

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

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA INTRAESPECÍFICA DE
DUAS ESPÉCIES DE *AEGLA* (CRUSTACEA:
DECAPODA: ANOMURA) COM AMPLA
DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Amanda Bohrz Marchiori

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA INTRAESPECÍFICA DE DUAS
ESPÉCIES DE *AEGLA* (CRUSTACEA: DECAPODA:
ANOMURA) COM AMPLA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA**

Amanda Bohrz Marchiori

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

Orientador: Dr. Sandro Santos

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bohrz Marchiori, Amanda
Análise morfométrica intraespecífica de duas espécies de Aegla (Crustacea: Decapoda: Anomura) com ampla distribuição geográfica / Amanda Bohr Marchiori.-2014.
60 f.; 30cm

Orientador: Sandro Santos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2014

1. Formato corporal 2. Morfometria geométrica 3. Populações alopátricas 4. Variação intraespecífica I. Santos, Sandro II. Título.

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

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA INTRAESPECÍFICA DE DUAS
ESPÉCIES DE *Aegla* (CRUSTACEA: DECAPODA: ANOMURA) COM
AMPLA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA**

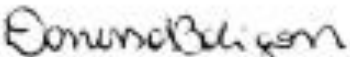
elaborada por
Amanda Bohr Marchiori

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas – Área de Biodiversidade Animal

COMISSÃO EXAMNADORA:


Sandro Santos, Dr.
(Presidente/Orientador)


André Trevisan, Dr. (UNESPAR)


Danessa Schardong Boligon, Dra. (Pós-Doc URI – Campus Erechim)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2014.

*Aos meus pais, Jane e Beto,
os melhores mestres que eu poderia ter.*

AGRADECIMENTOS

À UFSM pela estrutura física utilizada para a realização deste trabalho e à CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, à coordenadora Dra. Sonia Cechin e demais professores, por seu empenho na busca de melhorias para o Programa.

Ao professor Dr. Sandro Santos pelo tempo dedicado à minha orientação. Agradeço pela oportunidade de ser sua orientada, pela confiança e por acreditar na minha capacidade. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos e por ser um exemplo tanto como orientador, quanto como pessoa.

À professora Dra. Marlise Ladvoat Bartholomei-Santos e ao professor Dr. Rodrigo Fornel pelos ensinamentos, comentários e sugestões que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. André Trevisan, à professora Dra. Danessa Schardong Boligon e à professora Dra. Daniela da Silva Castiglioni por aceitarem participar da Comissão Examinadora desta dissertação.

Ao pessoal do laboratório: Joele, Beto, Marcelo, Alexandre, Cristiane, Gláucia, Diogo, Juliana, Aimée, Marcelo II, Cristina e Eduardo. Obrigada por proporcionarem o melhor ambiente de trabalho possível! Foram mais de cinco anos de convivência regados a muito café. Vocês me mostraram que ciência e amizade podem andar juntas e que tudo funciona melhor quando estamos dispostos a ajudar nossos colegas. Obrigada por compartilharem comigo as alegrias e angústias que fazem parte da pós-graduação. Não posso deixar de agradecer pelos ensinamentos para a vida, como “nunca deixe a bola quicando” e “não importa se uma piada é boa ou ruim, ela merece ser feita”. Vocês fizeram minha graduação e meu mestrado muito mais felizes!

Obrigada à Jô por tudo o que me ensinou desde a graduação, será sempre minha co-orientadora preferida! Ao Marcelo (“*poke*”) pela amizade, pela ajuda quase milagrosa nas coletas, pelos livros emprestados (“Longos dias e belas noites”), pela parceria para um xis do Paulo Lanches e para o DCE, e pelas “nonices”. Ao Beto pela imensa paciência na ajuda com

os mapas. À Cris, Gláucia e Ju pelas risadas e pelas conversas nem sempre sérias, mas sempre proveitosas (ainda mais no restaurante japonês).

Às minhas amigas Laura e Thessa pelas conversas e pela compreensão que só tantos anos de amizade podem trazer.

Ao Warner pelo amor, carinho, amizade, apoio e compreensão. Obrigada por me fazer feliz e por estar comigo em todos os momentos, me ajudando a trocar a ansiedade por sorrisos.

Ao meu irmão Mateus, meus avós, tios e primos que torceram por mim. À Mel, que também é parte da família, por seu amor incondicional e pela felicidade que transmite a quem ama.

Aos meus pais, Jane e Beto, por serem os maiores exemplos de dedicação e integridade que eu poderia ter. Obrigada pela compreensão e paciência comigo, pelos conselhos e incentivos, por apoiarem minhas decisões e por fazerem tudo para me ver feliz. Meu amor por vocês é infinito e todas as minhas conquistas são dedicadas a vocês.

*“Há um prazer nos bosques virgens;
Um êxtase na costa solitária;
Uma sociedade onde ninguém penetra.
Pelo mar profundo, e a música em seu rugido:
Amo não menos o Homem, apenas mais a Natureza.”*

- George Gordon Byron

RESUMO

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

ANÁLISE MORFOMÉTRICA INTRAESPECÍFICA DE DUAS ESPÉCIES DE *AEGLA* (CRUSTACEA: DECAPODA: ANOMURA) COM AMPLA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

AUTORA: AMANDA BOHRZ MARCHIORI

ORIENTADOR: DR. SANDRO SANTOS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2014.

Crustáceos do gênero *Aegla* ocorrem em águas continentais, no sul da América do Sul. O gênero é composto por mais de 70 espécies, caracterizadas em sua maioria por possuírem distribuições restritas. Ao contrário deste padrão, as espécies *Aegla longirostri* e *Aegla platensis* possuem distribuições geográficas amplas. Além disso, ambas as espécies formam agrupamentos não-monofiléticos, o que pode indicar que esses agrupamentos são formados por espécies crípticas. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar populações de *A. longirostri* e *A. platensis* através de técnicas de morfometria geométrica, visando esclarecer suas relações intraespecíficas. Para *A. longirostri*, foram analisados 120 indivíduos provenientes de seis populações, totalizando 20 animais de cada população. Para *A. platensis*, foram analisados 110 indivíduos provenientes de 11 populações (quatro argentinas e sete brasileiras), totalizando 10 animais de cada população. Para ambas as espécies, os animais foram fotografados em vista dorsal e foram selecionados 19 marcos anatômicos localizados na carapaça. Ambos os lados da carapaça foram simetrizados e as coordenadas dos marcos anatômicos foram sobrepostas. Variações no tamanho do centroide foram testadas através de análise de variância (ANOVA) de um critério e teste de Tukey. Para *A. longirostri*, também foi utilizada ANOVA de Procrustes. Variações na forma da carapaça foram exploradas através de análise de componentes principais (PCA), e posteriormente através de análise linear discriminante (LDA) e análise de variáveis canônicas (CVA), com base nos 8 primeiros componentes principais. Foi calculada a distância de Mahalanobis entre as populações. Variações na forma da carapaça foram testadas através de análise de variância multivariada (MANOVA) e MANOVAs par a par seguidas por correção de Bonferroni. Para *A. longirostri*, CV1 e CV2 corresponderam a 46,5% e 23,1% da variação, respectivamente. A população mais distante geograficamente apresentou os maiores valores de distância de Mahalanobis. As MANOVAs par a par demonstraram que todas as populações de *A. longirostri* diferem significativamente na forma da carapaça. Para *A. platensis*, CV1 e CV2 corresponderam a 28,5% e 22,2% da variação, respectivamente. Houve uma separação entre as populações argentinas e brasileiras, com valores de distância de Mahalanobis maiores entre as populações dos dois países. As MANOVAs par a par demonstraram que todas as populações de *A. platensis* diferem significativamente na forma da carapaça, com exceção de um par de populações argentinas e um par de populações brasileiras. Algumas características dos eglídeos indicam que esses animais possuem baixo potencial de dispersão, portanto, a distância geográfica pode ter levado à interrupção do fluxo gênico entre as populações. Somada à ausência de monofilia, a diferença intraespecífica na forma da carapaça em *A. longirostri* e *A. platensis* pode ser um indício de que populações de ambas as espécies estão fragmentadas.

Palavras-chave: Formato corporal. Morfometria geométrica. Populações alopátricas. Variação intraespecífica.

ABSTRACT

Mastership Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal
Universidade Federal de Santa Maria

INTRASPECIFIC MORPHOMETRIC ANALYSIS OF TWO WIDELY DISTRIBUTED SPECIES OF *AEGLA* (CRUSTACEA: DECAPODA: ANOMURA)

AUTHOR: AMANDA BOHRZ MARCHIORI

ADVISOR: DR. SANDRO SANTOS

Date and Place of the Defense: Santa Maria, February 27th 2014.

Crustaceans of the genus *Aegla* occur in continental waters, in southern South America. The genus is composed by more than 70 species, most of them characterized by having restricted distributions. Unlike this pattern, the species *Aegla longirostri* and *Aegla platensis* have wide geographic distributions. Moreover, both species form non-monophyletic groups, which may indicate that these groups are formed by cryptic species. Therefore, the objective of this study was to analyze populations of *A. longirostri* and *A. platensis* through a geometric morphometric approach, in order to clarify their intraspecific relationships. For *A. longirostri*, we analyzed 120 individuals from 6 populations, totalizing 20 animals per population. For *A. platensis*, we analyzed 110 individuals from 11 populations (four Argentinean and seven Brazilian), totalizing 10 animals per population. For both species, the animals were photographed in dorsal view, and 19 landmarks were defined on the carapace. Both sides of the carapace were symmetrized, and the landmarks coordinates were superimposed. Variations in centroid size were tested with an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. For *A. longirostri*, we also used a Procrustes ANOVA. Variations in carapace shape were explored through a principal component analysis (PCA), and afterwards through a linear discriminant analysis (LDA) and a canonical variate analysis (CVA), based on the first 8 principal components. The Mahalanobis distances between the populations were calculated. For statistical test of carapace shape differences, we used multivariate analysis of variance (MANOVA), and for pairwise comparisons among populations we used Bonferroni corrections for adjust of *p*-value after multiple MANOVAs. For *A. longirostri*, CV1 and CV2 represented 46.5% and 23.1% of the variation, respectively. The most geographically distant population showed the highest values of Mahalanobis distance. The pairwise comparisons showed that all populations of *A. longirostri* differ significantly in carapace shape. For *A. platensis*, CV1 and CV2 represented 28.5% and 22.2% of the variation, respectively. There was a separation between Argentinean and Brazilian populations, with high values of Mahalanobis distances between populations from both countries. The pairwise comparisons showed that all populations of *A. platensis* differ significantly in carapace shape, with the exception of a pair of Argentinean populations and a pair of Brazilian populations. Some characteristics of the aeglids indicate that these animals may have low dispersal potential, thus the geographic distance may have led to an interruption of the gene flow between populations. Added to the non-monophyletic grouping, the intraspecific difference in carapace shape in *A. longirostri* and *A. platensis* could be an evidence that populations of both species are fragmented.

Keywords: Allopatric populations. Body shape. Geometric morphometrics. Intraspecific variation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 01: Intraspecific variation in *Aegla longirostri* (Crustacea: Decapoda: Anomura) revealed by geometric morphometrics: evidence of an ongoing speciation process

Figura 01 – Sampling locations of *Aegla longirostri* in Rio Grande do Sul State, Brazil. DC=Divisa Creek, FC=Felisberto and Caemborá streams; IM=Ibicuí-Mirim River; JR=Jacuí River; MR=Michelon River; VM=Vacacaí-Mirim tributary.....30

Figura 02 – Position of the landmarks on the dorsal view of the carapace in *Aegla longirostri*. 1. tip of the rostrum; 2-3. tip of the orbital spine; 4-5. tip of the anterolateral spine; 6-7. tip of the first hepatic lobe; 8-9. tip of the epibranchial tooth; 10-11. superior inflection of the cervical groove; 12-13. base of the cervical groove; 14-15. branchial interception of the *linea aeglica lateralis*; 16-17. posterior vertex of the areola; 18-19. distal end of the branchial area. Adapted from Bond-Buckup & Buckup (1994).....30

Figura 03 – Carapace centroid size variation in *Aegla longirostri* populations. Different letters indicate significant difference in Tukey's test. Circles are outliers. DC=Divisa Creek; FC=Felisberto and Caemborá streams; IM=Ibicuí-Mirim River; JR=Jacuí River; MR=Michelon River; VM=Vacacaí-Mirim tributary.....31

Figura 04 – A. Scatter plot of first versus second canonical variate axes (CV1 and CV2) for populations of *Aegla longirostri*; B. CV1; C. CV2. Solid lines indicate positive scores and dashed lines indicate negative scores. FC=Felisberto and Caemborá streams; IM=Ibicuí-Mirim River; MR=Michelon River; JR=Jacuí River; VM=Vacacaí-Mirim tributary; DC=Divisa Creek.....32

Artigo 02: Variação no formato da carapaça em populações alopátricas de *Aegla platensis* (Crustacea: Decapoda: Anomura)

Figura 01 – Localização de procedência dos exemplares de *Aegla platensis* utilizados na análise morfométrica. rn = Río Noque (26°47'12''S; 65°23'20''W); le = La Encrucijada (27°10'00''S; 65°14'60''W); rm = Río Marapa (27°40'43''S;

65°16'54''W); aea = Arroyo El Arrozal (27°34'14''S; 56°43'28''W); iq = Rio Icamaquãzinho (28°46'35''S; 54°55'47''W); tq = Rio Taquarembó (28°52'31''S; 54°56'23''W); cu = Rio Curuçu (29°13'20''S; 54°51'55''W); rv = Rio da Várzea (27°25'28''S; 53°24'41''W); ra = Rio Alegre (28°11'16''S; 53°25'54''W); pa = Rio Palmeira (28°13'46''S; 53°28'18''W); pt = Rio Potiribu (28°33'29''S; 53°36'36''W).....47

Figura 02 – Localização dos 19 marcos anatômicos (*landmarks*) sobre a vista dorsal da carapaça de *Aegla platensis*. 1. extremidade do rostro; 2-3. extremidade do espinho orbital; 4-5. extremidade do espinho anterolateral; 6-7. extremidade do primeiro lobo hepático; 8-9. extremidade do espinho epibrânquial; 10-11. inflexão superior do sulco cervical; 12-13. base do sulco cervical; 14-15. intersecção branquial da *linea aeglica lateralis*; 16-17. vértice posterior da aréola; 18-19. extremidade distal da área branquial. Adaptado de Bond-Buckup & Buckup (1994).....48

Figura 03 – Boxplot do tamanho do centroide da carapaça entre populações de *Aegla platensis*. Círculos indicam outliers. Letras diferentes sobre as caixas indicam diferença significativa no Teste de Tukey. rn = Río Noque; rm = Río Marapa; le = La Encrucijada; aea = Arroyo El Arrozal; tq = Rio Taquarembó; iq = Rio Icamaquãzinho; cu = Rio Curuçu; pt = Rio Potiribu; pa = Rio Palmeira; ra = Rio Alegre; rv = Rio da Várzea.....49

Figura 04 – Análise de variáveis canônicas entre populações de *Aegla platensis* (A); Variações na forma da carapaça para CV1 (B) e CV2 (C). Linhas sólidas representam valores positivos e linhas pontilhadas representam valores negativos. aea = Arroyo El Arrozal; cu = Rio Curuçu; iq = Rio Icamaquãzinho; le = La Encrucijada; pa = Rio Palmeira; pt = Rio Potiribu; ra = Rio Alegre; rm = Río Marapa; rn = Río Noque; rv = Rio da Várzea; tq = Rio Taquarembó.....50

