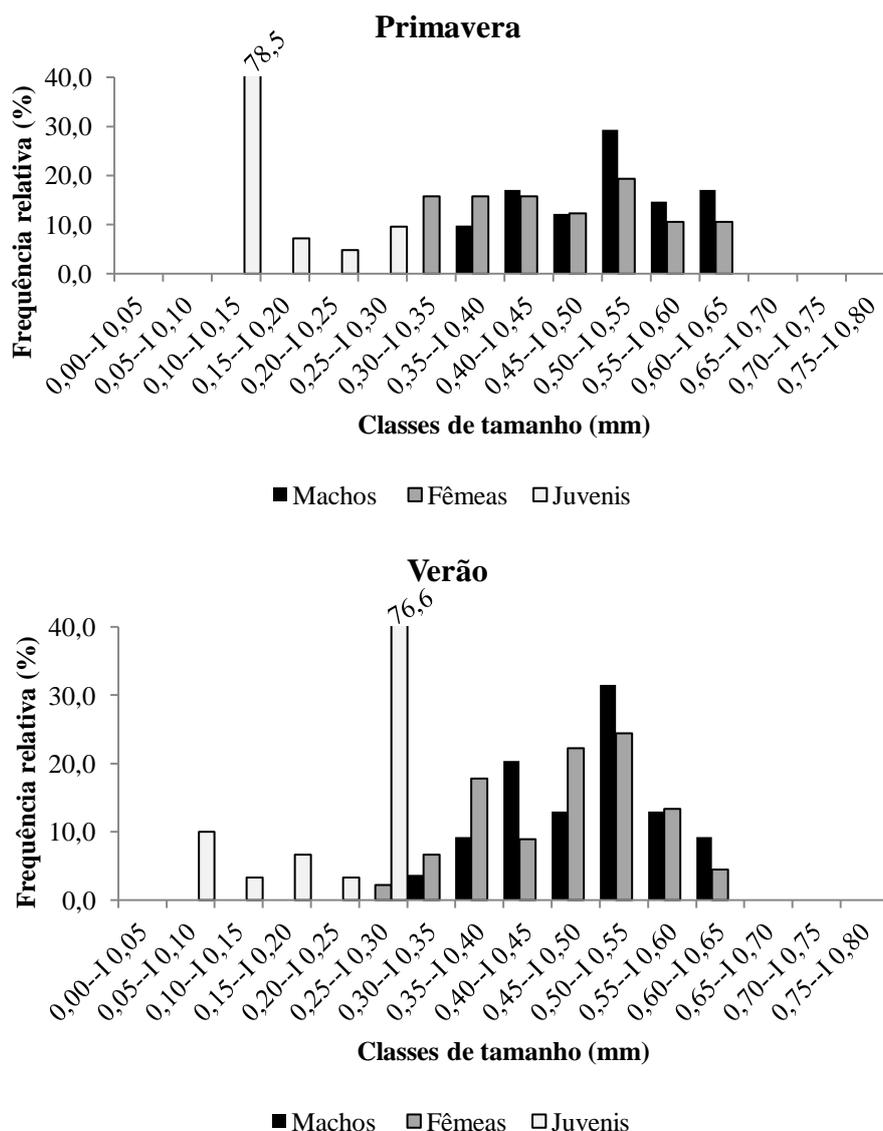


Figura 6. Distribuição de frequência relativa (%) por classe de tamanho do comprimento do cefalotórax (mm) por estação do ano em *Hyalella* sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

A proporção sexual total das populações (macho: fêmea) para ambas as espécies favoreceu as fêmeas (*H. gauchensis*- 0,41 macho: 1 fêmea, $\chi^2= 1305,00$; $p<0,05$; *Hyalella* sp. nov.- 0,73 macho:1 fêmea, $\chi^2=14,97$, $p<0,05$).

A proporção de fêmeas foi significativamente superior ao de machos de *H. gauchensis* em todos os meses do ano, não apresentando diferença significativa apenas no mês de maio ($p>0,05$) (Tabela 1). Em *Hyalella* sp. nov., foram observadas diferenças

significativas na proporção sexual apenas nos meses de abril, junho e novembro, nos quais as fêmeas foram mais frequentes do que os machos ($p < 0.05$) (Tabela 2).

Quanto à proporção sexual sazonal, foi observado que as fêmeas foram mais frequentes que os machos e apresentam diferenças significativas em todas as estações em *H. gauchensis* (outono $\chi^2 = 99,50$; inverno $\chi^2 = 795,22$; primavera $\chi^2 = 484,36$ e verão $\chi^2 = 30,11$; $p < 0.05$) (Figura 7). Entretanto, fêmeas de *Hyalella* sp. nov. foram mais frequentes, apresentando diferenças significativas no outono ($\chi^2 = 11,66$), inverno ($\chi^2 = 3,950$ e primavera ($\chi^2 = 6,26$) ($p < 0.05$), enquanto os machos predominaram no verão ($\chi^2 = 0,82$) ($p > 0.05$) (Figura 8).

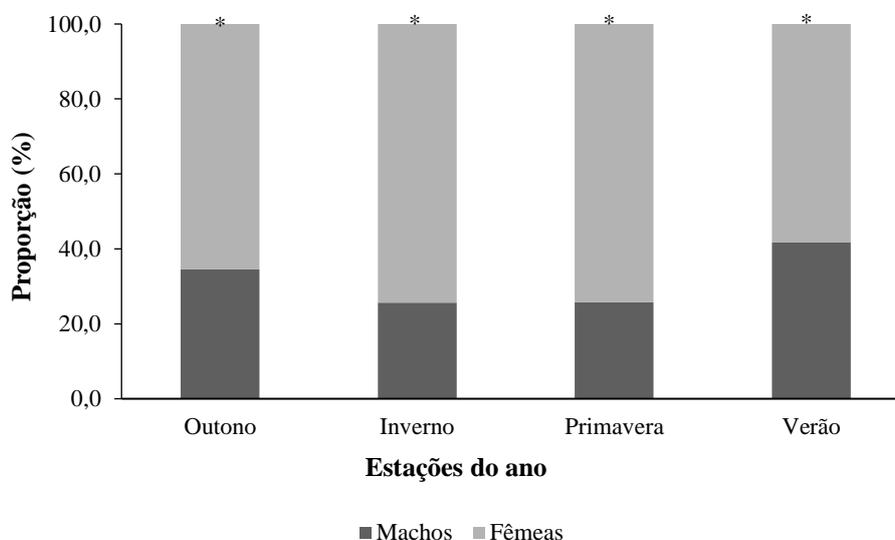


Figura 7. Proporção sexual sazonal de *Hyalella gauchensis* na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. O “*” indica diferenças significativas entre a proporção de machos e fêmeas ($p < 0,05$).

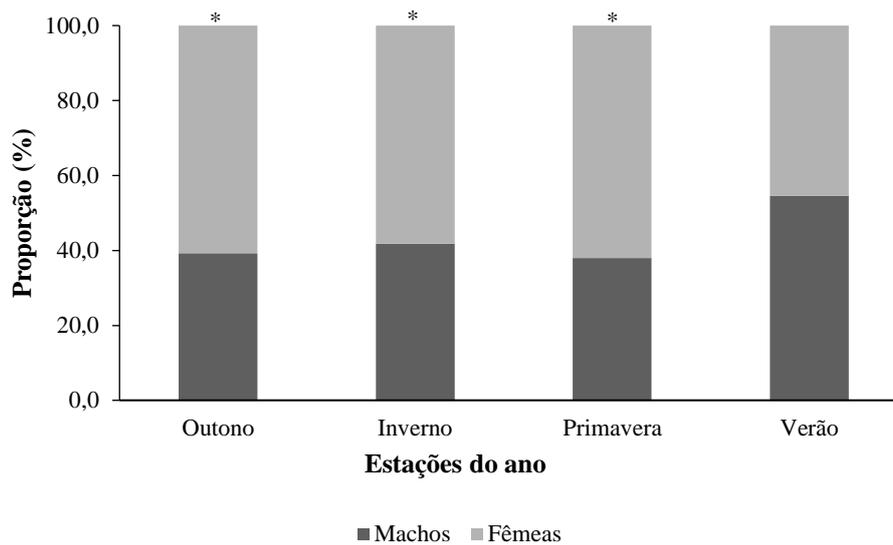


Figura 8. Proporção sexual sazonal de *Hyalella* sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. O “*” indica diferenças significativas entre a proporção de machos e fêmeas ($p < 0,05$).