Figura 05 – Fenograma baseado na distância de Mahalanobis para a forma da carapaça entre populações de *Aegla platensis* (A); Valor da distância de Mahalanobis entre populações (B). rn = Río Noque; rm = Río Marapa; le = La Encrucijada; aea = Arroyo El Arrozal; tq = Rio Taquarembó; iq = Rio Icamaquãzinho; cu = Rio Curuçu; pt = Rio Potiribu; pa = Rio Palmeira; ra = Rio Alegre; rv = Rio da Várzea.....51

LISTA DE TABELAS

Artigo 01: Intraspecific variation in *Aegla longirostri* (Crustacea: Decapoda: Anomura) revealed by geometric morphometrics: evidence of an ongoing speciation process

Tabela 01 – Results of the Procrustes ANOVA for populations of *Aegla longirostri*, with Individual as random effect, and Population as additional main effect. SS=sum of squares; MS=mean squares; df=degrees of freedom.....33

Tabela 02 – Percentage of correct classification from linear discriminant analysis for the carapace shape of *Aegla longirostri* populations. FC=Felisberto and Caemborá streams; IM=Ibicuí-Mirim River; MR=Michelon River; JR=Jacuí River; VM=Vacacaí-Mirim tributary; DC=Divisa Creek.....33

Tabela 03 – Mahalanobis distances for carapace shape between populations of *Aegla longirostri*. FC=Felisberto and Caemborá streams; IM=Ibicuí-Mirim River; MR=Michelon River; JR=Jacuí River; VM=Vacacaí-Mirim tributary; DC=Divisa Creek.....33

Artigo 02: Variação no formato da carapaça em populações alopátricas de *Aegla platensis* (Crustacea: Decapoda: Anomura)

Tabela 01 – Porcentagem de classificação correta das populações de *Aegla platensis* na análise linear discriminante da forma da carapaça. aea = Arroyo El Arrozal; cu = Rio Curuçu; iq = Rio Icamaquãzinho; le = La Encrucijada; pa = Rio Palmeira; pt = Rio Potiribu; ra = Rio Alegre; rm = Río Marapa; rn = Río Noque; rv = Rio da Várzea; tq = Rio Taquarembó.....51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 Quantificação do formato corporal.....	14
1.2 Família Aeglidae	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
ARTIGO 01	25
Intraspecific variation in <i>Aegla longirostri</i> (Crustacea: Decapoda: Anomura) revealed by geometric morphometrics: evidence of an ongoing speciation process	25
ABSTRACT.....	25
INTRODUCTION	25
MATERIAL AND METHODS	27
Study organism.....	27
Data collection	28
Statistical Analysis.....	29
RESULTS	31
DISCUSSION	34
ACKNOWLEDGEMENTS	36
REFERENCES.....	36
ARTIGO 02	42
Variação no formato da carapaça em populações alopátricas de <i>Aegla platensis</i> (Crustacea: Decapoda: Anomura)	42
RESUMO	42
ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS	46
RESULTADOS	48
DISCUSSÃO.....	51
AGRADECIMENTOS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
4 CONCLUSÃO GERAL	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Quantificação do formato corporal

A descrição e comparação de características anatômicas de organismos são elementos centrais da Biologia e exercem papel fundamental na classificação taxonômica e no entendimento da diversidade biológica (ADAMS et al., 2004). A morfometria é uma técnica utilizada para comparar características anatômicas, consistindo de métodos para análise e descrição das variações de formatos corporais em organismos (ROHLF e MARCUS, 1993; ZELDITCH et al., 2004). Durante muito tempo, o termo “morfometria” foi utilizado indiscriminadamente para qualquer tipo de análise quantitativa de variações morfológicas encontradas nos organismos (MONTEIRO e REIS, 1999). Porém, essas variações podem ser originadas por diferentes mecanismos, como doenças, crescimento, efeitos genéticos e ambientais, de modo que o objetivo da morfometria não se limita à quantificação, mas também consiste em investigar as causas e efeitos do surgimento de diferentes formatos corporais (BOOKSTEIN, 1991; ROHLF e MARCUS, 1993; ZELDITCH et al., 2004).

Atualmente, existem duas abordagens diferentes para o estudo de formatos corporais: a morfometria tradicional e a morfometria geométrica. A morfometria tradicional utiliza um conjunto de variáveis que consiste de medidas corporais em um organismo, como alturas, larguras e ângulos. Nessa metodologia, a forma geralmente é analisada em função do tamanho corporal, através de análises de alometria, ou o tamanho dos organismos é padronizado para o estudo isolado da forma. Porém, esses dados não incorporam informações sobre a relação original entre as coordenadas corporais estudadas, gerando a perda de informações biológicas. Além disso, seus resultados serem expressos somente numérica ou graficamente, não sendo possível realizar reconstruções de forma (ROHLF e MARCUS, 1993; ADAMS, 2004).

A morfometria geométrica foi criada nos anos 80 e 90. Nesse período, Fred L. Bookstein propôs um método baseado na geometria de uma configuração de marcos anatômicos, em um espaço multivariado. Posteriormente, F. James Rohlf desenvolveu uma série de programas computacionais para a realização de análises geométricas, o que facilitou a popularização da técnica (BOOKSTEIN, 1991, ROHLF e MARCUS, 1993; MONTEIRO e REIS, 1999). A morfometria geométrica utiliza duas fontes de informação: localização

geométrica e homologia biológica (BOOKSTEIN, 1982). Sua prática consiste na extração de informação a partir da geometria da forma biológica para propósitos comparativos, e suas questões são examinadas através de análises multivariadas (BOOKSTEIN, 1982; KLINGENBERG, 2010). As análises focam na variação de formatos a partir de coordenadas cartesianas de marcos anatômicos (*landmarks*), que são pontos marcados em estruturas corporais homólogas identificáveis entre indivíduos e espécies, possivelmente ligadas através de vias evolutivas (BOOKSTEIN, 1991; KINGENBERG, 2010; ADAMS et al., 2013).

As análises são realizadas a partir de um espaço multidimensional, no qual o formato dos organismos é representado pelos *landmarks* em um plano cartesiano, e as distâncias entre *landmarks* correspondem a similaridades morfológicas (ADAMS et al., 2004; KLINGENBERG, 2010). As coordenadas cartesianas da configuração de *landmarks* são as variáveis utilizadas nas análises geométricas, de maneira que a forma das estruturas estudadas é preservada durante as análises, permitindo que os resultados sejam visualizados e interpretados anatomicamente (ADAMS, 1999; ADAMS et al., 2004; KLINGENBERG, 2010). Assim, é possível manter uma relação com a forma biológica original e reconstruir visualmente as variações inferidas estatisticamente, o que permite a análise direta dos padrões de mudanças de formato nos dados (ROHLF e MARCUS, 1993; DEBAT et al., 2003, ZELDITCH et al., 2004).

Na morfometria geométrica, o formato de um objeto é definido por sua forma e tamanho, sendo que o termo “forma” é utilizado para denotar as propriedades geométricas do objeto que não se alteram por efeitos de tamanho, posição e orientação. Porém, as configurações de *landmarks* também compreendem informações sobre posição e orientação do objeto, portanto, para que apenas a forma de uma estrutura seja comparada, as informações excedentes devem ser retiradas (MITTEROECKER et al., 2013). Métodos de sobreposição permitem que fatores independentes da forma sejam eliminados das configurações de *landmarks*, através de alguns critérios de otimização (ROHLF e SLICE, 1990; ADAMS, 2004). Assim, as variáveis forma e tamanho são analisadas separadamente de fatores que poderiam gerar tendências errôneas (ROHLF e MARCUS, 1993; ADAMS et al., 2013). A possibilidade de extrair as diferentes variáveis de um formato está entre as maiores vantagens da morfometria geométrica (ZELDITCH et al., 2004).

A sobreposição de um organismo sobre outro corresponde ao ajuste de tamanho do centroide (raiz quadrada da soma das distâncias ao quadrado entre cada *landmark* – média de

todas as coordenadas) e ao alinhamento do conjunto de *landmarks*, através de transladação, proporcionalização e rotação (ROHLF e SLICE, 1990; BOOKSTEIN, 1991; MITTEROECKER e GUNZ, 2009). Assim, a posição dos pontos homólogos passa a ser correspondente entre os organismos e as diferenças de forma são mostradas através da diferença de posição entre *landmarks* correspondentes (ROHLF e SLICE, 1990; BOOKSTEIN, 1991; ADAMS et al., 2004; MITTEROECKER e GUNZ, 2009). Quando as configurações de *landmarks* estão centradas em um ponto comum, as coordenadas resultantes desse processo localizam-se em um ponto no espaço de forma de Kendall. Nesse espaço, as distâncias são geodésicas, e não lineares ou euclidianas, sendo que a distância entre dois pontos corresponde à distância entre duas formas e torna possível sua quantificação (MONTEIRO e REIS, 1999; ADAMS et al., 2013).

Devido às suas propriedades, a morfometria geométrica é uma ferramenta que oferece grande precisão, sendo capaz de detectar variações morfométricas tanto no nível interespecífico, quanto no nível intraespecífico.

1.2 Família Aeglidae

A família Aeglidae é endêmica do sul da América do Sul e ocorre desde a Ilha Duque de York, no Chile, até o município de Claraval, no Estado de Minas Gerais, Brasil (BOND-BUCKUP, 2003; BUENO et al., 2007; OYANEDEL et al., 2011). O grupo tem origem marinha e é composto por duas espécies fósseis e um gênero atual: *Aegla* Leach, 1820. Ambas as espécies fósseis foram encontradas em rochas marinhas e são as únicas registradas fora da América do Sul, sendo *Haumuriaegla glaessneri* Feldmann, 1984 oriunda da Nova Zelândia e *Protaegla minúscula* Feldmann et al., 1998 oriunda do México (BOND-BUCKUP, 2003). A descoberta das espécies fósseis, combinada com dados filogenéticos, confirma a hipótese de que os eglídeos invadiram o continente a partir do Oceano Pacífico, o que ocorreu há cerca de 74 milhões de anos (PÉREZ-LOSADA et al., 2004).

Atualmente, o gênero *Aegla* é constituído por mais de 70 espécies (SANTOS et al., 2013). Eglídeos são os únicos anomuros que habitam exclusivamente águas continentais, ocorrendo em rios, riachos, lagos e cavernas (BOND-BUCKUP, 2003). São encontrados apenas em águas limpas e bem oxigenadas, o que está relacionado à sua alta taxa metabólica e

consequente necessidade de altos níveis de oxigênio dissolvido no ambiente (BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1994; DALOSTO e SANTOS, 2011). Devido a essa condição, eglídeos são ameaçados por atividades antrópicas e pela crescente degradação dos ambientes de água doce. Dentre as principais ameaças, as práticas de silvicultura, suinocultura e o uso de agrotóxicos são predominantes no sul do Brasil (BOND-BUCKUP et al. 2008).

No ambiente natural, eglídeos buscam preferencialmente habitats com a presença de rochas. A presença de matéria orgânica particulada grossa e fragmentos de folhas em decomposição também influencia a distribuição desses animais, que podem utilizar o material vegetal disponível como fonte de alimento, o que sugere sua participação no processamento de material alóctone nos corpos d'água onde vivem (SANTOS et al., 2008; BÜCKER et al. 2008; COGO e SANTOS, 2013). Além de consumir material vegetal, eglídeos também predam larvas de insetos e outros animais, e fazem parte da dieta de anfíbios, peixes, aves e mamíferos (ARENAS, 1974; CASTRO-SOUZA e BOND-BUCKUP, 2004; COLPO et al., 2012; CASSINI et al., 2009).

Até recentemente, os eglídeos foram classificados como representantes da superfamília Galatheoidea Samouelle, 1819. Porém, apesar da semelhança superficial entre os dois grupos, eglídeos possuem uma série de características morfológicas exclusivas, que foram propostas por Martin e Abele (1988) como evidências para a retirada de Aeglidae da superfamília Galatheoidea. Dentre elas, estão a estrutura branquial do tipo tricobrânquia, que não ocorre em Galatheoidea; a ausência de apêndices abdominais nos machos; uma série de suturas na carapaça, que diferem daquelas presentes em Galatheoidea; e a morfologia diferenciada de espermatozoides, que não se assemelha às morfologias já descritas para Galatheoidea (MARTIN e ABELE, 1988; TUDGE e SCHELTINGA, 2002). Além disso, eglídeos apresentam desenvolvimento direto, sem estágios larvais, o que resulta de uma adaptação ao ambiente de água doce e também os difere de Galatheoidea (BOND-BUCKUP et al., 1996).

Dados moleculares também suportaram fortemente a retirada de Aeglidae da superfamília Galatheoidea. Pérez-Losada et al. (2002) constataram que Galatheoidea apresentava-se como um clado parafilético quando analisada juntamente com Aeglidae. A análise separada dos dois clados confirmou a origem monofilética de Galatheoidea e a independência de Aeglidae, sugerindo que Aeglidae poderia representar uma superfamília distinta (PÉREZ-LOSADA et al., 2002; AHYONG e O'MEALLY, 2004). Dessa maneira,

após uma nova filogenia baseada em dados morfológicos, a família Aeglidae foi classificada em uma superfamília própria, denominada Aegloidea (MCLAUGHLIN et al. 2007; 2010).

Embora a monofilia de Aeglidae seja comprovada, as relações filogenéticas entre suas espécies ainda não são totalmente esclarecidas. Pérez-Losada et al. (2004) realizaram uma análise filogenética envolvendo 64 espécies de *Aegla*, com o objetivo de elucidar aspectos como a origem, biogeografia, taxonomia e sistemática do grupo. Dentre as espécies analisadas, os autores constataram que *Aegla cholchol* Jara & Palacios, 1999, *Aegla franciscana* Buckup & Rossi, 1977, *Aegla jarai* Bond-Buckup & Buckup, 1994, *Aegla marginata* Bond-Buckup & Buckup, 1994, *Aegla parana* Schmitt, 1942 e *Aegla platensis* Schmitt, 1942 formam grupos não-monofiléticos, enquanto *Aegla longirostri* Bond-Buckup & Buckup, 1994 foi constatada como não-monofilética em uma das análises. Posteriormente, Bartholomei-Santos et al. (2011) realizaram análises moleculares em quatro populações de *A. longirostri* e foi encontrada alta diferenciação genética entre tais populações, embora não houvesse nenhuma característica morfológica divergente entre seus indivíduos.

Segundo o conceito filogenético, uma espécie pode ser definida como o menor agrupamento diagnosticável de organismos dentro do qual existe um padrão de ancestralidade (CRACRAFT, 1983). Portanto, uma espécie cujos grupos populacionais não são monofiléticos pode representar um complexo de espécies crípticas. Espécies crípticas são espécies distintas, classificadas como uma única espécie devido à sua similaridade morfológica (PFENNINGER e SCHWENK, 2007). A ausência de monofilia encontrada em espécies de Aeglidae pode ser um indício de especiação críptica no grupo.

Além da ausência de monofilia, algumas características dos eglídeos podem indicar que populações descontínuas, separadas por grandes distâncias, podem estar atualmente isoladas. Sua capacidade de dispersão não é conhecida, porém seu pequeno tamanho corporal e sua vulnerabilidade a variações ambientais podem ser empecilhos para a migração entre populações. Sabe-se que esses animais possuem alta capacidade de movimentação nos riachos onde ocorrem, mas essa capacidade não está necessariamente relacionada à dispersão ou migração (AYRES-PERES et al., 2011). A ausência de estágios larvais durante o desenvolvimento também é um fator que possivelmente restringe o alcance dos eglídeos, já que as larvas poderiam ser carregadas passivamente pela água. O desenvolvimento direto, onde eglídeos juvenis eclodem semelhantes aos adultos e se mantêm associados à mãe por

alguns dias, pode limitar sua mobilidade nas fases iniciais do desenvolvimento e afetar sua capacidade de dispersão (LÓPEZ-GRECO et al., 2004).

Embora a família Aeglidae seja amplamente distribuída no sul da América do Sul, a maioria das espécies possui distribuições bastante restritas. Em alguns casos extremos, a ocorrência da espécie é restrita à sua localidade-tipo (BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1994; SANTOS et al., 2010). Por outro lado, duas das espécies constatadas como grupos não-monofiléticos por Pérez-Losada et al. (2004) chamam a atenção por possuírem distribuições bastante amplas. *Aegla longirostri* ocorre nas regiões nordeste, centro e leste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Aegla platensis* ocorre em regiões do Paraguai, Uruguai, Argentina e sul do Brasil (BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1994). Além disso, ambas as espécies ocorrem em sub-bacias hidrográficas diferentes.

Dado que as distribuições de *A. longirostri* e *A. platensis* são bastante amplas, é possível que suas populações estejam atualmente isoladas. A ausência de monofilia para as duas espécies pode ser um indício do isolamento, e aponta para uma possível especiação críptica dentro do grupo. Esses fatores criam um quadro cuja investigação é necessária para um melhor esclarecimento da sistemática de *Aegla*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Testar se populações alopátricas de *Aegla longirostri* e *Aegla platensis* diferem morfometricamente no formato da carapaça.

2.2 Objetivos Específicos

- Testar se existe diferença no tamanho e na forma da carapaça entre populações de *A. longirostri*;
- Testar se existe diferença no tamanho e na forma da carapaça entre populações de *A. platensis*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. C. Methods for shape analysis of landmark data from articulated structures. **Evolutionary Ecology Research**. 1: 959-970. 1999.

ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. **Italian Journal of Zoology**. 28: 5-16. 2004.

ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. **Hystrix**. 24(1): 7-14. 2013.

ARENAS, J. La cordillera de la costa como refugio de la fauna dulcícola preglacial. **Archivos de Biología y Medicina Experimentales**. 10: 1-40. 1974.

AHYONG, S. T.; O'MEALLY, D. Phylogeny of the Decapoda Reptantia: Resolution using three molecular loci and morphology. **The Raffles Bulletin of Zoology**. 52(2): 673-693. 2004.

AYRES-PERES, L. et al. Radio-telemetry techniques in the study of displacement of freshwater anomurans. **Nauplius**. 19(1):41-54. 2011.

BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L.; RORATTO, P. A.; SANTOS, S. High genetic differentiation of *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura) populations in southern Brazil revealed by multi-loci microsatellite analysis. **Genetic and Molecular Research**. 10: 4133-4146. 2011.

BOND-BUCKUP, G. **Família Aeglidae**. In: G. A. S. Melo (ed.), Manual de Identificação dos Crustáceos Decapoda de água doce do Brasil. 21-116. Editora Loyola: São Paulo, 2003.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**. 32(4): 159-346. 1994.

BOND-BUCKUP, G.; BUENO, A. A. P.; KEUNECKE, K. A. Primeiro estágio juvenil de *Aegla prado* Schmitt (Crustacea, Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. 13(4): 1049-1061. 1996.

BOND-BUCKUP, G. et al. Global diversity of crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in freshwater. **Hydrobiologia**. 595: 267-273. 2008.

BOOKSTEIN, F. L. Foundations of Morphometrics. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 13: 451-470. 1982.

BOOKSTEIN, F. L. **Morphometric tools for landmarks data**. Cambridge University Press: Cambridge, 1991.

BÜCKER, F. et al. Effect of environmental variables on the distribution of two freshwater crabs (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**. 28 (2): 248-251. 2008.

BUCKUP, L.; ROSSI, A. O gênero *Aegla* no Rio Grande do Sul, Brasil (Crustacea, Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Revista Brasileira de Biologia**. 37: 879-892. 1977.

- BUENO, S. L. S.; SHIMIZU, R. M.; ROCHA S. S. Estimating the population size of *Aegla franca* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) by mark-recapture technique from an isolated section of Barro Preto stream, county of Claraval, state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Journal of Crustacean Biology**. 27(4): 553-559, 2007.
- CASSINI, M. H. et al. Scale-dependent analysis of an otter-crustacean system in Argentinian Patagonia. **Naturwissenschaften**. 96: 593-599. 2009.
- CASTRO-SOUZA, T.; BOND-BUCKUP, G. O nicho trófico de duas espécies simpátricas de *Aegla* Leach (Crustacea, Aeglidae) no tributário da bacia hidrográfica do Rio Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. 21(4): 805-813. 2004
- COGO, G. B.; SANTOS, S. The role of aeglids in shredding organic matter in neotropical streams. **Journal of Crustacean Biology**. 33: 519-526. 2013.
- COLPO, K. D. et al. Feeding preference of the South American endemic anomuran *Aegla platensis* (Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Naturwissenschaften**. 99: 333-336. 2012.
- CRACRAFT, J. Species concepts and speciation analysis. **Current Ornithology**. 1: 159-187. 1983.
- DALOSTO, M.; SANTOS, S. Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. 160: 461-466. 2011.
- DEBAT, V. et al. Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. **Evolution**. 57(12): 2773-2784. 2003.
- FELDMANN, R. M. *Haumuriaegla glaessneri* n. gen. and sp. (Decapoda; Anomura; Aeglidae) from Haumurian (Late Cretaceous) rocks near Cheviot, New Zealand. **New Zealand Journal of Geology and Geophysics**. 27: 379-385. 1984.
- FELDMANN, R. M. et al. Early Cretaceous arthropods from the Tlayúa formation at Tepexi de Rodríguez, Puebla, México. **Journal of Paleontology**. 72(1):79-90. 1998.
- JARA, C. G., PALACIOS, V. L. Two new species of *Aegla* Leach (Crustacea: Decapoda: Anomura: Aeglidae) from southern Chile. **Proceedings of the Biological Society of Washington**. 112: 106-119. 1999.
- KLINGENBERG, C. P. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. **Nature Reviews**. 11: 623-635. 2010.
- LÓPEZ-GRECO, L. S. et al. Juvenile hatching and maternal care in *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**. 24(2): 309-313. 2004.
- MARTIN, J. W.; ABELE, L. G. **External morphology of the genus *Aegla* (Crustacea, Anomura, Aeglidae)**. Smithsonian Institution Press: Washington, 1988.
- MCLAUGHLIN, P. A.; LAMAITRE, R.; CRANDALL, K. A. Annotated checklist of anomuran decapod crustaceans of the world (exclusive of the Kiwaoidea and families

Chirostylidae and Galatheidae of the Galatheoidea) Part III – Aegloidea. **The Raffles Bulletin of Zoology**. 23: 131-137. 2010.

MCLAUGHLIN, P. A.; LAMAITRE, R.; SORHANNUS, U. Hermit crab phylogeny: a reappraisal and its “fall-out”. **Journal of Crustacean Biology**. 27(1): 97-115. 2007.

MITTEROECKER, P.; GUNZ, P. Advances in Geometric Morphometrics. **Evolutionary Biology**. 36: 235-247. 2009.

MITTEROECKER, P. et al. A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. **Hystrix online first**. 2013.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Holos Editora: Ribeirão Preto, 1999.

OYANEDEL, A. et al. The southernmost freshwater anomurans of the world: geographic distribution and new records of Patagonian aeglids (Decapoda: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**. 31(3): 396-400. 2011.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Phylogenetics relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) freshwater crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**. 22(2): 304-313. 2002.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Molecular systematics of Southern South American freshwater “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. **Systematic Biology**. 53(5): 767-780. 2004.

PFENNINGER, M.; SCHWENK, K. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC Evolutionary Biology**. 7: 1-6. 2007.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A Revolution in Morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution**. 8(4): 129-132. 1993.

ROHLF, F. J.; SLICE, D. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. **Systematic Zoology**. 39(1): 40-59. 1990.

SANTOS, S. et al. Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). **Journal of Natural History**. 42: 1027-1037. 2008.

SANTOS, S. et al. New records and description of a new species of Aeglidae (Crustacea: Anomura) from river basins in Southern Brazil. **Nauplius**. 18: 79-86. 2010.

SANTOS, S. et al. New species and records of the genus *Aegla* Leach, 1820 (Crustacea, Anomura, Aeglidae) from the West-Central region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Nauplius**. 21(2): 211-223. 2013.

SCHMITT, W. The species of *Aegla*, endemic South American fresh-water crustaceans. **Proceedings of the United States National Museum**. 91: 431-520. 1942.

TUDGE, C. C.; SCHELTINGA, D. M. Spermatozoal morphology of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* Bond-Buckup & Buckup, 1994 (Crustacea, Decapoda, Aeglidae) from South America. **Proceedings of the Biological Society of Washington**. 115(1): 118-128. 2002.

ZELDITCH, M. L. et al. **Geometric morphometrics for biologists: a primer**. Elsevier Academic Press: New York, 2004.

ARTIGO 01

Intraspecific variation in *Aegla longirostri* (Crustacea: Decapoda: Anomura) revealed by geometric morphometrics: evidence of an ongoing speciation process

Amanda B. Marchiori¹; Marlise L. Bartholomei-Santos¹ & Sandro Santos¹

¹ – Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Este artigo está aceito para publicação na revista Biological Journal of the Linnean Society. Portanto, o artigo segue as normas da revista.

ABSTRACT

Genetic divergences among populations of *Aegla longirostri* suggest that this group may be formed by cryptic species. In this study, we analyzed the carapace shape of six populations of *A. longirostri* from southern Brazil, using a geometric morphometric approach, in order to better elucidate the species' systematics. Our results were congruent with the genetic data, meaning that genetically differentiated populations were also morphogeometrically differentiated. The geometric morphometric descriptors showed significant differences in carapace shape among all populations. Geographical distance and isolation may be affecting the gene flow between populations, and leading to divergence in both genetic and morphometric traits. Our data indicate the possible existence of cryptic species within *A. longirostri*, or an incomplete process of speciation. Geometric morphometric methods were efficient in differentiating among populations that do not show divergence in diagnostic characters.

Keywords: Aeglidae – allopatric populations – body shape – cryptic species

INTRODUCTION

Biodiversity consists in the variability among living organisms from all ecological systems of which they are a part, including the diversity within species, between species, and of ecosystems (Bisby, 1995). However, assigning organisms to a particular species is not an easy task because of the occurrence of cryptic species, which show only limited discriminating morphological or genetic characteristics (Daniels *et al.*, 2003; Bickford *et al.*, 2007). The lack of phenotypic divergence between populations may indicate that a species is

stable, or that an underlying process is concealing the expression of morphological traits, or even that the difference between populations is subtle and requires careful diagnosis (Martin & Bermingham, 2000).

Crustaceans of the superfamily Aegloidea Dana, 1852 occur in southern South America. The group is of marine origin, and they are the only anomurans that inhabit continental waters (Bond-Buckup & Buckup, 1994). Molecular data indicate that the invasion of freshwater environments occurred from the Pacific Ocean, during the uplift of the early Andes, in periods of marine transgressions (Pérez-Losada *et al.*, 2004). It is estimated that this process occurred 74 Myr ago, i.e., the aeglids are a relatively recent group (Pérez-Losada *et al.*, 2004). Since then, these decapods have diversified into more than 70 species belonging to a single genus, *Aegla* Leach, 1820, which occurs in watersheds in Brazil, Argentina, Chile, Uruguay, Paraguay and Bolivia (Santos *et al.*, 2009; Bond-Buckup *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012). Their diagnostic characters are very discrete, with emphasis on a set of carapace sutures that are exclusive to the aeglids (Martin & Abele, 1988; Bond-Buckup & Buckup, 1994).

Although aeglids occur in all the main rivers of southern South America, the majority of *Aegla* species have very narrow distributions. This factor, combined with the ongoing rapid degradation of freshwater environments, makes them a group of significant conservation concern (Bond-Buckup *et al.*, 2008). In Brazil, which harbors the richest diversity of aeglids, these animals are threatened by forestry practices, pesticide use, and pig farms, particularly in the southernmost region (Bond-Buckup *et al.*, 2008).

In a broad study, Pérez-Losada *et al.* (2004) made a phylogenetic analysis involving 64 species of *Aegla*, in order to elucidate aspects like the group's origin, biogeography, taxonomy and systematics. The authors observed that six species formed non-monophyletic groups: *A. cholchol* Jara & Palacios, 1999, *A. franciscana* Buckup & Rossi, 1977, *A. jarai* Bond-Buckup & Buckup, 1994, *A. marginata* Bond-Buckup & Buckup, 1994, *A. parana* Schmitt, 1942 and *A. platensis* Schmitt, 1942. Beyond these species, *A. longirostri* Bond-Buckup & Buckup, 1994 was also shown to be a paraphyletic group. Based on the concept that populations whose groups are not monophyletic qualify as different species (Cracraft, 1983), this may indicate that these taxa are composed of cryptic species.

Afterwards, Bartholomei-Santos *et al.* (2011) investigated the genetic structure of four populations of *A. longirostri* in the Rio Grande do Sul state, Brazil. One of these populations was located in a different basin, being geographically isolated from the others. They found high levels of genetic differentiation among the analyzed populations, and most of them

showed very low gene flow estimate, especially the isolated population. This differentiation was found in the absence of divergent taxonomic characters, which reinforces the hypothesis that this group is formed by cryptic species.

The identification and description of cryptic species has great taxonomic importance, and also contributes to biodiversity conservation (Bickford *et al.*, 2007). When divergent taxonomic characters are absent, the identification can be made through geometric morphometric techniques, which allow the direct quantification and analysis of biological forms (Rohlf & Marcus, 1993; Adams *et al.*, 2004). This methodology has been used to investigate ecological and evolutionary questions, including inter- and intraspecific relationships (Adams & Rohlf, 2000; Hopkins & Thurman, 2010; Worthington *et al.*, 2012; Angielczyk & Feldman, 2013; Milankov *et al.*, 2013). Geometric morphometry is also reliable for evaluating morphological variation in apparently identical characters, and is consequently useful in discriminating cryptic species (Adams & Funk, 1997; Alibert *et al.*, 2001, Villemant *et al.*, 2007; Tofilski, 2008). The genus *Aegla* is a good model for the application of this methodology, as the group shows a relatively conserved morphology (Hepp *et al.*, 2012).

The description of patterns of variation in genetic and morphological characters within and among populations is fundamental for defining boundaries of independent evolutionary units in nature (Fernandes *et al.*, 2009). Considering the high genetic differentiation previously found between *A. longirostri* populations (Bartholomei-Santos *et al.*, 2011), and the possible existence of cryptic species within this group, our objective was to analyze *A. longirostri* populations using a geometric morphometric approach, to better elucidate the group's systematics using complementary methods to genetics.

MATERIAL AND METHODS

Study organism

Aegla longirostri occurs in northeastern, central and eastern of the Rio Grande do Sul State, Brazil, i. e., a relatively wide distribution for the genus. These animals are found in water bodies during all year, and have two reproductive periods (summer and winter), when there are peaks in the proportion of ovigerous females and earlier juveniles in the population (Colpo *et al.*, 2005). As an adaptation to the freshwater environment, aeglids have direct development, without larval phases after hatching, and live approximately two years and half (Bond-Buckup *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 2011). These animals are usually found hidden

under stones, in well-oxygenated water bodies, and the presence of coarse particulate organic matter and fragmented leaves also contributes to the occurrence of *Aegla* (Bücker *et al.*, 2008; Dalosto & Santos, 2011). Individuals of *A. longirostri* can use the leaves available in the stream for consumption, suggesting their participation on the processing of allochthonous plant material, and also feed on larvae and adults of insects and other animals (Santos *et al.*, 2008; Cogo & Santos, 2013).