A proporção sexual foi estimada por classes de tamanho do cefalotórax (CC), apresentando diferentes proporções entre os sexos ($p < 0,05$), favorecendo as fêmeas em classes de tamanho intermediárias, ao contrário dos machos, que são favorecidos nas classes de tamanho superiores em *H. gauchensis* (Figura 9). Em *Hyalella* sp. nov. a proporção sexual por classes de tamanho apresentou uma variação maior, sendo as fêmeas significativamente mais frequentes nas classes inferiores ($p < 0,05$) (Figura 10). No entanto, os machos foram mais frequentes nas classes superiores, mas os valores não foram diferentes significativamente ($p > 0,05$) (Figura 9).

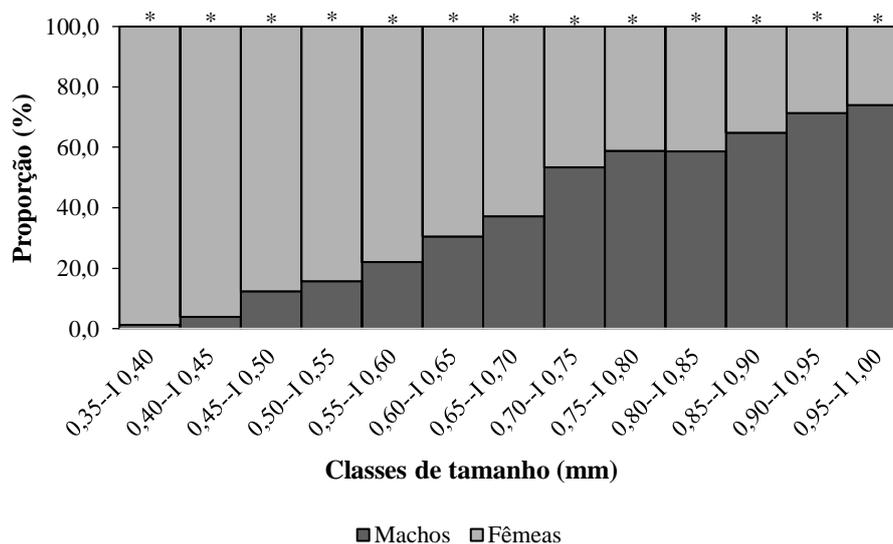


Figura 9. Proporção sexual por classe de tamanho de cefalotórax (CC) de *Hyalella gauchensis* na região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. O “*” indica diferenças significativas nas proporções entre machos e fêmeas ($p < 0,05$).

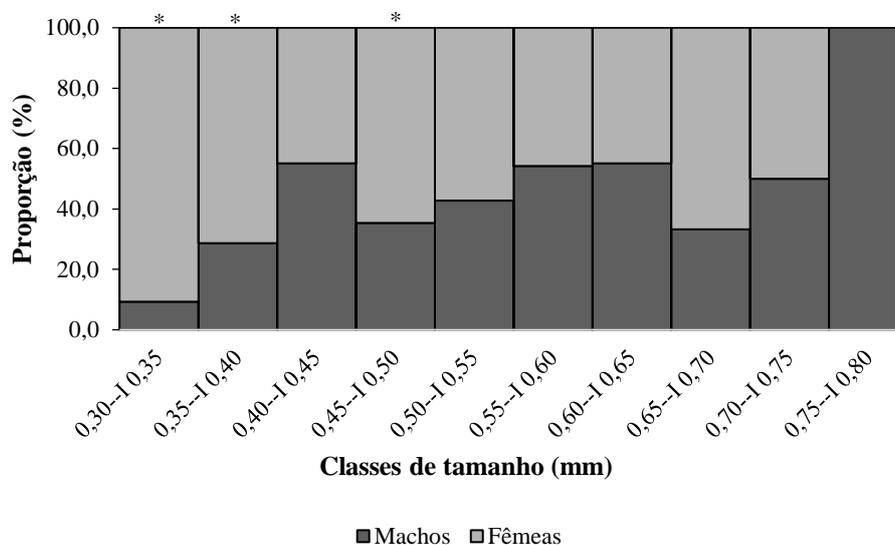


Figura 10. Proporção sexual por classe de tamanho de cefalotórax (CC) de *Hyalella* sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. O “*” indica diferenças significativas nas proporções entre machos e fêmeas ($p < 0,05$).

Em *H. gauchensis* machos e fêmeas em comportamento pré-copulatório foram amostrados ao longo de todo ano, com algumas flutuações na frequência em alguns meses (Figura 11). No entanto, *Hyalella* sp. nov. apresentou maiores variações nas frequências de casais, sendo que em alguns meses, os mesmos não foram registrados (Figura 11). Na análise sazonal, machos e fêmeas em comportamento pré-copulatório foram registrados ao longo de todas as estações do ano em ambas as espécies de *Hyalella* (Figura 12). A espécie *H. gauchensis* apresentou maior intensidade de casais no inverno, com diferenças significativas para todas as estações ($p < 0,05$), exceto primavera/verão ($p > 0,05$) (Figura 12). Já em *Hyalella* sp. nov. foi observada maior intensidade de casais no outono, com diferenças significativas para outono/inverno e outono/verão ($p < 0,05$) (Figura 12).

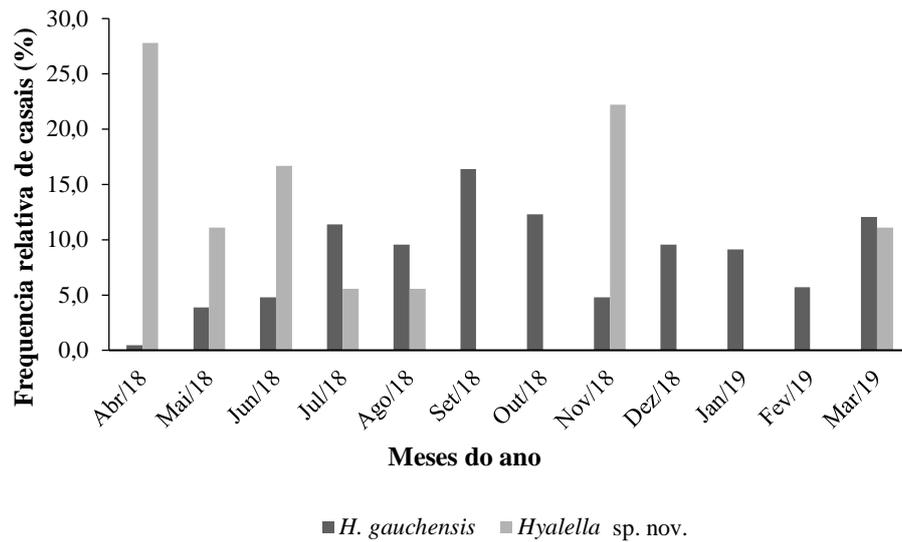


Figura 11. Frequência relativa (%) mensal de casais (indivíduos encontrados em comportamento pré-copulatório) de *Hyalella gauchensis* e *Hyalella* sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

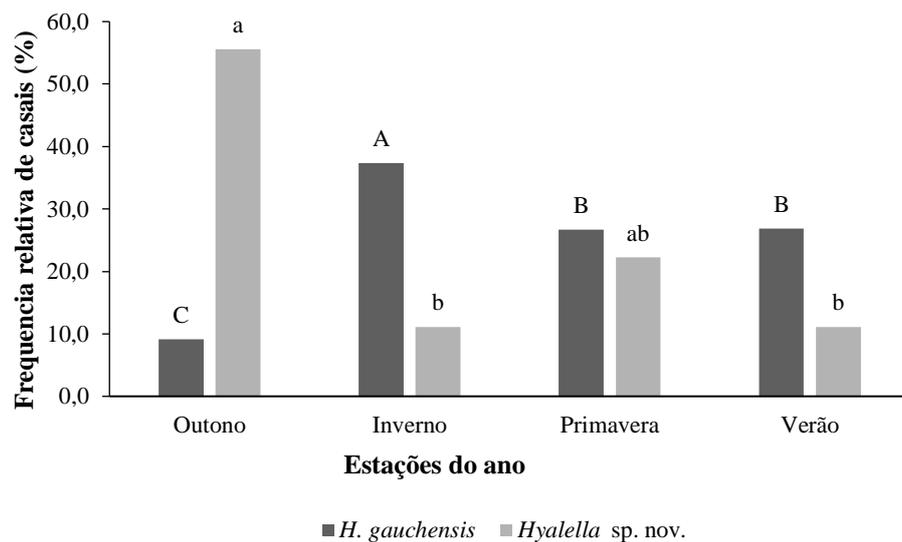


Figura 12. Frequência relativa (%) sazonal de casais (indivíduos encontrados em comportamento pré-copulatório) de *Hyalella gauchensis* e *Hyalella* sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as estações, onde letras maiúsculas representam *H. gauchensis* e letras minúsculas representam *Hyalella* sp. nov.