Data collection

We analyzed six *A. longirostri* populations, from the following locations: Ibicuí-Mirim River (29°24'19''S; 53°46'46''W), Jacuí River (29°04'41''S; 53°10'15''W), Michelon River (29°29'08''S; 53°34'13''W), Divisa Creek (29°39'07''S; 53°31'13''W), a tributary of the Vacacaí-Mirim River (29°40'13''S; 53°45'44''W), and Felisberto and Caemborá streams (29°26'34''S; 53°20'15''W and 29°26'35''S; 53°18'57''W, respectively) (Fig. 1). These populations were the same as those analyzed by Bartholomei-Santos *et al.* (2011), except the Jacuí River and Felisberto/Caemborá streams. All individuals of *A. longirostri* were identified using the diagnostic characters for the species, as described by Bond-Buckup & Buckup (1994).

We analyzed 20 animals from each location. All animals had a carapace length larger than 14 mm, which is the approximate size above which aeglids are considered adults (Colpo *et al.*, 2005). All the specimens used on the study were obtained from the scientific collection of the Carcinology Laboratory of the Universidade Federal de Santa Maria, or were collected using traps or through manual searching in the aforementioned water bodies.

The aeglids were photographed in dorsal view with a Sony HDR-CX560 digital camera with 12.3 megapixels of resolution, positioned 8 cm above the photographic plane. We defined 19 two-dimensional landmarks for the carapace (Fig. 2), using the software tpsDig2 (Rohlf, 2010). As the carapace has an internal plane of symmetry, we symmetrized both sides of the landmarks, based on the object symmetry approach following Klingenberg *et al.* (2002). Object symmetry is a form of bilateral symmetry in which a structure is inherently symmetrical. In addition to the shapes of parts on the left and right sides, studies of object symmetry also analyze variation of structural features in the median plane, and the way the two halves of the body are connected (Klingenberg *et al.*, 2002).

The landmark coordinates were superimposed using a Generalized Procrustes Analysis. This procedure standardizes the size and removes variation sources from the

landmark configurations resulting from different positioning of the specimens during the process of data collection, such as position and rotation (Rohlf & Slice, 1990; Bookstein, 1991; Cordeiro-Estrela *et al.*, 2006). After the superimposition, the shape differences are shown by the difference in the coordinates of corresponding landmarks between objects (Rohlf & Slice, 1990; Bookstein, 1991; Adams *et al.*, 2004; Mitteroecker & Gunz, 2009).

Statistical Analysis

For the analysis of centroid size and shape variables, and to assess the amount of measurement error, we performed a Procrustes ANOVA, following Viscosi & Cardini (2011). We considered the following factors: Individual, which estimates the overall variation in the dataset; Side, which estimates the effects related to directional asymmetry (changes in symmetry with respect to consensus); and Individual*Side interaction, which estimates fluctuating asymmetry (differences between left and right sides in bilateral traits). Population was considered as additional main effect.

Variation in centroid size between populations was tested with an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. For shape, a principal components analysis (PCA) was carried out to determine the explanation percentage of each principal component (PC) of the total variation. The PCs of the covariance matrix of residuals from superimposition were used as new shape variables, to reduce the dimensionality of the data set, as well as to work on independent variables. Shape differences were explored through a linear discriminant analysis (LDA), calculated on a subset of 8 PCs to compute leave-one-out cross-validation for calculate percentages of correct classification for the six populations.

Shape variations of the six populations were explored through a canonical variate analysis (CVA) and the Mahalanobis distances between the populations were calculated. For statistical test of carapace shape differences, we used multivariate analysis of variance (MANOVA) on shape variables. For pairwise comparisons among populations, we used Bonferroni correction for adjust p-value after multiple MANOVAs. We used the softwares MorphoJ, Version 1.05c (Klingenberg, 2011), the R language and environment for statistical computing, Version 2.15.0 (R Development Core Team, 2012), and the Rmorph package (Baylac, 2008) for the statistical analysis.

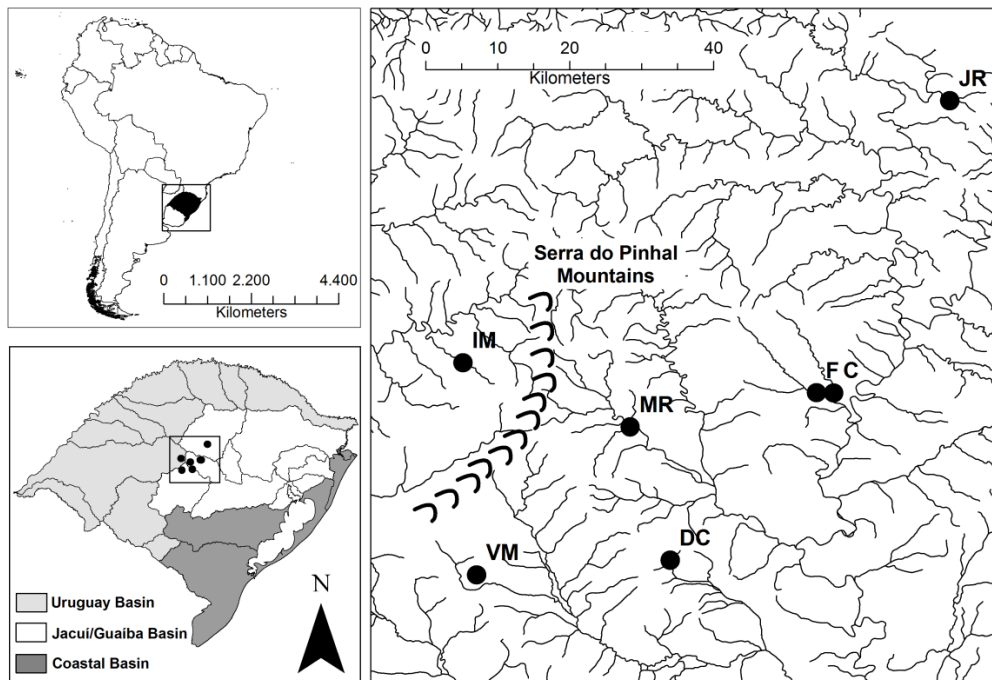


Fig. 1: Sampling locations of *Aegla longirostri* in Rio Grande do Sul State, Brazil. DC=Divisa Creek, FC=Felisberto and Caemborá streams; IM=Ibicuí-Mirim River; JR=Jacuí River; MR=Michelon River; VM=Vacacaí-Mirim tributary.

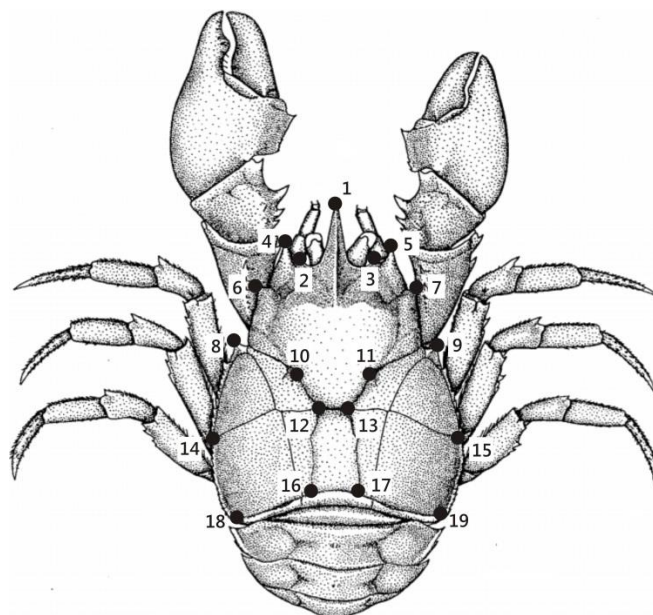


Fig. 2: Position of the landmarks on the dorsal view of the carapace in *Aegla longirostri*. 1. tip of the rostrum; 2-3. tip of the orbital spine; 4-5. tip of the anterolateral spine; 6-7. tip of the first hepatic lobe; 8-9. tip of the epibranchial tooth; 10-11. superior inflection of the cervical groove; 12-13. base of the cervical groove; 14-15. branchial interception of the *linea aeglica lateralis*; 16-17. posterior vertex of the areola; 18-19. distal end of the branchial area. Adapted from Bond-Buckup & Buckup (1994).

RESULTS

The Procrustes ANOVA showed that the populations differ significantly in carapace shape and centroid size ($P < 0.0001$) (Table 1). The error measurement did not exceed the values of the other factors. Centroid size differences between populations are shown in Fig. 3. For shape, pairwise comparisons showed that all populations differed significantly. The CVA showed that CV1 and CV2 represent 46.5% and 23.1% of the variation, respectively (Fig. 4). CV1 corresponded to rostrum length, with populations located on the positive quadrants showing a longer rostrum; CV2 corresponded to the width of the posterior region of the carapace, with populations located on the positive quadrants showing a narrower posterior region (Fig. 4). The Jacuí River population did not overlap with the other populations. The populations from Vacacaí-Mirim tributary and Divisa Creek, Michelon River and Felisberto/Caemborá streams formed two groups of populations, while the Ibicuí-Mirim River population was located between these groups. Table 2 shows the percentage of correct classification of the populations in the LDA. The populations from Divisa Creek and Vacacaí-Mirim tributary showed the lowest value of Mahalanobis distance (Table 3).

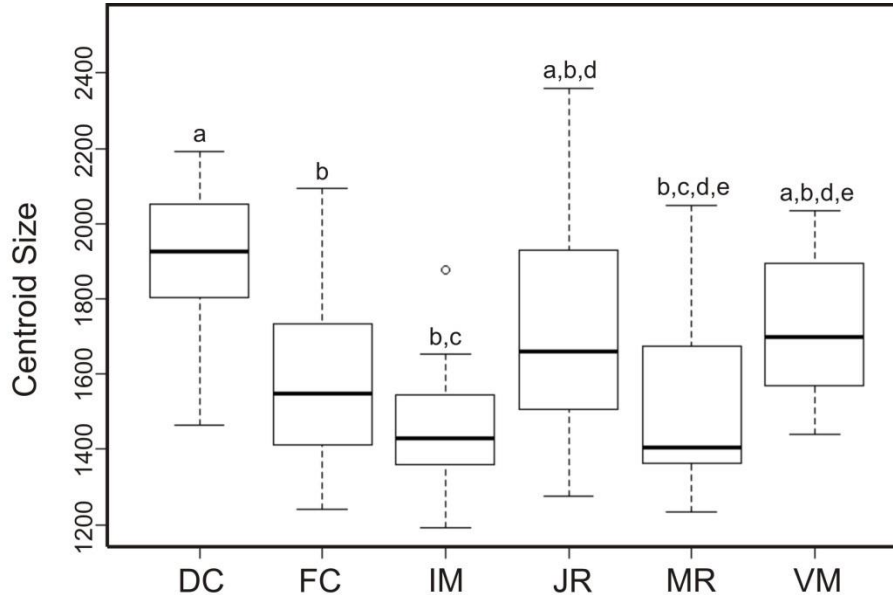


Fig. 3: Carapace centroid size variation in *Aegla longirostri* populations. Different letters indicate significant difference in Tukey's test. Circles are outliers. DC=Divisa Creek; FC=Felisberto and Caemborá streams; IM=Ibicuí-Mirim River; JR=Jacuí River; MR=Michelon River; VM=Vacacaí-Mirim tributary.

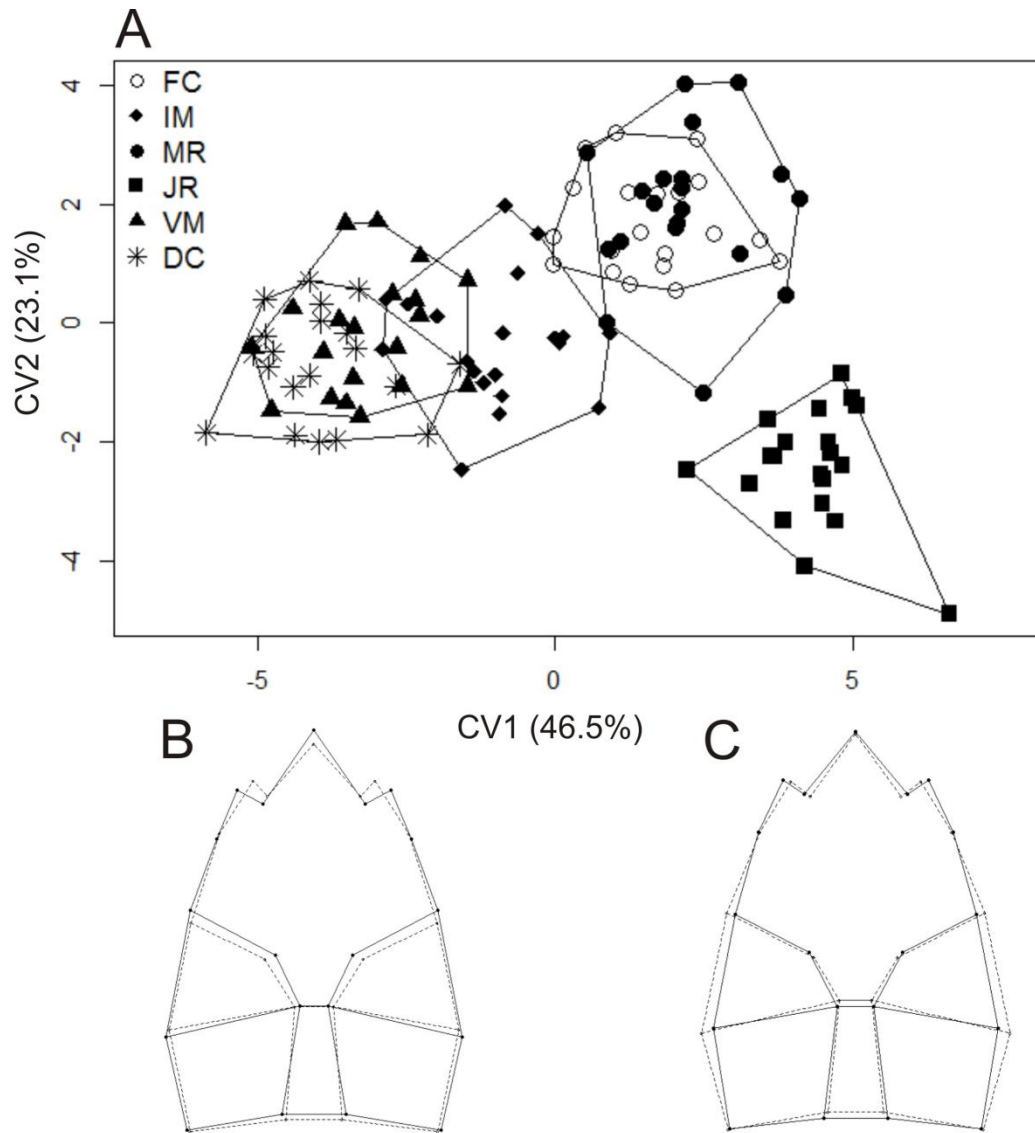


Fig. 4: A. Scatter plot of first versus second canonical variate axes (CV1 and CV2) for populations of *Aegla longirostri*; B. CV1; C. CV2. Solid lines indicate positive scores and dashed lines indicate negative scores. FC=Felisberto and Caemborá streams; IM=Ibicuí-Mirim River; MR=Michelon River; JR=Jacuí River; VM=Vacacaí-Mirim tributary; DC=Divisa Creek.

Table 1: Results of the Procrustes ANOVA for populations of *Aegla longirostri*, with Individual as random effect, and Population as additional main effect. SS=sum of squares; MS=mean squares; df=degrees of freedom.