Fêmeas ovígeras de ambas as espécies de *Hyaella* (carregando ovos ou juvenis dentro do marsúpio) foram coletadas ao longo de todo o ano, demonstrando flutuações de frequências ao longo dos meses observados (Figura 13). Ambas as espécies apresentaram dois picos de frequência, onde *H. gauchensis* demonstrou maior intensidade no inverno, seguido da primavera, com diferenças significativas para todas as estações ($p < 0,05$), com exceção do outono e verão, os quais apresentaram semelhança na frequência de fêmeas ovígeras ($p > 0,05$) (Figura 14). Por outro lado, *Hyaella* sp. nov. apresentou maior intensidade reprodutiva no outono, seguido do inverno, com diferenças significativas para outono/primavera, outono/verão e inverno/verão ($p < 0,05$) (Figura 14).

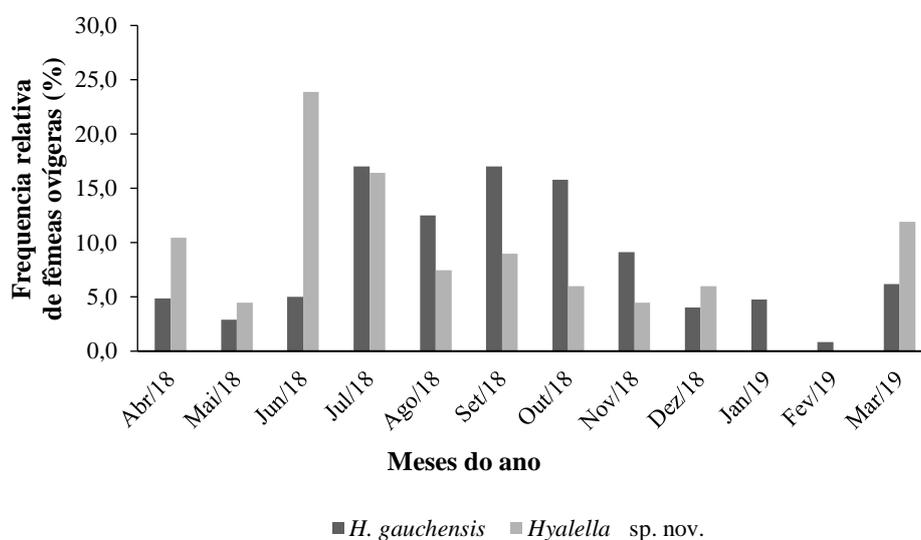


Figura 13. Frequência relativa (%) de fêmeas ovígeras de *Hyaella gauchensis* e *Hyaella* sp. nov. ao longo do ano na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

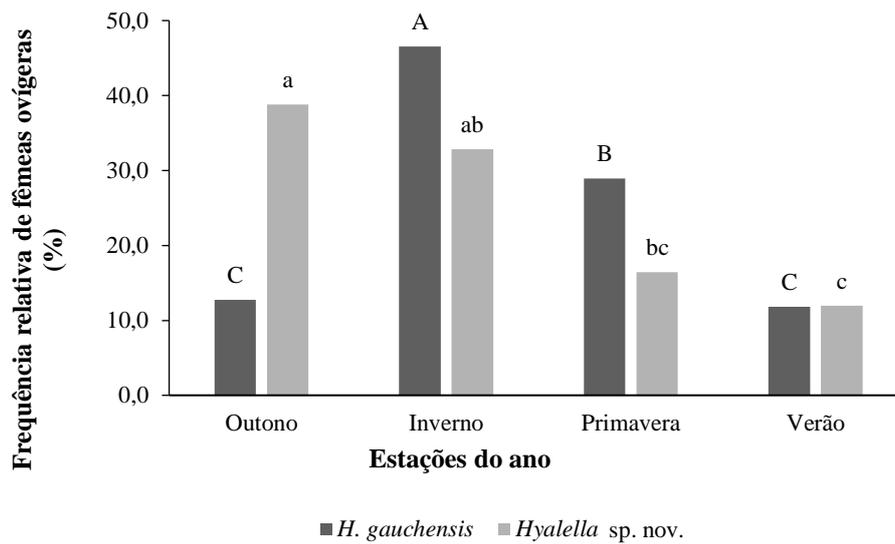


Figura 14. Frequência relativa (%) sazonal de fêmeas ovígeras de *Hyalella gauchensis* e *Hyalella* sp. nov. na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as estações do ano, onde letras maiúsculas representam *H. gauchensis* e letras minúsculas representam *Hyalella* sp. nov.

O recrutamento apresentou-se contínuo ao longo do ano para ambas as espécies de *Hyalella* (Tabelas 1 e 2), que demonstraram a presença de juvenis durante todas as estações do ano, mas com dois diferentes picos de recrutamento: *H. gauchensis* teve maior frequência no inverno, seguido da primavera com diferenças significativas para todas as estações ($p < 0,05$) (Figura 15), enquanto *Hyalella* sp. nov. apresentou maior frequência no outono seguido do inverno, com diferenças não significativas entre outono e inverno e entre a primavera e o verão ($p > 0,05$) (Figura 15).

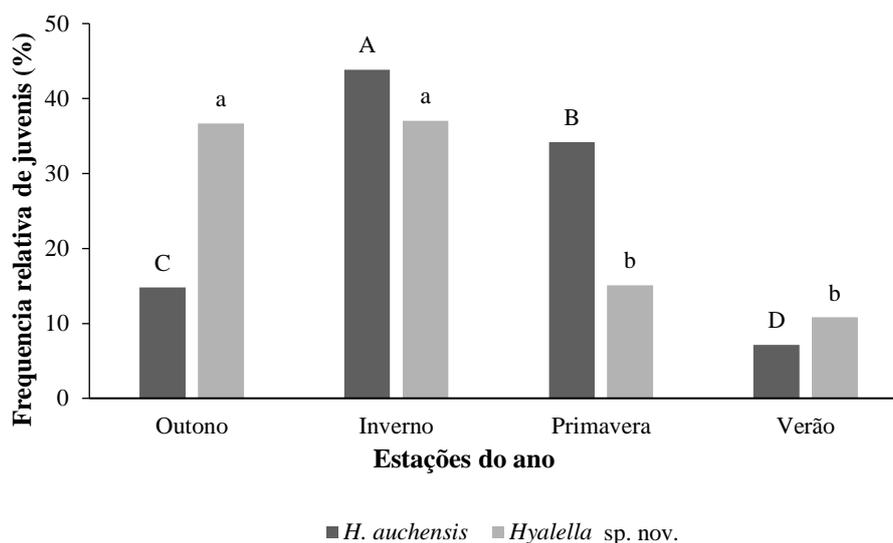


Figura 15. Frequência de juvenis de *Hyalella gauchensis* e *Hyalella* sp. nov. ao longo das diferentes estações do ano na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa na frequência de juvenis ($p < 0,05$) entre as estações do ano, onde letras maiúsculas representam a comparação de *H. gauchensis* e letras minúsculas representam *Hyalella* sp. nov.

DISCUSSÃO

Quando se observa a abundância de *H. gauchensis* e *Hyalella* sp. nov., percebe-se uma grande diferença entre as duas populações. Embora ambas as espécies estivessem presentes ao longo de todo o ano, as populações demonstraram uma grande diferença de abundância, onde *H. gauchensis* foi evidentemente mais abundante em todas as estações amostradas. Embora anfípodos que vivam em simpatria sejam comumente encontrados com separação espacial em micro habitats nos ecossistemas onde vivem, como observado por Castiglioni & Bond-Buckup (2007) em *H. pleoacuta* e *H. castroi*, e por Dick & Platvoet (1996) em duas espécies simpátricas, *Gammarus pulex* Linnaeus, 1758 e *G. tigrinus* Sexton, 1939, neste estudo não foi possível constatar diferenciação de microhabitats entre *H. gauchensis* e *Hyalella* sp. nov. Segundo Castiglioni & Bond-buckup (2007), a separação espacial em espécies simpátricas de *Hyalella* poderia indicar diferenças nas preferências fisiológicas ou caracterizar uma possível estratégia para evitar exclusão competitiva entre as populações, facilitando assim a coexistência das espécies. Entretanto, *H. gauchensis* e *Hyalella* sp. nov. aparentemente compartilham muitos aspectos do nicho ecológico.

No presente estudo foi observado que os machos atingem um maior comprimento do cefalotórax do que as fêmeas em ambas as espécies. Essa diferença de tamanho corporal entre os sexos já foi relatada anteriormente em outras espécies, como *H. pleoacuta* e *H. castroi* (Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a), *H. bonariensis* (Castiglioni et al., 2016), *H. longistila* (Bastos-Pereira & Bueno 2016), *H. georginae* e *H. gauchensis* (Ozga et al., 2018). Machos de crustáceos anfípodos, geralmente despendem maior gasto de energia com foco na aquisição de fêmeas para acasalamento e procura por alimento, enquanto as fêmeas tendem a ter maior gasto energético na produção de gametas e esforço parental (Wen, 1992). Como as fêmeas não sofrem muda durante o período de incubação dos ovos, sua taxa de crescimento torna-se menor por não acompanhar o mesmo ciclo de crescimento de indivíduos machos (Cardoso & Veloso, 1996), portanto, seu crescimento acaba sendo mais lento devido ao desprendimento energético para a produção e incubação dos embriões, além do tempo investido em função do cuidado parental com os juvenis dentro do marsúpio (Hartnoll, 1982; Thiel, 2003). Além disso, em relação a hipótese de competição macho-macho, os indivíduos com maior tamanho corporal possuem duas vantagens em relação a machos de menor tamanho: primeiramente a maior capacidade de aquisição da fêmea, proporcionando maior facilidade no transporte e manutenção do comportamento pré-copulatório, em segundo, maior probabilidade de resistir a aquisições de outros machos durante este período (Ward, 1983; Bollache et al., 2000). Essas características parecem ser determinantes para explicar o dimorfismo de tamanho corporal entre machos e fêmeas (Hartnoll, 1982; Ward, 1983; Wen, 1992; Cardoso & Veloso, 1996; Dick & Elwood 1996).

Quando comparado o tamanho corporal entre as duas espécies, a população de *Hyalella* sp. nov. apresentou-se menor em relação a *H. gauchensis*. O que poderia possibilitar que os indivíduos da população atinjam a fase adulta e maturidade sexual em um período de tempo mais curto, pois de acordo com Kruschwitz (1978), indivíduos que possuem pequeno porte podem atingir a maturidade sexual mais rápido do que indivíduos de grande porte, podendo assim se reproduzir mais cedo. Como *Hyalella* sp. nov. demonstrou atingir a maturidade sexual com tamanho inferior quando comparado a *H. gauchensis*, mas apresenta densidade populacional menor, esta característica poderia estar relacionada a pressões seletivas como competição interespecífica, ou indicar uma importante estratégia para sua estruturação populacional. A diferença de tamanho para atingir a maturidade sexual em espécies simpátricas de *Hyalella* já foi observada

anteriormente na região sul do país (Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a), como também em espécies não simpátricas (Ozga & Castiglioni, 2018), onde foi constatado que estas diferenças poderiam ser decorrentes das diferenças exploratórias por recursos ou suscetibilidade de predação.

No presente estudo, a distribuição de frequência em classes de tamanho de comprimento do cefalotórax foi predominantemente bimodal para ambas as espécies de *Hyaella*, apresentando polimodalidade apenas para fêmeas de *H. gauchensis*. Bimodalidade e polimodalidade nesta característica não parece ser incomum em espécies de *Hyaella*, como já observado por Castiglioni & Bond-Buckup (2007) em *H. castroi* e *H. pleocuta* e também por Ozga & Castiglioni (2018) em *H. gauchensis* e *H. georginae*. Além disso, este padrão pode ser encontrado também em diversos outros anfípodos, como observado em *Corophium multisetosum* Stock, 1952 (Cunha et al., 2000), *Echinogammarus longisetosus* Pinkster, 1973 (Guerao, 2003), *Talorchestia brito* Stebbing, 1891 (Gonçalves et al., 2003), *Talitrus saltator* Montagu, 1808 (Marques et al., 2003), *Cymadusa filosa* Savigny, 1816, *Ampithoe laxipodus* Appadoo & Myers, 2004, como também *Mallacoota schellenbergi* Ledoyer, 1984 (Appadoo & Myers, 2004) e *Gammarus chevreuxi* Sexton, 1913 (Subida et al., 2005). Díaz & Conde (1989) comentam que unimodalidade em distribuição de frequência de tamanho geralmente se encontra em populações com recrutamento contínuo e taxa de mortalidade constante entre as diversas fases de vida, o que caracterizaria uma população com estabilidade, enquanto bimodalidade ou polimodalidade poderiam ser resultado de picos diferenciais de recrutamento, mortalidade, desenvolvimento de maturidade sexual ou diferenças comportamentais. O resultado encontrado no presente estudo sugere que ambas as espécies de *Hyaella* possuem reprodução e recrutamento contínuo ao longo do ano, porém, com picos reprodutivos diferenciais, e consequentemente com diferentes picos de entrada de juvenis nas populações. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que casais em pré-cópula, fêmeas ovígeras e juvenis foram encontrados durante todas as estações do ano em ambas as populações.

Fêmeas foram mais frequentes que machos no total em ambas as espécies. Tanto *H. gauchensis* como *Hyaella* sp. nov. apresentaram proporção sexual favorável às fêmeas em todas as estações durante o ano de amostragem, exceto no verão em *Hyaella* sp. nov. Este padrão já foi anteriormente relatado por Castiglioni et al. (2016) em *H. bonariensis* e também por Castiglioni & Bond-Buckup (2008a) em populações de *H. pleocuta* e *H.*

castroi encontradas no estado do Rio Grande do Sul, onde foi observado que a razão sexual demonstrou-se favorável às fêmeas ao longo do ano, sendo que para *H. pleoacuta*, os machos foram mais abundantes apenas no verão e para *H. castroi*, os machos dominaram apenas no outono. Contudo, em estudos realizados com *H. georginae* e *H. gauchensis* por Ozga & Castiglioni (2018), as fêmeas foram mais frequentes em *H. georginae* apenas no verão, e em *H. gauchensis* as fêmeas foram mais frequentes no outono e verão.