Centroid Size					
Effect	SS	MS	Df	F	P
Population	5027092.857	1005418.571	1	9.55	<0.0001
Individual	12005293,846	105309.595	114	20935.56	<0.0001
Error Measurement	603.621	5.030	120	--	--
Shape					
Effect	SSx1000	MSx1000	Df	F	P
Population	88.220	1.038	85	14.39	<0.0001
Individual	139.743	0.072	1938	5.76	<0.0001
Side	10.262	0.604	17	48.22	<0.0001
Individual*Side	25.326	0.012	2023	8.65	<0.0001
Error Measurement	5.901	0.001	4080	--	--

Table 2: Percentage of correct classification from linear discriminant analysis for the carapace shape of *Aegla longirostri* populations. FC=Felisberto and Caemborá streams; IM=Ibicuí-Mirim River; MR=Michelon River; JR=Jacuí River; VM=Vacacaí-Mirim tributary; DC=Divisa Creek.

	FC	IM	MR	JR	VM	DC	TOTAL
FC	17		3				85
IM		19			1		95
MR	4		15	1			75
JR				20			100
VM		2			14	4	70
DC					6	14	70

Table 3: Mahalanobis distances for carapace shape between populations of *Aegla longirostri*. FC=Felisberto and Caemborá streams; IM=Ibicuí-Mirim River; MR=Michelon River; JR=Jacuí River; VM=Vacacaí-Mirim tributary; DC=Divisa Creek.

	FC	IM	MR	JR	VM
IM	5.301				
MR	2.546	5.070			
JR	5.610	6.737	5.257		
VM	5.963	4.020	6.278	8.066	
DC	6.836	4.830	7.151	8.766	1.907

DISCUSSION

Many species of the genus *Aegla* have narrow distributions, but that of *A. longirostri* can be considered relatively wide, as it occurs in three regions of Rio Grande do Sul. The populations chosen for our study came from shallow water bodies characterized by rocky substrate and relatively well-conserved riparian vegetation, which are factors that favor the presence of *Aegla*. The environmental characteristics may affect the body shape of these animals, as they live in direct contact with the substrate, hiding under rocks, and are very dependent on the local habitat conditions.

The body shape of *A. plana* Buckup & Rossi, 1977 can be influenced by the presence of riparian vegetation and the substrate granulometry (Hepp *et al.*, 2012), while *A. neuquensis* Schmitt, 1942, which inhabits lakes and rivers, shows differences in the carapace shape due to the different hydrodynamics of these environments (Giri & Loy, 2008). Among the water bodies chosen for our study, the Jacuí River showed higher current speed, and was also previously impacted by pesticides. The aeglid population from this river was morphometrically different, showing no overlap with the other populations in the CVA (Fig. 4) and high Mahalanobis distances (Table 3). Therefore, the environmental characteristics of the Jacuí River, which differs from all other studied sites, may account for the local morphological divergence. In the case of *A. neuquensis*, individuals that inhabit lakes have a shorter and wider rostrum, while individuals that inhabit rivers have a more elongated and streamlined rostrum (Giri & Loy, 2008). This could be the case of the Jacuí River population, which showed a longer rostrum, and this character could represent a variation caused by the higher current speed. In turtles, terrestrial and aquatic individuals also show differences as a function of the kind of habitat, with aquatic individuals having elongated and shallower skull (Claude *et al.*, 2004).

The geographic distance may also have contributed to the differentiation in carapace shape of the population from the Jacuí River. Although this river belongs to the Jacuí/Guaíba Basin, it is farthest from the others (Fig. 1) and the differences in carapace shape could be related to geographic isolation, even if this isolation does not constitute a barrier for colonization by the species (Alibert *et al.*, 2001; Trevisan & Masunari, 2010; Hepp *et al.*, 2012). The population from Felisberto/Caemborá streams also showed morphometric differences, in spite of being closer to the others. No studies have investigated the dispersal potential of *Aegla*, but it is considered to be limited, as aeglids do not have larval phases and the juveniles remain living with the mother for some days after hatching (Martin & Abele,

1988; López-Greco *et al.*, 2004). Moreover, the movement capability of aeglids is relatively high, but is restricted to a particular area (Ayres-Peres *et al.*, 2011). These active movements may be related to strategies to avoid predators, and also to recolonization of different areas within the water bodies (Ayres-Peres *et al.*, 2011), but are not necessarily related to the dispersal potential, as our studies show wide differentiation between discontinuous populations (Bartholomei-Santos *et al.*, 2011).

The population from the Ibicuí-Mirim River shows the highest level of genetic differentiation compared to the other populations (Bartholomei-Santos *et al.*, 2011). This river belongs to a different watershed, the Uruguay Basin, while the other water bodies are part of the Jacuí/Guaíba Basin (Fig. 1). The headwaters of the Ibicuí-Mirim and Vacacaí-Mirim rivers are only 5 km distant from each other; however, they are isolated by the Serra do Pinhal mountains, which could be blocking gene flow between these populations, increasing genetic differentiation. Although the Ibicuí-Mirim River population did not show greater morphometric differentiation in comparison to the other populations of *A. longirostri* analyzed, the differences found were significant.

The morphometric data show some congruences with the genetic data from the four populations previously analyzed (Ibucuí-Mirim River, Michelon River, Divisa Creek and the Vacacaí-Mirim tributary) (Bartholomei-Santos *et al.*, 2011). The populations from Divisa Creek and Vacacaí-Mirim tributary showed morphometric similarity in our study, with lower distances, and were more closely grouped in the CVA. These populations are also the more closely related genetically and show the higher estimate of migrants per generation (Bartholomei-Santos *et al.*, 2011). These results reinforce the hypothesis that gene flow between individuals from these populations occurred in a relatively recent past (Bartholomei-Santos *et al.*, 2011). Populations from Ibicuí-Mirim and Michelon Rivers present the lowest level of gene flow (Bartholomei-Santos *et al.*, 2011), and were also morphometrically differentiated, although they were not the population pair with the highest Mahalanobis distance (Fig. 4, Table 3).

There is not necessarily a strict relationship between the genetic diversity and the morphological diversity that is observed by taxonomists (Bisby, 1995), and the patterns of genetic evolution may be variable even in closely related species (Tomanovic *et al.*, 2013). The geometric morphometric approach was efficient in pointing out variations between populations that do not diverge in diagnostic characters. Thus, similarly to the genetic data, the morphometric data also indicate a potential cryptic speciation, confirming that populations of *A. longirostri* show differences in both molecular and morphometric levels. Additional

analyses are needed to determine if *A. longirostri* is a group composed by cryptic species, due to the presence of molecular divergence and the lack of morphological divergence in diagnostic characters, or if the species is undergoing a speciation process that is in its initial stages.

De Queiroz (2007) stated that the definition of species includes a stage where a lineage is evolving separately, and this lineage can be represented by morphological, genetic or behavioral differences. As the species advances in the process, the easier the diagnosis becomes. Therefore, from this point of view, *A. longirostri* may be undergoing a speciation process that still has not completed all the stages necessary for full differentiation, but this difference already exists, regarding both the genetic structure and the geometric morphometrics. Our study provides information about an interesting question that merits further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. Michel Baylac for the Rmorph package. To Dr. Rodrigo Fornel, Dr. Pablo Agustin Collins, and two anonymous reviewers for their helpful comments. To Dr. Rodrigo Fornel for the help with the geometric morphometric techniques, to Alberto Senra Gonçalves for the help with figures, to Alexandre Varaschin Palaoro for the help with translations, and to our colleagues for the help with the fieldwork. They are also grateful to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the scholarship and the productivity grant to SS, and to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the master's degree scholarship to ABM.

REFERENCES

- Adams DC, Funk DJ. 1997.** Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles: multivariate applications of thin-plate spline. *Systematic Biology* **46**: 180-194.
- Adams DC, Rohlf FJ. 2000.** Ecological character displacement in *Plethodon*: Biomechanical differences found from a geometric morphometric study. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 4106-4111.
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. 2004.** Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* **71**: 5-16.

- Alibert P, Moureau B, Dommergues J-L, David B. 2001.** Differentiation at microgeographical scale within two species of ground beetle, *Cabarus auronitens* and *C. nemoralis* (Coleoptera, Carabidae): a geometrical morphometric approach. *Zoologica Scripta* **30**: 299-311.
- Angielczyk KD, Feldman CR. 2013.** Are diminutive turtles miniaturized? The ontogeny of plastron shape in emydine turtles. *Biological Journal of the Linnean Society* **108**: 727-755.
- Ayres-Peres L, Coutinho C, Baumart JS, Gonçalves AS, Araujo PB, Santos S. 2011.** Radio-telemetry techniques in the study of displacement of freshwater anomurans. *Nauplius* **19**: 41-54.
- Bartholomei-Santos ML, Roratto PA, Santos S. 2011.** High genetic differentiation of *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura) populations in southern Brazil revealed by multi-loci microsatellite analysis. *Genetic and Molecular Research* **10**: 4133-4146.
- Baylac M. 2008.** *Rmorph: a R geometric and multivariate morphometrics library*. Available from the author.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I. 2007.** Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 148-155.
- Bisby FA. 1995.** *Characterization of Biodiversity*. Global Biodiversity Assessment. United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya.
- Bond-Buckup G, Buckup L. 1994.** A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Arquivos de Zoologia* **32**: 159-346.
- Bond-Buckup G, Bueno AAP, Keunecke KA. 1996.** Primeiro estágio juvenil de *Aegla prado* Schmitt (Crustacea, Decapoda, Anomura, Aeglidae). *Revista Brasileira de Zoologia* **13**: 1049-1061.
- Bond-Buckup G, Jara CG, Buckup L, Pérez-Losada M, Bueno AAP, Crandall KA, Santos S. 2010.** New species and new records of endemic freshwater crabs from the Atlantic Forest in southern Brazil (Anomura: Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology* **30**: 495-502.

Bond-Buckup G, Jara CG, Pérez-Losada M, Buckup L, Crandall KA. 2008. Global diversity of crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia* **595**: 267-273.

Bookstein FL. 1991. *Morphometric tools for landmarks data*. Cambridge: Cambridge University Press.

Bücker F, Gonçalves R, Bond-Buckup G, Melo AS. 2008. Effect of environmental variables on the distribution of two freshwater crabs (Anomura: Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology* **28**: 248-251.

Buckup L, Rossi A. 1977. O gênero *Aegla* no Rio Grande do Sul, Brasil (Crustacea, Decapoda, Anomura, Aeglidae). *Revista Brasileira de Biologia* **37**: 879-892.

Claude J, Pritchard P, Tong H, Paradis E, Auffray J-C. 2004. Ecological correlates and evolutionary divergence in skull of turtles: a geometric morphometric assessment. *Systematic Biology* **53**: 933-948.

Cogo GB, Santos S. 2013. The role of aeglids in shredding organic matter in neotropical streams. *Journal of Crustacean Biology* **33**: 519-526.

Cohen FPA, Takano BF, Shimizu RM, Bueno SLS. 2011. Life cycle and population structure of *Aegla paulensis* (Decapoda: Anomura: Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology* **31**: 389-395.

Colpo KD, Oliveira LR, Santos S. 2005. Population biology of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Aeglidae) from South Brazilian Streams. *Journal of Crustacean Biology* **25**: 495-499.

Cordeiro-Estrela P, Baylac M, Denys C, Marinho-Filho J. 2006. Interspecific patterns of skull variation between sympatric Brazilian vesper mice: geometric morphometrics assessment. *Journal of Mammalogy* **87**: 1270-1279.

Cracraft J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* **1**: 159-187.

Dalosto M, Santos S. 2011. Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **160**: 461-466.

Daniels SR, Gouws G, Stewart BA, Coke M. 2003. Molecular and morphometric data demonstrate the presence of cryptic lineages among freshwater crabs (Decapoda: Potamonautidae: Potamonautes) from the Drakensberg Mountains, South Africa. *Biological Journal of the Linnean Society* **78**: 129-147.

De Queiroz K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* **56**: 879-886.

Fernandes FA, Fornel R, Cordeiro-Estrela P, Freitas TRO. 2009. Intra- and interspecific skull variation in two sister species of the subterranean rodent genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae): coupling geometric morphometrics and chromosomal polymorphism. *Zoological Journal of the Linnean Society* **155**: 220-237.

Giri F, Loy A. 2008. Size and shape variation of two freshwater crabs in Argentinean Patagonia: the influence of sexual dimorphism, habitats, and species interaction. *Journal of Crustacean Biology* **28**: 37-45.

Hepp LU, Fornel R, Restello RM, Trevisan A, Santos S. 2012. Intraspecific Morphological Variation in a Freshwater Crustacean *Aegla plana* in Southern Brazil: Effects of Geographical Isolation on Carapace Shape. *Journal of Crustacean Biology* **32**: 511-518.

Hopkins MJ, Thurman CL. 2010. The geographic structure of morphological variation in eight species of fiddler crabs (Ocypodidae: genus *Uca*) from the eastern United States and Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society* **100**: 248-270.

Jara CG, Palacios VL. 1999. Two new species of *Aegla* Leach (Crustacea: Decapoda: Anomura: Aeglidae) from southern Chile. *Proceedings of the Biological Society of Washington* **112**: 106-119.

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

Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A. 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* **56**: 1909-1920.

López-Greco LS, Viau V, Lavalpe M, Bond-Buckup G, Rodriguez EM. 2004. Juvenile hatching and maternal care in *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology* **24**: 309-313.

- Martin AP, Bermingham E. 2000.** Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical catfish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **267**: 1135-1141.
- Martin JW, Abele LG. 1988.** External morphology of the genus *Aegla* (Decapoda, Anomura, Aeglidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* **453**: iv+46 pp.
- Milankov V, Ludoski J, Francuski L, Stahls G, Vujic A. 2013.** Genetic and phenotypic diversity patterns in *Merodon albifrons* Meigen, 1822 (Diptera: Syrphidae): evidence of intraspecific spatial and temporal structuring. *Biological Journal of the Linnean Society* **110**: 257-280.
- Mitteroecker P, Gunz P. 2009.** Advances in Geometric Morphometrics. *Evolutionary Biology* **36**: 235-247.
- Pérez-Losada M, Bond-Buckup G, Jara CG, Crandall KA. 2004.** Molecular systematics of Southern South American freshwater “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. *Systematic Biology* **53**: 767-780.
- R Development Core Team. 2012.** *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rohlf FJ. 2010.** *TPSDig2*, version 2.16. Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Rohlf FJ, Marcus LF. 1993.** A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution* **8**: 129-132.
- Rohlf FJ, Slice D. 1990.** Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* **39**: 40-59.
- Santos S, Ayres-Peres L, Cardoso RCF, Sokolowicz CC. 2008.** Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). *Journal of Natural History* **42**: 1027-1037.
- Santos S, Bond-Buckup G, Buckup L, Pérez-Losada M, Finley M, Crandall KA. 2012.** Three new species of *Aegla* (Anomura) freshwater crabs from the upper Uruguay river hydrographic basin in Brazil. *Journal of Crustacean Biology* **32**: 529-540.

- Santos S, Bond-Buckup G, Pérez-Losada M, Bartholomei-Santos ML, Buckup L. 2009.** *Aegla manuinflata*, a new species of freshwater anomuran (Decapoda: Anomura: Aeglidae) from Brazil, determined by morphological and molecular characters. *Zootaxa* **2088**: 31-40.
- Schmitt W. 1942.** The species of *Aegla*, endemic South American fresh-water crustaceans. *Proceedings of the United States National Museum* **91**: 431-520.
- Tofilski A. 2008.** Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. *Apidologie* **39**: 558-563.
- Tomanovic Z, Kos K, Petrovic A, Stary P, Kavallieratos NG, Zikic V, Jakse J, Trdan S, Ivanovic A. 2013.** The relationship between molecular variation and variation in the wing shape of three aphid parasitoid species: *Aphidius uzbekistanicus* Luzhetzki, *Aphidius rhopalosiphi* De Stefani Perez and *Aphidius avenaphis* (Fitch) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Zoologischer Anzeiger* **252**: 41-47.
- Trevisan A, Masunari S. 2010.** Geographical distribution of *Aegla schmitti* Hobbs III, 1979 (Decapoda Anomura Aeglidae) and morphometric variations in male populations from Paraná State, Brazil. *Nauplius* **18**: 45-55.
- Villemant C, Simbolotti G, Kenis M. 2007.** Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometric analysis of wing venation. *Systematic Entomology* **32**: 625-634.
- Viscosi V, Cardini A. 2011.** Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PLoS ONE* **6**: e25630. doi:10.1371/journal.pone.0025630.
- Worthington AM, Berns CM, Swallow JG. 2012.** Size matters, but so does shape: quantifying complex shape changes in a sexually selected trait in stalked-eyed flies (Diptera: Diopsidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **106**: 104-113.

ARTIGO 02

Varição no formato da carapaça em populações alopátricas de *Aegla platensis* (Crustacea: Decapoda: Anomura)

Amanda B. Marchiori¹; Rodrigo Fornel² & Sandro Santos¹

¹ – Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

² – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

Aegla platensis é uma espécie de crustáceo de água doce que forma um grupo não-monofilético. Essa pode ser uma evidência de que *A. platensis* é formada por espécies crípticas. Nosso objetivo foi testar se populações alopátricas de *A. platensis* diferem no formato da carapaça, visando contribuir para o esclarecimento da sistemática da espécie. Técnicas de morfometria geométrica foram utilizadas para analisar 11 populações de *A. platensis*, quatro argentinas e sete brasileiras. Nossos resultados mostraram que todas as populações diferem significativamente na forma da carapaça, com exceção de duas populações argentinas e duas populações brasileiras. Populações argentinas e brasileiras formaram grupos distintos nas análises e populações de ambos os países foram separadas por altos valores de distância de Mahalanobis. Esse resultado sugere um isolamento reprodutivo entre as populações dos dois países. A distância de Mahalanobis foi menor entre as populações dos grupos. Populações alopátricas de *A. platensis* podem estar isoladas devido à dificuldade de migração, o que leva a uma interrupção no fluxo gênico e diferenciação na forma da carapaça.

Palavras-chave: Aeglidae. Espécies crípticas. Morfometria geométrica. Variação intraespecífica.

ABSTRACT

Aegla platensis is a freshwater crustacean species that forms a non-monophyletic group. This may be an evidence that *A. platensis* is formed by cryptic species. Our objective was to test if allopatric populations of *A. platensis* differ in carapace shape, aiming to clarify the species situation. We used a geometric morphometric approach to analyze the carapace shape of 11 populations of *A. platensis*, four from Argentina and seven from Brazil. Our results showed that all populations differ significantly in carapace shape, except two populations from Argentina and two from Brazil. Argentinian and Brazilian populations did not group together, and populations from both countries were separated by high values of Mahalanobis distance. This suggests reproductive isolation between populations from the two countries. Shape distances between populations in both groups were lower. Allopatric populations of *A. platensis* may be isolated from each other due to the difficulty for migration, leading to interruption of gene flow and differentiation in carapace shape.

Keywords: Aeglidae. Cryptic species. Geometric morphometrics. Intraspecific variation.

INTRODUÇÃO

A amplitude da distribuição geográfica de organismos é capaz de criar e estruturar variações intraespecíficas, sendo que espécies com distribuição ampla são mais suscetíveis a encontrar condições ambientais variadas, quando comparadas a espécies com distribuição restrita (ZELDITCH et al., 2004; HOPKINS e THURMAN, 2010). A área de ocorrência atual de uma espécie depende de quais barreiras seus indivíduos encontraram durante sua dispersão, sejam essas barreiras ecológicas ou geográficas. Esse fenômeno é bastante difícil de ser estimado, já que espécies são formadas em diferentes épocas e as barreiras não são necessariamente constantes, podendo aparecer e desaparecer ao longo do tempo (SLATKIN, 1987; SOBEL et al., 2009). No caso de barreiras geográficas, por exemplo, aquela que não restringiu a dispersão de uma espécie no passado, pode atualmente ser um obstáculo para a migração ou dispersão entre populações estabelecidas, levando ao surgimento de populações alopátricas (RIESEBERG e BURKE, 2001; TREVISAN e MASUNARI, 2010).

A alopatria pode gerar o isolamento de populações ou abrir espaço para que diferentes pressões ecológicas atuem sobre elas. No primeiro caso, o isolamento pode ser apenas resultado da baixa mobilidade dos indivíduos da espécie, não havendo necessariamente a

adaptação a diferentes nichos ecológicos (GITTENBERGER, 1991; KOZAK et al., 2006). No segundo caso, diferentes populações podem estar expostas a condições ambientais variadas, e fatores como disponibilidade de recursos, condições climáticas e presença de predadores acabam fazendo com que cada uma se adapte da melhor maneira possível ao local onde se encontra via pressão de seleção natural (SCHLUTER e MCPHAIL, 1993; LOSOS, 2010).

Em ambos os casos, a pressão seletiva uniforme ou diferenciada pode resultar na fixação de diferentes mutações gênicas em cada população, através de deriva genética ou da adaptação a condições locais, e levar à diferenciação genética (RIESEBERG e BURKE, 2001; NOSIL, 2008; SOBEL et al., 2009). As desvantagens em cruzamentos entre populações geneticamente diferenciadas, tais como infertilidade e esterilidade da prole, podem reforçar o isolamento entre as populações, levando indiretamente à diferenciação fenotípica (FORNEL et al., 2010). A presença de fluxo gênico resultante de migração e dispersão entre as populações seria um mecanismo capaz de evitar essa diferenciação, porém, a taxa de migração entre populações alopátricas pode ser muito baixa ou nula em condições atuais (RIESEBERG e BURKE, 2001; BARTHOLOMEI-SANTOS et al., 2011). A ausência de fluxo gênico combinada com a divergência genética pode levar ao isolamento reprodutivo, que é um passo fundamental para o surgimento de novas espécies (SCHEMSKE, 2000). Portanto, em longo prazo a alopatria pode levar a variação genética e fenotípica. Apesar destas variações, nem sempre elas são acompanhadas do surgimento de novos caracteres diagnósticos, dificultando a classificação de populações alopátricas em uma unidade de classificação discreta (DANIELS et al., 2003).

Classificar os organismos em espécies particulares é ainda mais complicado devido à ocorrência de espécies crípticas, as quais expressam diferenças morfológicas limitadas e acabam sendo classificadas em uma única espécie (DANIELS et al., 2003; BICKFORD et al., 2007; PFENNINGER e SCHWENK, 2007). O registro de espécies crípticas é importante para iniciativas de conservação e estimativas de biodiversidade, bem como para entender mecanismos de evolução biológica (SÁEZ e LOZANO, 2005).

Crustáceos da ordem Decapoda Latreille, 1803, como muitos outros grupos, são primariamente identificados a partir de caracteres morfológicos. Porém, espécies crípticas são amplamente difundidas neste grupo (KNOWLTON, 1986). Em lagostins, por exemplo, análises filogenéticas já revelaram grande diversidade molecular intraespecífica e linhagens não esperadas, caracterizando a presença de espécies crípticas (HARRIS e CRANDALL,

2000; BUHAY et al., 2007; APTE et al., 2007; MATHEWS et al., 2008). Entre os Decapoda, a superfamília Aegloidea Dana, 1852 ocorre no sul da região Neotropical e constitui o único grupo de anomuros exclusivos de águas continentais (BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1994). Esta superfamília abriga um único gênero atual, *Aegla* Leach, 1820, o qual é composto por mais de 70 espécies (SANTOS et al., 2013). Seus caracteres diagnósticos são discretos e sua morfologia é relativamente estável, incluindo uma série de suturas na carapaça que são exclusivas da superfamília (MARTIN e ABELE, 1988; BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1994).

Algumas espécies do gênero possuem alto grau de endemismo e distribuições bastante restritas, como *A. renana* Bond-Buckup & Santos, 2010, que possui área de ocupação de apenas 10 km² (SANTOS et al., 2010). Já outras espécies, como *A. longirostri* Bond-Buckup & Buckup, 1994 e *A. platensis* Schmitt, 1942 possuem distribuições bastante amplas (BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1994). *Aegla platensis*, em particular, é encontrada em regiões do Paraguai, Uruguai, Argentina e sul do Brasil (BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1994; MORRONE e LOPRETTO, 1994). Em um estudo de sistemática molecular e biogeografia, Pérez-Losada et al. (2004) verificaram que espécimes de *A. platensis*, coletados a partir de diferentes populações, apresentaram-se como grupos não-monofiléticos, indicando que esse grupo pode ser formado, na verdade, por um complexo de espécies. Uma maneira de avaliar a ocorrência de variação intraespecífica, além das técnicas moleculares, é por meio da morfometria geométrica. A morfometria geométrica é utilizada para descrever e testar a existência de variações de formatos corporais através de coordenadas de marcos anatômicos (*landmarks*), relacionando essas diferenças às suas possíveis causas (ROHLF e MARCUS, 1993; ADAMS et al., 2013). Sua utilização oferece uma perspectiva alternativa já que análises intraespecíficas foram realizadas apenas no nível molecular durante muito tempo (ADAMS e FUNK, 1997; ALIBERT et al., 2001).

Levando em conta a ampla distribuição de *A. platensis*, é possível que a taxa de migração entre as populações alopátricas estabelecidas seja muito baixa ou até mesmo nula. A ausência de monofilia no grupo pode ser um indício de que suas populações estão isoladas, portanto a presença de espécies crípticas é plausível. Em vista disso, nosso objetivo foi testar se populações alopátricas de *A. platensis* diferem morfometricamente no formato da carapaça, visando esclarecer a sistemática do grupo através de uma metodologia complementar à genética.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises morfométricas foram realizadas em um total de 11 populações de *A. platensis*, sendo quatro argentinas e sete brasileiras (Figura 1). As populações argentinas foram provenientes da coleção da Fundación Miguel Lillo, San Miguel de Tucumán, enquanto as populações brasileiras foram provenientes da coleção do Laboratório de Carcinologia da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Para as análises, foram utilizados dez animais adultos, com comprimento de carapaça >14 mm (COLPO et al., 2005). Machos e fêmeas foram analisados em conjunto em todas as populações, pois o objetivo do estudo não foi testar dimorfismo sexual.

Os animais foram fotografados em vista dorsal a uma altura de 8 cm do plano fotográfico, com câmera digital Sony DSC-W320 de resolução de 14.1 megapixels. Foram digitalizados 19 *landmarks* (Figura 2), utilizando o software tpsDig2 (ROHLF, 2010). Os *landmarks* foram simetrizados segundo a simetria de objeto, proposta por Klingenberg et al. (2002). Essa metodologia é aplicada para estruturas com simetria bilateral cuja forma é inerentemente simétrica. As coordenadas dos *landmarks* foram sobrepostas utilizando a Sobreposição Generalizada de Procrustes, procedimento que separa o formato do organismo em dois componentes: tamanho do centroide (raiz quadrada da soma das distâncias ao quadrado entre cada marco anatômico – média de todas as coordenadas) e forma (informações geométricas do organismo, exceto tamanho, posição e orientação, ou seja, os resíduos de forma) (ROHLF e SLICE, 1990; BOOKSTEIN, 1991; CORDEIRO-ESTRELA et al., 2006). Geometricamente, a sobreposição corresponde ao ajuste de tamanho de centroide e ao alinhamento do conjunto de *landmarks* dos organismos, através de transladação, proporcionalização e rotação (ROHLF e SLICE, 1990; BOOKSTEIN, 1991; MITTEROECKER e GUNZ, 2009). Assim, a posição dos *landmarks* passa a ser correspondente entre os organismos, e as diferenças de forma corporal são mostradas através da diferença de posição entre *landmarks* correspondentes (ROHLF e SLICE, 1990; BOOKSTEIN, 1991; ADAMS et al., 2004; MITTEROECKER e GUNZ, 2009).

Para avaliar diferenças no tamanho do centroide da carapaça entre as populações de *A. platensis* foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de um critério e Teste de Tukey para comparações par a par. Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada para determinar o percentual de explicação de cada componente principal (PC) sobre a variação na forma das carapaças. Os 8 primeiros PCs da matriz de resíduos foram utilizados como novas

variáveis de forma, para diminuir a dimensionalidade dos dados e trabalhar com variáveis independentes. As diferenças na forma foram exploradas através de uma análise linear discriminante (LDA), para verificar a porcentagem de reclassificação correta das populações. A forma das carapaças entre as populações foi explorada através de uma análise de variáveis canônicas (CVA). Foi calculada a distância de Mahalanobis entre as populações como matriz de distância morfológica, e para gerar a árvore de distância (fenograma) foi usado o método de Neighbor-Joining. Um teste de Mantel foi realizado para testar a correlação entre as matrizes de distância de Mahalanobis e de distância geográfica, em km. Diferenças na forma da carapaça foram testadas através de uma análise de variância multivariada (MANOVA) sobre os resíduos de forma, e através de MANOVAs par a par seguidas por correção de Bonferroni para ajuste do valor de significância para comparações múltiplas. As análises estatísticas foram realizadas através do software MorphoJ, Versão 1.05c (KLINGENBERG, 2011), e da linguagem R para estatística computacional, versão 2.15.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012), utilizando a biblioteca Rmorph (BAYLAC, 2008).



Figura 1: Localização de procedência dos exemplares de *Aegla platensis* utilizados na análise morfométrica. rn = Río Noque (26°47'12''S; 65°23'20''W); le = La Encrucijada (27°10'00''S; 65°14'60''W); rm = Río Marapa (27°40'43''S; 65°16'54''W); aea = Arroyo El Arrozal (27°34'14''S; 56°43'28''W); iq = Río Icamaguãzinho (28°46'35''S; 54°55'47''W); tq = Río Taquarembó (28°52'31''S; 54°56'23''W); cu = Río Curuçú (29°13'20''S; 54°51'55''W); rv = Río da Várzea (27°25'28''S; 53°24'41''W); ra = Río Alegre (28°11'16''S; 53°25'54''W); pa = Río Palmeira (28°13'46''S; 53°28'18''W); pt = Río Potiribu (28°33'29''S; 53°36'36''W).

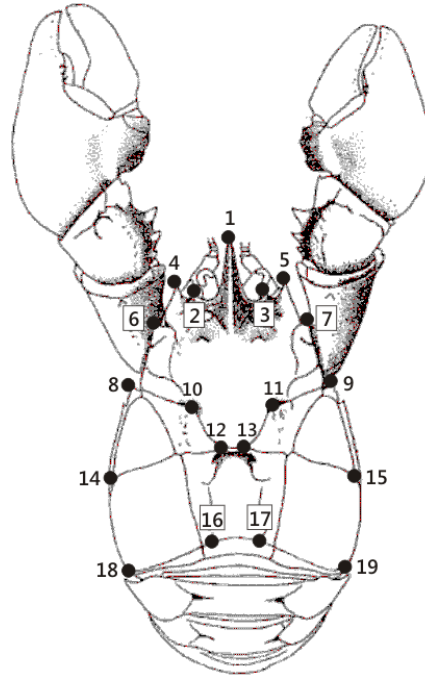


Figura 2: Localização dos 19 marcos anatômicos (*landmarks*) sobre a vista dorsal da carapaça de *Aegla platensis*. 1. extremidade do rostro; 2-3. extremidade do espinho orbital; 4-5. extremidade do espinho anterolateral; 6-7. extremidade do primeiro lobo hepático; 8-9. extremidade do espinho epibranchial; 10-11. inflexão superior do sulco cervical; 12-13. base do sulco cervical; 14-15. intersecção branquial da *linea aeglica lateralis*; 16-17. vértice posterior da aréola; 18-19. extremidade distal da área branquial. Adaptado de Bond-Buckup & Buckup (1994).