Geralmente, em estudos realizados com anfípodos, os machos são encontrados em menor número do que as fêmeas ao longo das estações do ano, devido ao fato que algumas variações sazonais, estruturais ou comportamentos reprodutivos poderiam favorecer um dos sexos (Wellborn, 1994, 1995; Mardsen, 2002; Kevrekidis, 2004; Appadoo & Myers, 2004; Wellborn & Cothran, 2007; Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a). Esta inclinação favorável às fêmeas, pode ser considerada vantajosa nas estruturas populacionais, tendo em vista que as fêmeas são responsáveis pelo potencial reprodutivo das populações (Cardoso & Veloso, 2001). Segundo Cothran (2004) esta característica populacional pode ser relacionada ao fato de que indivíduos que habitam ambientes com predadores que preferencialmente atacam presas de maior tamanho, os machos apresentam uma maior taxa de mortalidade. Além disso, os machos destes anfípodos despendem um grande gasto de energia carregando as fêmeas durante o período de pré-copula, o que poderia torná-los mais vulneráveis a predadores do que fêmeas solteiras (Mathis & Hoback 1997). Alguns potenciais predadores, como larvas de Odonata, são principalmente táteis (Wellborn et al., 1996), Cothran (2004) sugeriu que a grande atividade dos machos a procura de fêmeas durante o período de acasalamento aumenta a taxa de predação dos indivíduos mais ativos. Além disso, machos altamente ativos tem mais chance de encontrar fêmeas receptivas do que machos menos ativos, entretanto, este comportamento pode aumentar a visibilidade destes indivíduos por peixes predadores (Magnhagen, 1991; Andersson, 1994).

No presente estudo *H. gauchensis* e *Hyalella* sp. nov. apresentaram maior número de indivíduos e maior taxa reprodutiva nos períodos de menor temperatura. Os recentes estudos realizados com espécies brasileiras do gênero *Hyalella*, sugerem um padrão comportamental reprodutivo com tendência a reprodução mais intensiva em períodos mais frios. A reprodução em períodos de menor temperatura foi observada em *H. bonariensis*, onde a presença de casais e fêmeas ovígeras foi registrada com maior

frequência no inverno (Castiglioni et al., 2016). Da mesma forma, *H. castroi* e *H. pleoacuta*, que ocorrem no estado do Rio Grande do Sul, também se reproduzem com maior intensidade no inverno (Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a).

Segundo Castiglioni et. al (2007), algumas espécies de *Hyalella* que vivem em temperaturas mais baixas tendem a desenvolver seu crescimento e maturidade sexual de forma mais lenta comparados a indivíduos que vivem em temperaturas mais elevadas. Este padrão também foi observado em outros anfípodos por Maranhão & Marques (2003), relatando que *Echinogammarus marinus* Leach, 1815 tendem a produzir ovos de maior tamanho e em menor número em temperaturas mais baixas. Entretanto, Bell & Fish (1996) afirmam que mesmo em períodos mais frios, condições estáveis e disponibilidade de alimentos podem favorecer a produção de ninhadas maiores. As espécies *H. gauchensis* e *Hyalella* sp. nov. vivem em um habitat com disponibilidade contínua de alimentos (observação pessoal), e assim, a reprodução mais acentuada em períodos de menor temperatura poderia evidenciar uma estratégia favorável para que suas proles possam evitar a competição com juvenis ou predadores de outras espécies que habitam o mesmo ecossistema.

É importante ressaltar que os anfípodos encontrados em baixas latitudes podem demonstrar características populacionais anuais com grande potencial reprodutivo, apresentando muitas ninhadas e pequenos embriões, enquanto os de alta latitude se caracterizam em geral por apresentarem poucas ninhadas em seu ciclo de vida, com embriões grandes e maior tempo para atingirem a maturidade sexual (Sainte-Marie, 1991). Embora encontradas em alta latitude, as duas espécies analisadas demonstram comportamento atípico quando comparadas com o padrão descrito por Sainte-Marie, (1991), apresentando características semelhantes ao padrão descrito para anfípodos que vivem em baixas latitudes. Porém esta característica também foi observada em outras espécies de *Hyalella* (*H. castroi* e *H. pleoacuta*) por Castiglioni & Bond-Buckup (2008a) no estado do Rio Grande do Sul, o que poderia sugerir um padrão comportamental para algumas espécies do gênero *Hyalella* na região sul do Brasil.

Embora *H. gauchensis* e *Hyalella* sp. nov. apresentem reprodução e recrutamento contínuo, foi observado que a maior frequência de recrutamento e os picos no período reprodutivo coincidem para as duas espécies, diferente do observado anteriormente em *H. gauchensis* por Ozga & Castiglioni (2018), onde houveram divergências sazonais entre os picos de reprodução e recrutamento. Na localidade tipo, Ozga & Castiglioni (2018)

relataram que *H. gauchensis* apresentou maior intensidade reprodutiva no verão, com pico de recrutamento na estação da primavera. Entretanto, neste presente estudo constatamos diferenças evidentes em seu padrão de comportamento sazonal, onde *H. gauchensis* apresentou maior intensidade de fêmeas ovígeras e pico de recrutamento em uma mesma estação, o inverno. Porém, espécies de *Hyalella* que vivem em simpatria podem apresentar diferentes estratégias reprodutivas, ciclos de vida, distribuição, razão sexual, taxa de mortalidade, dentre diversas outras características (Strong, 1972; Castiglioni & Bond-Buckup, 2007; 2008a; 2008b; 2009). Estas diferenças encontradas em seu padrão comportamental estariam associadas ao fato de que *H. gauchensis* e *Hyalella* sp. nov. vivam em simpatria em uma nascente onde foi realizado este estudo, enquanto na localidade tipo, *H. gauchensis* não dividia o habitat com outras espécies do mesmo gênero.

Algumas diferenças foram observadas quando comparamos os aspectos reprodutivos das duas espécies, estas diferenças poderiam estar ligadas a questões adaptativas em suas estratégias reprodutivas, com separação temporal entre os picos de maior frequência de reprodução para cada população, onde *Hyalella* sp. nov. parece ter antecipado seu pico reprodutivo, apresentando maior intensidade no outono seguido do inverno, enquanto *H. gauchensis* tem seu pico reprodutivo no inverno seguido da primavera. Essa alternância em picos de frequência reprodutiva já foi observada em outras espécies simpátricas de *Hyalella* por Castiglioni & Bond-Buckup (2008a), onde foi observado que *H. pleacuta* se reproduziu com mais intensidade no inverno, enquanto *H. castroi* teve seu pico reprodutivo no outono. De acordo com este comportamento, sugerimos a hipótese de que esta estratégia poderia separar temporalmente a incidência de um grande número de juvenis de cada espécie, o que poderia diminuir a competição por recursos destes indivíduos, proporcionando assim, uma maior probabilidade de sucesso na sobrevivência entre as suas proles. Levando em conta também, que a reprodução em uma estação onde existam menores taxas e atividade de predação, além da menor frequência de potenciais competidores por alimentos e habitat, evidencia que esta estratégia poderia beneficiar positivamente a estruturação populacional destes indivíduos, aumentando assim consideravelmente sua taxa de sobrevivência e sucesso reprodutivo, o que coincide com os resultados obtidos por Appadoo & Myers (2004) em um estudo realizado com os anfípodos *Cymadusa filosa*, *Ampithoe laxipodus* e *Mallacoota schellenbergi*.

CONCLUSÃO

As espécies *H. gauchensis* e *Hyaella* sp. nov. apresentaram algumas características populacionais distintas. Dentre estas, podem ser destacadas suas estratégias reprodutivas, onde as duas espécies apresentaram seus picos de reprodução e recrutamento nos períodos mais frios do ano. Entretanto, a separação temporal sazonal destes comportamentos entre as duas populações pode indicar as diferentes adaptações evolutivas entre as duas espécies para possibilitar sua coexistência.

De acordo com as análises, tanto *H. gauchensis* quanto *Hyaella* sp. nov. demonstram estabilidade em sua estrutura populacional, com taxas reprodutivas e presença representativa de machos, fêmeas e juvenis ao longo de todas as estações do ano. No entanto, *Hyaella* sp. nov. apresentou abundância evidentemente inferior quando comparada a *H. gauchensis*. Contudo, ainda não é possível identificar se a baixa densidade populacional de *Hyaella* sp. nov. se trata de uma estratégia adaptativa, ou se a mesma pode estar sendo excluída pela possível competição e/ou predação. Estudos futuros poderiam esclarecer estes questionamentos ou subsidiar um maior entendimento em relação a esta característica populacional nesta localidade.