RESULTADOS

Houve diferença significativa no tamanho do centroide entre as populações de *A. platensis* ($F_{(10; 99)} = 10,07$; $p < 0,001$). O Teste de Tukey demonstrou que as populações argentinas apresentaram maior amplitude no tamanho do centroide em comparação às populações brasileiras (Fig. 3). Em relação à variação na forma da carapaça, a primeira e a segunda variáveis canônicas representaram 28,5% e 22,2% da variação, respectivamente (Fig. 4A). Houve a separação de dois grupos de populações: populações argentinas, e rios Alegre/Palmeira (Fig. 4A). A primeira variável canônica correspondeu ao comprimento do rostro e largura do cefalotórax, com populações com escores negativos apresentando rostro proporcionalmente mais alongado e cefalotórax mais largo (Fig. 4B). A segunda variável canônica apresentou poucas variações na forma da carapaça (Fig. 4C).

A porcentagem de reclassificação mínima das populações na LDA foi de 70%, o que ocorreu para as populações do Arroyo El Arrozal, Rio Palmeira, Rio Potiribu e Rio

Taquarembó (Tabela 1). Quanto à MANOVA, houve diferença significativa na forma da carapaça entre as populações de *A. platensis* (λ de Wilks = 0,0035; $F_{(10; 99)} = 10,67$; $p < 0,001$). Nas comparações par a par, as populações de Arroyo El Arrozal e La Encrucijada, na Argentina, e Rio Alegre e Rio Palmeira, no Brasil, não apresentaram diferença significativa na forma da carapaça ($p = 0,205$ e $p = 0,068$, respectivamente). Quanto aos valores da distância de Mahalanobis e à árvore de Neighbor-Joining, as populações argentinas, principalmente Arroyo el Arrozal e La Encrucijada, apresentaram valores mais baixos entre si do que com relação às populações brasileiras (Fig. 5). As populações dos rios Alegre e Palmeira também apresentaram valores de distância mais próximos entre si do que em relação ao restante das populações (Fig. 5). O teste de Mantel não apresentou correlação entre as matrizes de distância geográfica e distância de Mahalanobis ($p = 0,563$).

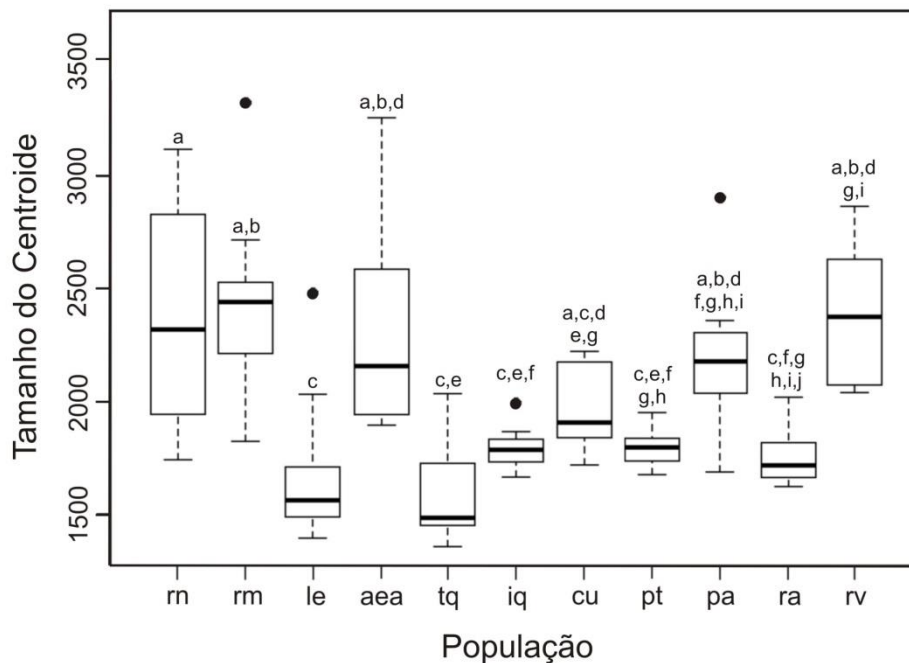


Figura 3: Boxplot do tamanho do centroide da carapaça entre populações de *Aegla platensis*. Círculos indicam outliers. Letras diferentes sobre as caixas indicam diferença significativa no Teste de Tukey. rn = Río Noque; rm = Río Marapa; le = La Encrucijada; aea = Arroyo El Arrozal; tq = Río Taquarembó; iq = Río Icamaquãzinho; cu = Río Curuçu; pt = Río Potiribu; pa = Río Palmeira; ra = Río Alegre; rv = Río da Várzea.

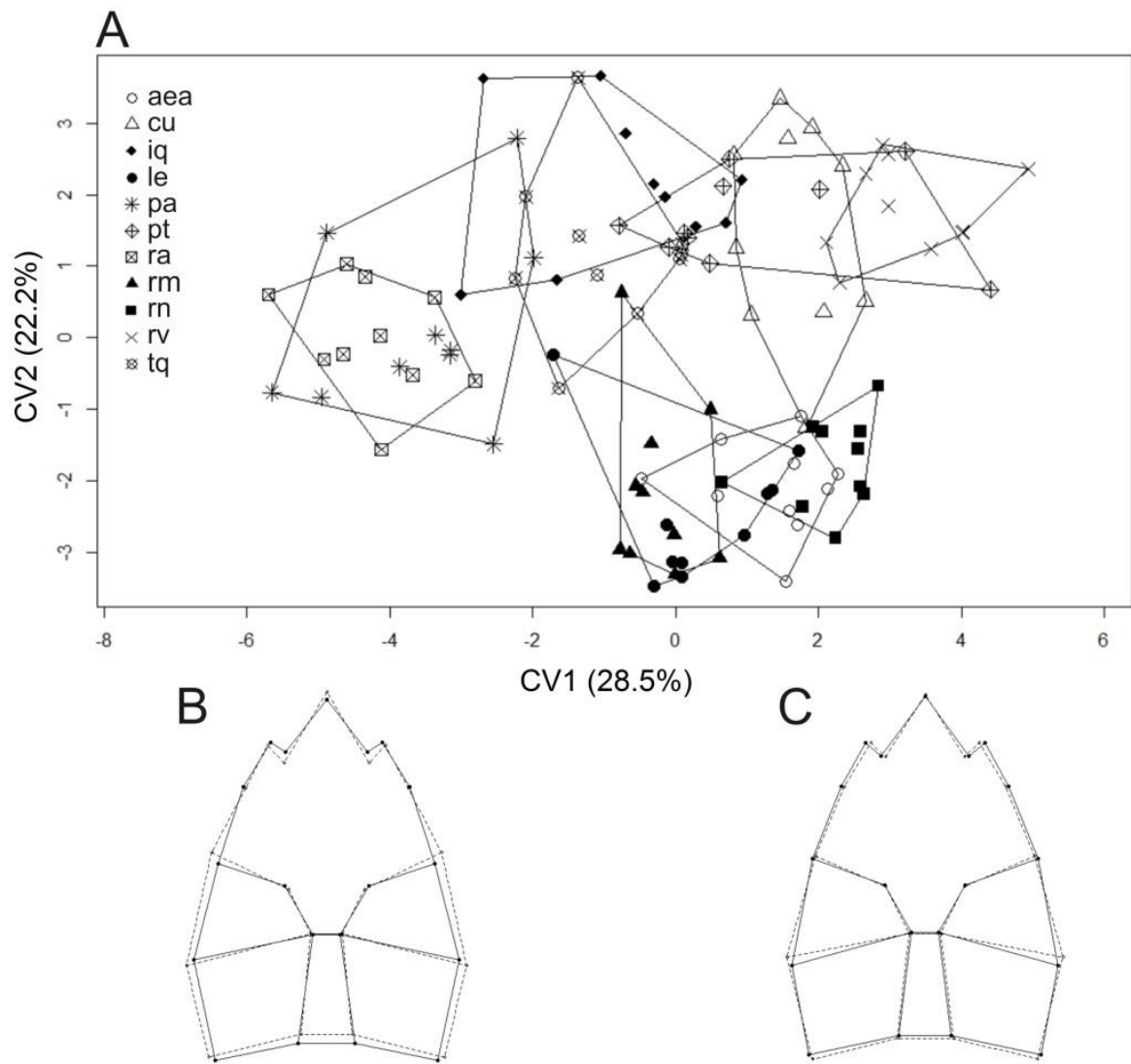


Figura 4: Análise de variáveis canônicas entre populações de *Aegla platensis* (A); Variações na forma da carapaça para CV1 (B) e CV2 (C). Linhas sólidas representam valores positivos e linhas pontilhadas representam valores negativos. aea = Arroyo El Arrozal; cu = Rio Curuçu; iq = Rio Icamaguãzinho; le = La Encrucijada; pa = Rio Palmeira; pt = Rio Potiribu; ra = Rio Alegre; rm = Río Marapa; rn = Río Noque; rv = Rio da Várzea; tq = Rio Taquarembó.

Tabela 1: Porcentagem de classificação correta das populações de *Aegla platensis* na análise linear discriminante da forma da carapaça. aea = Arroyo El Arrozal; cu = Rio Curuçu; iq = Rio Icamaguãzinho; le = La Encrucijada; pa = Rio Palmeira; pt = Rio Potiribu; ra = Rio Alegre; rm = Río Marapa; rn = Río Noque; rv = Rio da Várzea; tq = Rio Taquarembó.

Pop	aea	cu	iq	le	Pa	pt	ra	rm	rn	rv	tq	TOTAL
aea	7			1				1	1			70
cu	1	8				1						80
iq			10									100
le	2			8								80
pa					7		3					70
pt			2			7				1		70
ra					2		8					80
rm								10				100
rn	1								9			90
rv										10		100
tq		1	1			1					7	70

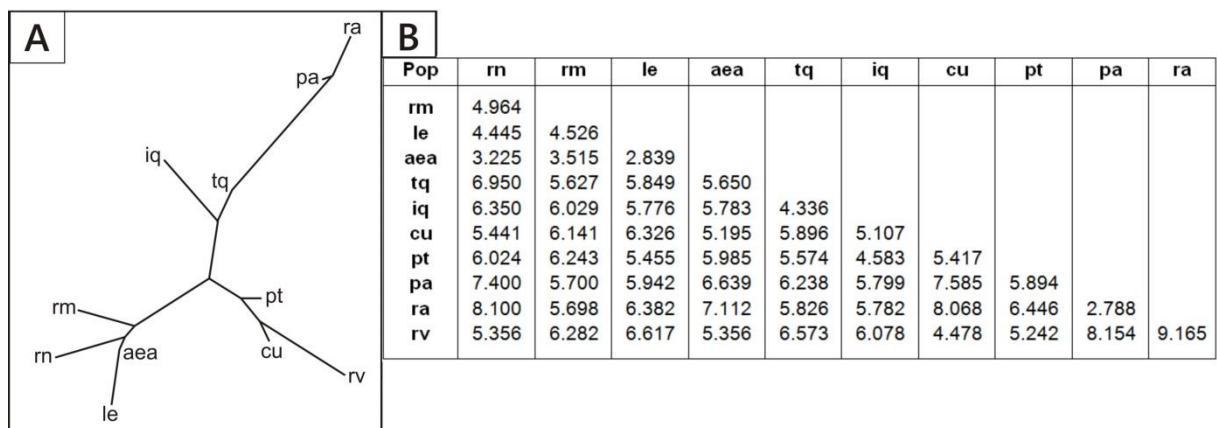


Figura 5: Fenograma baseado na distância de Mahalanobis para a forma da carapaça entre populações de *Aegla platensis* (A); Valor da distância de Mahalanobis entre populações (B). rn = Río Noque; rm = Río Marapa; le = La Encrucijada; aea = Arroyo El Arrozal; tq = Rio Taquarembó; iq = Rio Icamaguãzinho; cu = Rio Curuçu; pt = Rio Potiribu; pa = Rio Palmeira; ra = Rio Alegre; rv = Rio da Várzea.

DISCUSSÃO

As análises morfométricas realizadas em *A. platensis* sugerem uma divergência entre as populações estudadas, tanto no tamanho quanto na forma. Todas as populações analisadas diferiram na forma da carapaça, com exceção dos rios Alegre e Palmeira, no Brasil, e Arroyo el Arrozal e La Encrucijada, na Argentina. Os valores de distância de Mahalanobis entre as

populações argentinas foram mais baixos entre si do que em relação às populações brasileiras, sugerindo um isolamento entre as populações dos dois países, que pode ser resultante de uma menor conectividade entre suas populações (Fig. 1). Esse resultado concorda com a análise filogenética realizada por Pérez-Losada et al. (2004), onde populações argentinas e brasileiras de *A. platensis* formaram agrupamentos separados.

As populações brasileiras apresentaram altos valores de distância de Mahalanobis, com apenas as populações dos rios Alegre e Palmeira formando um agrupamento isolado (Fig. 5). Os valores de distância dessas duas populações em relação ao restante das populações brasileiras foram altos, sugerindo que são bastante semelhantes entre si, porém diferem das restantes. Os rios Alegre e Palmeira são geograficamente próximos (Fig. 1), e os resultados encontrados podem indicar uma separação mais recente entre essas populações, ou até mesmo a ocorrência de fluxo gênico atual ou recente.

Por outro lado, apesar da proximidade geográfica, as populações dos rios Icamauzinho e Taquarémbo diferiram significativamente na forma da carapaça. Levando em conta o pequeno tamanho corporal e o hábito bentônico dos eglídeos, é possível que sua movimentação possa ser influenciada por barreiras físicas e características dos corpos d'água onde se encontram, o que pode ser a causa do isolamento entre rios geograficamente próximos. A capacidade de dispersão de *Aegla* não é conhecida, porém, diferenças moleculares entre populações descontínuas indicam que seu potencial de dispersão é baixo (BARTHOLOMEI-SANTOS et al., 2011). A ausência de fases larvais durante o desenvolvimento dos eglídeos também é um fator que pode limitar sua capacidade de dispersão. Como adaptação ao ambiente dulcícola, juvenis eclodem semelhantes aos adultos, e permanecem junto à mãe por alguns dias após a eclosão (BOND-BUCKUP et al., 1996; LÓPEZ-GRECO et al., 2004). No caso de ambientes marinhos, as fases larvais de crustáceos possuem papel importante na dispersão e estabelecimento de populações (ALMEIDA et al., 2008). Essas características podem justificar a ausência de correlação entre a distância geográfica e a distância de Mahalanobis entre as populações, já que populações geograficamente próximas, como os rios Alegre e da Várzea, apresentaram alto valor de distância de Mahalanobis.

A forma corporal de eglídeos, assim como de outros animais, também pode variar frente a diferentes características ambientais. A variação na forma corporal frente a condições ambientais variadas é um fenômeno comum na natureza, podendo ser resultante tanto de

respostas não-adaptativas, quanto de adaptações aos diferentes locais (WEST-EBERHARD, 1989). Eglídeos vivem em contato direto com o substrato dos corpos d'água, o que os torna completamente expostos aos locais onde habitam (LOSOS, 2010; HEPP et al., 2012). Populações que ocorrem em rios e lagos, por exemplo, estão expostas a diferentes dinâmicas ambientais e podem apresentar características morfométricas diferentes (GIRI e LOY, 2008). Um exemplo desse tipo de variação é a espécie chilena *Aegla denticulata* Nicolet, 1849, que habita rios e um lago chileno. A diferença de habitats levou à divisão da espécie em duas subespécies, com a subespécie lacustre apresentando maior ornamentação e espinulação na carapaça, o que pode estar relacionado ao ambiente lântico e suas características bióticas e abióticas (JARA, 1989). Logo, as diferenças morfométricas encontradas em *A. platensis* podem ser resultantes da exposição a características ambientais particulares, em cada localidade de proveniência.