REFERÊNCIAS

- Andersson, M., 1994. Sexual Selection. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Appadoo, C., Myers, A.A., 2004. Reproductive bionomics and life history traits of three gammaridean amphipods, *Cymadusa filosa* Savigny, *Ampithoe laxipodus* Appadoo and Myers and *Mallacoota schellenbergi* Ledoyer from the tropical Indian Ocean (Mauritius). Acta Oecol. 26(3), 227-238.
- Barnard, J.L, Karaman, G.S., 1983. Australia as a major evolutionary centre for Amphipoda (Crustacea). Aust. Mus. Mem. 18(1), 44-61.
- Bastos-Pereira, R., Bueno A.A.P., 2016. Dynamics of a natural population of a hyallelid amphipod from Brazil. J. Crustacean Biol. 36, 154-162.

- Bastos-Pereira R., DE Oliveira M.P.A., Ferreira R.L., 2018. Anophtalmic and epigean? Description of an intriguing new species of *Hyaella* (Amphipoda, Hyaellidae) from Brazil. *Zootaxa*. 4407(2), 254-266.
- Bell, M.C., Fish, J.D., 1996. Fecundity and seasonal changes in reproductive output of females of the gravel beach amphipod, *Pectenogammarus planicrurus*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 76, 37-55.
- Bollache, L., Gambade, G., Cézilly, F., 2000. The influence of microhabitat segregation on size-assortative pairing in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea: Amphipoda). *Arch. Hydrobiol.* 147, 547-558. doi: 10.1127/archiv-hydrobiol/147/2000/547.
- Borowsky, B., 1991. Patterns of reproduction of some amphipod crustaceans and insights into the nature of their stimuli. In: Bauer, R.T. & Martin, W. *Journal. Crustacean Sexual biology*. New York, Columbia. P. 33-66.
- Bueno, A.A.P., Araujo, P.B., Cardoso, G.M., Gomes, K.M., Bond-Buckup, G., 2013. Two new species of *Hyaella* (Amphipoda, Dogielinotidae) from Brazil. *Crustaceana*. 86(7-8), 802-819. doi: 10.1163/15685403-00003205
- Bueno, A.A.P., Rodrigues, S.G., Araujo, P.B., 2014. O estado da arte do gênero *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Senticaudata, Hyaellidae) no Brasil. In: Hayashi, C. (Ed.). *Tópicos de Atualização em Ciências Aquáticas*. Uberaba: UFMT, p. 57-88.
- Cardoso, G.M., Araujo, P.B., Bueno, A.A.P., Ferreira, R.L., 2015. Two new subterranean species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Brazil. *Zootaxa*. 3814(3), 353-368.
- Cardoso, G.M., Bueno, A.A.P., Ferreira, R.L., 2014. Two new subterranean species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Brazil. *Zootaxa*. 3814, 253-348
- Cardoso, R.S., Veloso, V.G., 2001. Embryonic development and reproductive strategy of *Pseudorchestoidea brasiliensis* (Amphipoda: Talitridae) at Prainha Beach, Brazil. *J. Nat. Hist.* 35(1), 201-211.
- Cardoso, R.S., Veloso, V.G., 1996. Population biology and secondary production of the sandhopper *Pseudorchestoidea brasiliensis* (Amphipoda: Talitridae) at Prainha Beach, Brazil. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142, 111-119.

Castiglioni, D.S., Streck, M.T., Rodrigues, S.G., Bueno, A.A.P., 2018. Reproductive strategies of a population of a freshwater amphipod (Crustacea, Amphipoda, Hyalellidae) from southern Brazil. *Biota Neotrop.* 18(2), e20170470. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0470>

Castiglioni, D.S., OZGA A.V., Rodrigues, S.G., Bueno, A.A.P., 2016. Population dynamics of a freshwater amphipod from South America (Crustacea, Amphipoda, Hyalellidae). *Nauplius.* 24, 2-9

Castiglioni, D.S., 2007. Os ciclos biológicos de duas espécies simpátricas de *Hyalella* Smith, 1874 (Crustacea, Peracarida, Amphipoda, Dogielinotidae). 2007. 256 p. Tese (Doutorado Biologia Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Castiglioni, D.S., Bond-Buckup, G., 2008a. Ecological traits of two sympatric species of *Hyalella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from southern Brazil. *Acta Oecol.* 33, 36-48.

Castiglioni, D.S., Bond-Buckup, G., 2009. Egg production of two sympatric species of *Hyalella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in aquaculture ponds in southern Brazil. *J. Nat. Hist.* 43, 1273-1289.

Castiglioni, D.S., Bond-Buckup, G., 2008b. Pairing and reproductive success in two sympatric species of *Hyalella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from southern Brazil. *Acta Oecol.* 33, 49-55.

Castiglioni, D.S., Bond-Buckup, G., 2007. Reproductive strategies of two sympatric species of *Hyalella* Smith, 1874 (Amphipoda, Dogielinotidae) in laboratory conditions. *J. Nat. Hist.* 41(25/28), 1571-1584.

Castiglioni, D.S., Garcia-Schroeder, D., Barcelos, D.F., Bond-Buckup, G., 2007. Intermolt duration and postembryonic growth of two sympatric species of *Hyalella* (Amphipoda, Dogielinotidae) in laboratory conditions. *Nauplius.* 15(2), 57-64.

Colla, M.F., Cesar, I.I., 2015. A new species of *Hyalella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from the the Atlantic Forest of Misiones, Argentina. *Zookeys.* 481(1), 25-38.

- Cooper, W.E., 1965. Dynamics and production of a natural population of a freshwater amphipod *Hyalella azteca*. Ecol. Monogr. 35(4), 377-394.
- Cothran, R.D., 2004. Precopulatory mate guarding affects predation risk in two freshwater amphipod species. Anim. Behav. 68(5), 1133-1138. doi:10.1016/j.anbehav.2003.09.021
- Cunha, M.R., Sorbe, J.C., Moreira, M.H., 2000. The amphipod *Corophium multisetosum* (Corophiidae) in Ria de Aveiro (NW Portugal). I. Life history and aspects of reproductive biology. Mar. Biol. 137, 637-650.
- Curi, P.R., Moraes, R.V., 1981. Associação, homogeneidade e contrastes entre proporções em tabelas contendo distribuições multinomiais. Ciência e Cultura, São Paulo. 33(5), 712-722.
- Díaz, H., Conde, J.E., 1989. Population dynamics and life of mangrove crab *Aratus pisonii* (Brachyura, Grapsidae) in a marine environment. B. Mar. Sci. 45, 148-163.
- Dick, J.T.A., Elwood, R.W., 1996. Effects of natural variation in sex ratio and habitat structure on mate-guarding decisions in amphipods (Crustacea). Behaviour. 133, 985-996.
- Dick, J.T.A., Platvoet, D., 1996. Intraguild predation and species exclusions in amphipods: the interaction of behaviour, physiology and environment. Freshwater Biol. 36, 375-383.
- Dutra, B.K., Fernandes, F.A., Laufer, A.L., Oliveira, G.T., 2009. Carbofuran-induced alterations in biochemical composition, lipoperoxidation and Na⁺/K⁺ATPase activity of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in bioassays. Comp. Biochem. Phys. C. 149, 640-646.
- Gonçalves, S. C., Marques, J. C., Pardal, M. A., Bouslama, M. F., Gtari, M. E., Charfi-Cheikhrouha, F. 2003. Comparison of the biology, dynamics, and secondary production of *Talorchestia brito* (Amphipoda, Talitridae) in Atlantic (Portugal) and Mediterranean (Tunisia) populations. Estuar. coast. Shelf Sci. 58, 901-916.
- González, E.R., Watling L., 2002. Redescription of *Hyalella azteca* from its type locality, Vera Cruz, Mexico (Amphipoda: Hyalellidae). J. Crustacean Biol. 22(1), 173-183

- González, E.R., Bond-Buckup, G., Araujo P.B., 2006. Two new species of *Hyalella* from southern Brazil (Amphipoda: Hyalellidae) with a taxonomic key. *J. Crustacean Biol.* 26(3), 355-365.
- Guerao, G., 2003. Some observations on the life history of the freshwater amphipod *Echinogammarus longisetosus* Pinkster, 1973 (Gammaridea) from Catalonia (Spain, N Iberia peninsula). *Anim. Biodiv. Conserv.* 26(1), 31-39.
- Hartnoll, R.G., 1982. Growth. In: Bliss, D.E. (Ed.), *Embryology, morphology and genetics the biology of Crustacea*. Academic Press, London. pp. 111-196, 440.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em 20 de dezembro de 2019.
- Kevrekidis, T., 2004. Population dynamics, growth and reproduction of *Corophium insidiosum* (Crustacea: Amphipoda) at low salinities in Monolimni lagoon (Evros Delta, North Aegean Sea). *Hydrobiologia.* 522(1/2), 117-132.
- Kruschwitz, L.G., 1978. Environmental factors controlling reproduction of the amphipod *Hyalella azteca*. *Proc. Oklahoma Acad. Sc.* 58, 16-21.
- Magnhagen, C., 1991. Predation risk as a cost of reproduction. *Trends E. Evol.* 6, 183-186
- Maranhão, P., Marques, J.C., 2003. The influence of temperature and salinity on the duration of embryonic development, fecundity and growth of the amphipod *Echinogammarus marinus* Leach (Gammaridae). *Acta Oecol.* 24(1), 5-13.
- Markus, R., 1971. *Elementos de estatística aplicada*. Faculdade de Agronomia e Veterinária da UFRGS: Centro Acadêmico Leopoldo Cortez, 329 pp.
- Marques, J.C., Gonçalves, S.C., Pardal, M.A., Chelazzi, L., Colombini, I., Fallaci, M., Bouslama, M.F., EL Gtari, M., Charficheikhrouha, F., Scapini, F., 2003. Comparison of *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) biology, dynamics, and secondary production in Atlantic (Portugal) and Mediterranean (Italy and Tunisia). *Estuar. Coast. Shelf S.* 58, 127-148.
- Marsden, I.D., 2002. Life-history traits of a tube-dwelling corophioid amphipod, *Paracorophium excavatum*, exposed to sediment copper. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 270(1), 57-72.

- Mathis, A., Hoback, W.W., 1997. The influence of chemical stimuli from predators on precopulatory pairing by the amphipod, *Gammarus psuedolimnaeus*. *Ethology*. 103, 33-40.
- Moreno, J.A., 1961. *Clima do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 41p.
- Nel, J.L.; Roux, D.J.; Abell, R.; Ashton, P.J.; Cowling, R.M.; Higgins, J.V.; Thieme, M., Viers, J.H., 2009. Progress and challenges in freshwater conservation planning. *Aquat. Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.* 19(1), 474-485.
- Ozga A.V., Castiglioni D.S., 2017. Reproductive biology of two species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from southern Brazil, *J. Nat. Hist.* 51(41):1-13. DOI: 0.1080/00222933.2017.1377777
- Ozga, A.V., Castro, V.S., Castiglioni, D.S., 2018. Population structure of two freshwater amphipods (Crustacea: Peracarida: Hyaellidae) from southern Brazil. *Nauplius*. 26, e2018025.
- Pereira, V.F.G.C., 2004. *Hyaella dielaii* sp. nov. From São Paulo Brazil (Amphipoda, Hyaellidae). *Rev. Bras. Zool.* 21(2), 179-184.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., ZAUKE, G.P., 2000. Crustaceans as bioindicators. *Biomonitoring of polluted water – reviews on actual topics* (a. Geerhardt, ed.), trans tech publications – Scitech publications, *Environm. Res. Forum.* 9, 161-194.
- Rodrigues, S.G., 2016. *Filogenia molecular, biogeografia e dinâmica populacional de anfípodos de água doce (Crustacea) da América do Sul*. 124 p. Tese (doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Sainte-Marie, B., 1991. A review of the reproductive bionomics of aquatic gammaridean amphipods: variation of life history traits with latitude, depth, salinity and superfamily. *Hydrobiologia*. 189, 189-227.
- Sampaio, A.V., 1988. *Dinâmica populacional e produtividade de uma população de amphipoda de água doce*. Dissertação de bacharelado em ecologia da Universidade Federal de São Carlos. 41p.

- Severo, S.M.A., 1997. Estudo do ciclo de vida de *Hyaella pernix* (Moreira, 1903) (Crustacea-Peracarida-Amphipoda) em laboratório. Porto Alegre, UFRGS, 121p. Dissertação (Mestrado – Ecologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Streck, M.T., Cardoso, G.M., Rodrigues, S.G., Graichen, D.A.S., Castiglioni, D.S., 2017. Two new species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) from state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Zootaxa*. 4337(2), 263-278.
- Streck-Marx, M.T., Castiglioni, D.S., 2020. A new species of freshwater amphipod (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) from state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Biota Neotrop.* 20(1), e20190802. Epub November 04, 2019. <https://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2019-0802>
- Strong, JR. D.R., 1972. Life history variation among populations of an amphipod (*Hyaella azteca*). *Ecology*. 53(6), 1103-1111.
- Subida, M.D., Cunha, M.R., Moreira, M.H., 2005. Life history, reproduction, and production of *Gammarus chevreuxi* (Amphipoda: Gammaridea) in the Ria de Aveiro, northwestern Portugal. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 4(1), 82-100.
- Thiel, M., 2003. Extended parental care in crustaceans - an update. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 76, 205-218.
- Torres, S.H.S., Bastos-Pereira, R., Bueno, A.A.P., 2015. Reproductive aspects of *Hyaella carstica* (Amphipoda: Hyaellidae) in a natural environment in southeastern Brazil. *Nauplius*. 23(2), 159-165.
- Väinölä, R., Witt, J.D.S., Grabowski, M., Bradbury, J.H., Jazdzewski, K., Sket, B., 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*. 595(1): 241-255.
- Wang, F., Goulet, R.R., Chapman, P.M., 2004. Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyaella azteca*: the gap between laboratory and nature. *Chemosphere*. 57(11), 1713-1724.
- Ward, P.I., 1983. Advantages and disadvantages of large size for male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 14, 69-76.
- Wellborn, G.A., 1994. Size-biased predation and prey life histories: a comparative study of freshwater amphipod populations. *Ecology*. 75(7), 2104-2117.

Wellborn, G.A., 1995. Determinants of reproductive success in freshwater amphipod species that experience different mortality regimes. *Anim. Behav.* 50(2), 353-363.

Wellborn, G.A., Skelly, D.K., Werner, E.E., 1996. Mechanisms creating community structure across a freshwater habitat gradient. *Annu. Rev. of Ecol. Syst.* 27: 337-363

Wellborn, G.A., Cothran, R.D., 2007. Niche diversity in crustacean cryptic species: complementarity in spatial distribution and predation risk. *Oecologia.* 154(9), 175-183.

Wen, Y.H., 1992. Life history and production of *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda) in a hypereutrophic prairie pond in southern Alberta. *Can. J. Zool.* 29, 153-160.

Zar, J.H., 2010. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 944p.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No início deste trabalho, devido as suas características morfológicas, acreditava-se que os dois morfotipos de *Hyalella* encontrados em simpatria travavam-se de espécies ainda não descritas pela ciência. Entretanto, com a realização das análises moleculares, foi constatado que apenas um dos morfotipos tratava-se de uma nova espécie, e o outro morfotipo foi identificado como *H. gauchensis*, espécie esta, já descrita anteriormente por Streck et al. (2017).

Os resultados obtidos por estas análises nos levam a ressaltar a importância da utilização de dados moleculares para elucidar a real diversidade das espécies do gênero *Hyalabella*, tendo em vista que suas características morfológicas parecem sofrer alterações consideráveis de acordo com o ambiente onde se encontram. Por outro lado, este tipo de análise poderia ser fundamental para o reconhecimento de espécies crípticas de *Hyalabella*, pois embora esta característica ainda não tenha sido constatada para o gênero no Brasil, a descrição de espécies crípticas para a América do Norte aponta para uma grande possibilidade de ocorrência desta característica nos ambientes dulcícolas brasileiros.

Na análise referente ao status taxonômico de *Hyalabella* sp. nov., foram constatadas diversas características morfológicas que evidenciam que o morfotipo se trata de uma espécie ainda não descrita pela ciência. Dentre as características encontradas, destaca-se o tamanho do segundo par de antenas, que possuindo de 19 a 20 artículos atinge um comprimento que abrange mais da metade de seu tamanho corpóreo total. Esta característica é pouco comum nas espécies encontradas no Brasil, que geralmente possuem antenas menores e com menos artículos.