As exigências ambientais dos eglídeos são bastante altas. Esses animais habitam apenas águas bem oxigenadas, o que está relacionado a altas taxas de metabolismo, e a densidade de *A. platensis* em particular é afetada por áreas urbanizadas e agrícolas (TREVISAN et al., 2009; DALOSTO e SANTOS, 2011). A restrição de eglídeos a áreas com características ambientais específicas e sua baixa mobilidade podem ser um indício de que as populações alopátricas habitam locais semelhantes, e suas diferenças morfológicas podem ser resultantes de seleção uniforme, sem que haja uma adaptação a nichos específicos (GITTEBERGER, 1991; SOBEL et al., 2009). Esse fenômeno já foi reportado para salamandras do gênero *Plethodon*, onde espécies alopátricas habitam locais semelhantes e não apresentam diferenças adaptativas ou morfológicas óbvias, porém existe grande incidência de espécies crípticas no grupo (KOZAK et al., 2006).

Apesar da distância geográfica ser um fator que pode gerar variações morfológicas, existem casos em que esse fator não influencia a forma dos organismos. Alibert et al. (2001) constatou que, entre besouros, populações geograficamente mais distantes não são necessariamente mais diferenciadas morfológicamente, o que pode estar relacionado à capacidade de dispersão relativamente alta desses insetos. Entretanto, a distância geográfica parece ser um fator importante na diferenciação da forma corporal em *Aegla*. No caso de *A. neuquensis*, populações alopátricas podem possuir diferenças morfológicas tão marcantes quanto as que caracterizam a diferenciação entre duas espécies, demonstrando um maior desvio da morfologia típica por parte de populações geograficamente mais distantes (GIRI e

LOY, 2008). Os resultados encontrados para *A. platensis* também indicam que populações alopátricas são morfometricamente diferenciadas.

As relações entre populações alopátricas e a possível ocorrência de espécies crípticas são de grande importância quando se trata de conservação e, no caso de *Aegla*, onde os animais são bastante sensíveis à degradação ambiental e existem várias espécies em perigo de extinção, o caso se torna ainda mais delicado (BOND-BUCKUP et al., 2008). A conservação de espécies crípticas é um tema problemático, pois esta ainda é muito direcionada à unidade específica em si, e determinar uma campanha de conservação para *taxa* pobremente definidos é um desafio (MORITZ, 1994; DANIELS et al., 2003). Muitas vezes, a taxonomia confusa faz com que a conservação de uma espécie seja ainda mais complicada (BERTOCCHI et al., 2008).

A área de ocorrência de *A. platensis* é bastante ampla, quando comparada a outras espécies do gênero, e algumas características desses animais indicam que o fluxo gênico entre populações geograficamente distantes é bastante improvável atualmente. A separação entre populações brasileiras e argentinas verificada com base na forma da carapaça concorda com os agrupamentos filogenéticos encontrado por Pérez-Losada et al. (2004), sendo mais um indício de que a espécie está fragmentada. Existem diferentes explicações possíveis para a diferenciação entre as populações, e para elucidar a questão taxonômica de *A. platensis* seria recomendado realização de um estudo filogeográfico. A realização de tal estudo e a possível concordância com relação aos dados morfométricos levaria a um esclarecimento sobre a história evolutiva da espécie, uma vez que a combinação de características genéticas com outros fatores, como a morfologia, é capaz de revelar padrões evolutivos desconhecidos (HILLIS, 1987).

AGRADECIMENTOS

À Fundación Miguel Lillo, na pessoa de Marcela Peralta, pelo empréstimo das amostras de *Aegla platensis*. Ao professor Michel Baylac por ceder a biblioteca Rmorph. Ao Alberto Senra Gonçalves pela ajuda com as figuras e comentários no manuscrito. Ao Marcelo Marchet Dalosto pelos comentários no manuscrito. Ao CNPq pela bolsa de produtividade para SS e à CAPES pela bolsa de estudos para ABM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. C.; FUNK, D. J. Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles: multivariate applications of thin-plate spline. **Systematic Biology**. 46(1): 180-194. 1997.
- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. **Italian Journal of Zoology**. 71: 5-16. 2004.
- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. **Hystrix**. 24(1): 7-14. 2013.
- ALIBERT, P. et al. Differentiation at microgeographical scale within two species of ground beetle, *Cabarus auronitens* and *C. nemoralis* (Coleoptera, Carabidae): a geometrical morphometric approach. **Zoologica Scripta**. 30(4): 299-311. 2001.
- ALMEIDA, M. J.; FLORES, A. A. V.; QUEIROGA, H. Effect of crab size and habitat type on the locomotory activity of juvenile shore crabs, *Carcinus maenas*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 80: 509-516. 2008.
- APTE, S.; SMITH, P. J.; WALLIS, G. P. Mitochondrial phylogeography of New Zealand freshwater crayfishes, *Paranephrops* spp. **Molecular Ecology**. 16: 1897-1908. 2007.
- BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L.; RORATTO, P. A.; SANTOS, S. High genetic differentiation of *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura) populations in southern Brazil revealed by multi-loci microsatellite analysis. **Genetic and Molecular Research**. 10(4): 4133-4146. 2011.
- BAYLAC, M. Rmorph: a R geometric and multivariate morphometrics library. Available from the author: baylac@mnhn.fr. 2008.
- BERTOCCHI, S. et al. Morphometrical characterization of the *Austropotamobius pallipes* species complex. **Journal of Natural History**. 42(31-32): 2063-2077. 2008.
- BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**. 22(3): 148-155. 2007.
- BOOKSTEIN, F. L. **Morphometric tools for landmarks data**. Cambridge University Press: Cambridge, 1991.
- BOND-BUCKUP, G.; BUENO, A. A. P.; KEUNECKE, K. A. Primeiro estágio juvenil de *Aegla prado* Schmitt (Crustacea, Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. 13: 1049-1061. 1996.
- BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**. 32(4): 159-346. 1994.
- BOND-BUCKUP, G. et al. Global diversity of crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in freshwater. **Hydrobiologia**. 595: 267-273. 2008.

- BUHAY, J. E. et al. Molecular taxonomy in the dark: Evolutionary history, phylogeography, and diversity of cave crayfish in the subgenus *Aviticambarus*, genus *Cambarus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 42: 435-448. 2007.
- COLPO, K. D.; OLIVEIRA, L. R.; SANTOS, S. Population biology of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Aeglidae) from South Brazilian Streams. **Journal of Crustacean Biology**. 25: 495-499. 2005.
- CORDEIRO-ESTRELA, P. et al. Interspecific patterns of skull variation between sympatric Brazilian vesper mice: geometric morphometrics assessment. **Journal of Mammalogy**. 87(6): 1270-1279. 2006.
- DALOSTO, M.; SANTOS, S. Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. 160: 461-466. 2011.
- DANIELS, S. R. et al. Molecular and morphometric data demonstrate the presence of cryptic lineages among freshwater crabs (Decapoda: Potamonautidae: Potamonautes) from the Drakensberg Mountains, South Africa. **Biological Journal of the Linnean Society**. 78: 129-147. 2003.
- FORNEL, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P.; FREITAS, T. R. O. Skull shape and size variation in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) in geographical, chromosomal polymorphism, and environmental contexts. **Biological Journal of the Linnean Society**. 101: 705-720. 2010.
- GIRI, F.; LOY, A. Size and shape variation of two freshwater crabs in Argentinean Patagonia: the influence of sexual dimorphism, habitats, and species interaction. **Journal of Crustacean Biology**. 28(1): 37-45. 2008.
- GITTENBERGER, E. What about non-adaptive radiation? **Biological Journal of the Linnean Society**. 43: 263-272. 1991.
- HARRIS, D. J.; CRANDALL, K. A. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. **Molecular Biology and Evolution**. 17(2): 284-291. 2000.
- HEPP, L. U. et al. Intraspecific Morphological Variation in a Freshwater Crustacean *Aegla plana* in Southern Brazil: Effects of Geographical Isolation on Carapace Shape. **Journal of Crustacean Biology**. 32(4): 511-518. 2012.
- HILLIS, D. M. Molecular versus morphological approaches to systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**. 18: 23-42. 1987.
- HOPKINS, M. J.; THURMAN, C. L. The geographic structure of morphological variation in eight species of fiddler crabs (Ocypodidae: genus *Uca*) from the eastern United States and Mexico. **Biological Journal of the Linnean Society**. 100: 248-270. 2010.
- JARA, C. G. *Aegla denticulata lacustris*, new subspecies, from lake Rupanco, Chile (Crustacea, Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**. 102(2): 385-393. 1989.

- KLINGENBERG, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular Ecology Resources**. 11: 353-357. 2011.
- KLINGENBERG, C. P.; BARLUENGA, M., MEYER, A. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. **Evolution**. 56: 1909-1920. 2002.
- KNOWLTON, N. Cryptic and sibling species among the Decapoda Crustacea. **Journal of Crustacean Biology**. 6(3): 356-363. 1986.
- KOZAK, K. H.; WEISROCK, D. W.; LARSON, A. Rapid lineage accumulation in a non-adaptive radiation: phylogenetic analysis of diversification rate in eastern North American woodland salamanders (Plethodontidae: *Plethodon*). **Proceedings of the Royal Society – Biological Sciences**. 273: 539-546. 2006.
- LÓPEZ-GRECO, L. S. et al. Juvenile hatching and maternal care in *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**. 24: 309-313. 2004.
- LOSOS, J. B. Adaptive radiation, ecological opportunity, and evolutionary determinism. **The American Naturalist**. 175(6): 623-639. 2010.
- MARTIN, J. W.; ABELE, L. G. External morphology of the genus *Aegla* (Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**. 453: iv+46 pp. 1988.
- MITTEROECKER, P.; GUNZ, P. Advances in Geometric Morphometrics. **Evolutionary Biology**. 36: 235-247. 2009.
- MORITZ, C. Defining ‘Evolutionary Significant Units’ for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**. 9(10): 373-375. 1994.
- MORRONE, J. J.; LOPRETTO, E. C. Distributional patterns of freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) in southern South America: a panbiogeographic approach. **Journal of Biogeography**. 21: 97-109. 1994.
- MATHEWS, L. M. et al. Genetic and morphological evidence for substantial hidden biodiversity in a freshwater crayfish species complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 48: 126-135. 2008.
- NOSIL, P. Ernst Mayr and the integration of geographic and ecological factors in speciation. **Biological Journal of the Linnean Society**. 95: 26-46. 2008.
- NICOLET, H. **Crustaceos**. In: Gay, C. *Historia Física y Política de Chile: Zoología*. Maulde y Renou: Paris. p. 198-201. 1849.
- PÉREZ-LOSADA, M. et al. Molecular systematics of Southern South American freshwater “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. **Systematic Biology**. 53(5): 767-780. 2004.

PFENNINGER, M.; SCHWENK, K. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC Evolutionary Biology**. 7: 1-6. 2007.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-project.org/>. 2012.

RIESEBERG, L. H.; BURKE, J. M. The biological reality of species: gene flow, selection, and collective evolution. **Taxon**. 50: 47-67. 2001.

ROHLF, F. J. tpsDig2, version 2.16. Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph>. 2010.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A Revolution in Morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution**. 8: 129-132. 1993.

ROHLF, F. J.; SLICE, D. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. **Systematic Zoology**. 39(1): 40-59. 1990.

SÁEZ, A. G.; LOZANO, E. Body doubles. **Nature**. 433: 111. 2005.

SANTOS, S. et al. New records and description of a new species of Aeglidae (Crustacea: Anomura) from river basins in Southern Brazil. **Nauplius**. 18(1): 79-86. 2010.

SANTOS, S. et al. New species and records of the genus *Aegla* Leach, 1820 (Crustacea, Anomura, Aeglidae) from the West-Central region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Nauplius**. 21(2): 211-223. 2013.

SCHEMSKE, D. W. Understanding the origin of species. **Evolution** 54(3): 1069-1073. 2000.

SCHLUTER, D.; MCPHAIL, J. D. Character displacement and replicate adaptive radiation. **Trends in Ecology and Evolution**. 8(6): 197-200. 1993.

SCHMITT, W. The species of *Aegla*, endemic South American fresh-water crustaceans. **Proceedings of the United States National Museum**. 91: 431-520. 1942.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**. 236: 787-792. 1987.

SOBEL, J. M. et al. The biology of speciation. **Evolution**. 64(2): 295-315. 2009.

TREVISAN, A.; HEPP, L. U.; SANTOS, S. Abundância e distribuição de Aeglidae (Crustacea: Anomura) em função do uso da terra na bacia hidrográfica do Rio Jacutinga, Rio Grande do Sul, Brasil. **Zoologia**. 26(3): 419-426. 2009.

TREVISAN, A.; MASUNARI, S. Geographical distribution of *Aegla schmitti* Hobbs III, 1979 (Decapoda Anomura Aeglidae) and morphometric variations in male populations from Paraná State, Brazil. **Nauplius**. 18: 45-55. 2010.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 20: 249-278. 1989.

ZELDITCH, M. L. et al. **Geometric morphometrics for biologists: a primer**. Elsevier Academic Press: New York, 2004.

4 CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, analisamos a variação morfométrica da forma da carapaça de duas espécies de *Aegla* – *Aegla longirostri* e *Aegla platensis* –, as quais apresentam distribuições geográficas amplas. Além das distribuições amplas para o gênero, ambas as espécies formam agrupamentos não monofiléticos, de maneira que a análise de populações alopátricas quanto a variações morfométricas intraespecíficas foi pertinente.

No Capítulo 1, verificamos que seis populações de *A. longirostri* analisadas apresentam diferenças morfométricas significativas na forma da carapaça. Nossos resultados concordam com diferenças moleculares já encontradas para a espécie, de modo que nosso estudo apresentou mais uma evidência de que populações descontínuas de *A. longirostri* podem estar fragmentadas. No Capítulo 2, verificamos que populações argentinas e brasileiras de *A. platensis* formam agrupamentos isolados com base em diferenças morfométricas na forma da carapaça. Com exceção de duas populações argentinas e duas brasileiras, também existem diferenças significativas entre as populações dos dois países. A ausência de diferença na forma da carapaça entre dois pares de populações de *A. platensis* pode indicar uma separação mais recente, ou também uma exposição a condições ambientais semelhantes.

Baseado no formato da carapaça, nosso estudo evidenciou que populações alopátricas de *A. longirostri* e *A. platensis* podem estar fragmentadas, sugerindo ausência de fluxo gênico. Eglídeos são animais de tamanho corporal pequeno que possuem grandes exigências ambientais, portanto as diferenças encontradas podem ocorrer devido à dificuldade de migração entre populações alopátricas. A exposição a condições ambientais diferenciadas também contribuem para as diferenças na forma da carapaça, já que eglídeos são animais bentônicos e ficam vulneráveis às condições ambientais que encontram. A ausência de monofilia em *A. longirostri* e *A. platensis*, combinada com as diferenças morfométricas encontradas para ambas as espécies, sugerem uma especiação críptica entre os eglídeos. A realização de estudos filogeográficos que esclareçam os processos de migração e estabelecimento das populações atuais de *A. longirostri* e *A. platensis* é necessária para elucidar essa questão.