Outra característica marcante é a ausência da seta curva no ramo interno do urópodo 1 dos machos, sendo que *Hyalabella* sp. nov. é o primeiro morfotipo registrado no estado do Rio Grande do Sul apresentando este atributo até o presente momento.

Cabe salientar que a presença de um número elevado de setas cuspidadas encontradas no ramo do urópodo 3 em *Hyalabella* sp. nov. (10 setas) é pouco comum em espécies ocorrentes no país, carácter este, encontrado com semelhança apenas em *H. imbya* no estado do Rio Grande do Sul e em *H. xakriaba* ocorrente no estado de Minas Gerais.

Em relação ao segundo par de gnatópodos, *Hyalabella* sp. nov. apresenta uma evidente cavidade triangular entre a palma do própodo e o dactilus quando o mesmo se encontra fechado. Dentre as espécies com registro de ocorrência no Brasil esta característica é semelhante a *H. pampeana*, *H. minensis* e *H. longistila*, porém o formato do própodo de *Hyalabella* sp. nov. é alongado, característica compartilhada apenas com *H. pampeana* e *H. longistila*, espécies registradas para o Brasil.

Vale ressaltar que além das diferenças morfológicas, *Hyalabella* sp. nov. apresentou altas divergências genéticas dos genes COI e 16S quando comparada com algumas espécies encontradas na região noroeste do estado do Rio Grande do sul. As divergências

encontradas foram sempre superiores a 19% para o gene COI e 29% para o gene 16s. Em relação a espécie *H. gauchensis*, encontrada em simpatria com *Hyaella* sp. nov. na localidade deste estudo, a distância genética foi de 21% para o gene COI e 31% para o gene 16S, o que demonstra um alto grau de diferenciação entre as espécies.

Durante todos os meses de coleta realizadas para a avaliação e comparação da biologia populacional, ambas as espécies analisadas neste estudo se demonstraram presentes, onde *H. gauchensis* apresentou frequência superior em todos os meses de amostragem, sendo 22,7 vezes mais frequente que *Hyaella* sp. nov. no total.

Em relação a distribuição de frequência em classes de tamanho de comprimento do cefalotórax total e sazonal, tanto *H. gauchensis* quanto *Hyaella* sp. nov. apresentaram distribuição predominantemente bimodal, apresentando machos, fêmeas, fêmeas ovígeras e juvenis ao longo de todas as estações, demonstrando que suas populações apresentam dois grupos distintos cada, um de jovens e outros de adultos, com reprodução e recrutamento contínuo durante o ano.

Nas duas espécies, machos demonstraram maior frequência em classes de tamanho superiores, enquanto as fêmeas apresentaram maior frequência em classes de tamanho intermediárias, demonstrando que machos possuem um maior tamanho corporal quando comparados às fêmeas dentro das populações. Este fenômeno pode ocorrer devido à dificuldade das fêmeas de acompanharem o crescimento dos machos, pois as fêmeas necessitam investir um maior gasto energético para a produção e incubação de embriões. Por outro lado, machos maiores possuem mais chances de carregarem as fêmeas de menor tamanho com eficiência durante o período de pré-cópula, além da vantagem de resistência a aquisições da fêmea por outros machos.

A espécie *H. gauchensis* apresentou maior tamanho corporal em ambos os sexos (machos e fêmeas) quando comparado a *Hyaella* sp. nov., o que poderia ser vantajoso para *Hyaella* sp. nov., pois organismos de menor tamanho podem atingir a maturidade sexual em um intervalo menor de tempo, podendo assim se reproduzir mais cedo que indivíduos de maior tamanho.

A proporção sexual em ambas as populações foi sempre favorável as fêmeas no total e em todas as estações, exceto no verão em *Hyaella* sp. nov.. Esta característica pode estar ligada ao fato de que machos possuem mais atividade a procura de alimento e de fêmeas para o acasalamento, sendo assim, machos ficam mais expostos, pois além de

possuírem maior tamanho corporal em relação as fêmeas, o que os torna mais visíveis para os predadores, sua maior movimentação oportuniza para que os mesmos sejam identificados por predadores táteis. Assim poderia aumentar consideravelmente a taxa de mortalidade dos machos quando comparada às fêmeas.

Em análise sazonal, machos e fêmeas em comportamento pré-copulatório foram amostrados ao longo de todas as estações do ano em ambas as espécies de *Hyalella*. Entretanto *H. gauchensis* apresentou maior intensidade de casais no inverno enquanto *Hyalella* sp. nov. demonstrou maior intensidade de casais no outono. O aumento da intensidade reprodutiva em períodos mais frios poderia garantir um maior sucesso de sobrevivência das proles, pela provável menor frequência de predadores e menor competição por espaço ou alimento com indivíduos que habitam o mesmo ecossistema.

Fêmeas ovígeras de ambas as espécies de *Hyalella* (carregando ovos ou juvenis dentro do marsúpio) foram coletados ao longo de todo o ano, demonstrando flutuações de frequências ao longo dos meses observados. Ambas as espécies apresentaram dois picos de frequência de frequência, onde *H. gauchensis* demonstrou maior intensidade no inverno, seguido da primavera. Por outro lado, *Hyalella* sp. nov. apresentou maior intensidade reprodutiva no outono, seguido do inverno. Esta separação temporal poderia maximizar a taxa de sobrevivência dos juvenis, proporcionando menos competição intraespecífica entre as proles, o que poderia ser benéfico para as duas populações.

O recrutamento apresentou-se contínuo ao longo do ano para ambas as espécies de *Hyalella* que demonstraram a presença de juvenis durante todas as estações do ano, mas com dois diferentes picos de recrutamento: *H. gauchensis* teve maior frequência no inverno, seguido da primavera, enquanto *Hyalella* sp. nov. apresentou maior frequência no outono seguido do inverno.

De forma geral, com as análises realizadas neste estudo, foi observado que a população de *H. gauchensis* parece estar bem estabelecida na nascente, com altas taxas reprodutivas e aparente estabilidade populacional. No entanto, *Hyalella* sp. nov. demonstrou uma baixa densidade populacional quando comparada a *H. gauchensis*, o que poderia ser um indicativo de que a espécie possa estar em processo de estabelecimento de sua população neste local. Por outro lado, *Hyalella* sp. nov. pode estar sendo excluída por competição interespecífica ou por suscetibilidade a predação. Porém, as diferentes estratégias reprodutivas observadas entre as duas espécies apontam para diferentes

adaptações evolutivas para que as populações possam coexistir. Contudo, para elucidar esta questão, considera-se necessário que estudos futuros mais aprofundados sejam realizados com *Hyalella* sp. nov., para que haja uma maior compreensão de suas características populacionais e de sua interação com o ambiente.

A caracterização da biologia populacional destas duas populações, fornece subsídios para uma melhor compreensão sobre o modo de vida e as diferentes estratégias adaptativas utilizadas para a coexistência das espécies de *Hyalella* que vivem em simpatria. Em complemento, com a descrição de uma nova espécie até então desconhecida pela ciência, este trabalho contribuiu para aumentar o real conhecimento sobre o gênero *Hyalella* no continente Americano. Além disso, este registro proporciona um melhor entendimento sobre a biodiversidade no Brasil, e principalmente da fauna bentônica de ambientes dulcícolas no estado do Rio Grande do Sul.

<i>H. georginae</i>	Southern Brazil (Palmeira das Missões/RS)	1 <i>H. georginae</i> _1 2 <i>H. georginae</i> _2	27°57'54.3"S/53° 14'03.09"W	-/- -/-
<i>H. palmeirensis</i>	Southern Brazil (Palmeira das Missões/RS)	1 <i>H. palmeirensis</i> _1 2 <i>H. palmeirensis</i> _2 3 <i>H. palmeirensis</i> _3	27°56'56.80"S/53° 3°19'37.3"W	-/- -/- -/-
<i>H. azteca</i>	EUA (-)	1 <i>H. azteca</i>	-	DQ464623.1

