

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

**EVOLUÇÃO DO GÊNE MITOCONDRIAL COI EM
AEGLIDAE (CRUSTACEA, ANOMURA) E
IMPLICAÇÕES PARA DNA *BARCODING***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thaís Kaus de Freitas

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**EVOLUÇÃO DO GENE MITOCONDRIAL COI EM
AEGLIDAE (CRUSTACEA, ANOMURA) E IMPLICAÇÕES
PARA DNA *BARCODING***

Thaís Kaus de Freitas

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biodiversidade Animal.**

Orientadora: Prof^a. Marlise Ladvocat Martholomei-Santos

Santa Maria, RS, Brasil

2013

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

Kaus de Freitas, Thaís
EVOLUÇÃO DO GENE MITOCONDRIAL COI EM AEGLIDAE
(CRUSTACEA, ANOMURA) E IMPLICAÇÕES PARA DNA BARCODING /
Thaís Kaus de Freitas.-2013.
63 p.; 30cm

Orientadora: Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RE, 2013

1. Aegla 2. COI 3. DNA barcoding 4. divergência
nucleotídica I. Ladvocat Bartholomei-Santos, Marlise 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

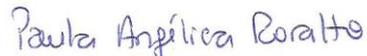
**EVOLUÇÃO DO GENE MITOCONDRIAL COI EM AEGLIDAE
(CRUSTACEA, ANOMURA) E IMPLICAÇÕES PARA DNA
BARCODING**

elaborada por
Thaís Kaus de Freitas

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Biodiversidade Animal

COMISSÃO EXAMINADORA:


Élgion Lúcio da Silva Loreto, Dr.
(Presidente)


Paula Angélica Roratto, Dr.^a. (FAMEBLU)


Lenira Maria Nunes Sepel, Dr.^a. (UFSM)

Santa Maria, 10 de abril de 2013.

Dedico este trabalho ao Thiago, pelo apoio, incentivo e confiança, sempre prestados com muito amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho nunca é feito sozinho e muitas são as pessoas que contribuíram, de diversas formas, ao longo desses dois anos para que eu conseguisse chegar até aqui. Citar todos é impossível, por isso agradeço a todos que sabem que fazem parte desta história.

Primeiramente, agradeço à Marlise, minha orientadora, amiga, mãezona, conselheira e inspiração para toda a vida. Nesses seis anos de convivência eu aprendi muito mais do que biologia molecular, genética de populações e eglídeos. Aprendi a ver o lado bom das coisas, a pensar positivo, a achar as eglinhas fofas, a pensar nos microssatélites como as coisinhas mais maravilhosas do mundo! Entre tantas coisas que vivi no laboratório, suas atitudes de respeito e carinho com todos são lições que vou levar para a vida toda. O convívio com uma orientadora tão maravilhosa com certeza me tornou uma pessoa melhor, não só profissionalmente, mas em todos os aspectos.

Ao professor Sandro, pela ajuda com as coletas, pelo seu amplo conhecimento dos eglídeos, dos rios e cartas catalográficas que contribuíram muito para meu aprendizado.

Ao professor Élgion e à professora Lenira, pela ajuda em todos os momentos em que precisamos, pela contribuição na banca, por disponibilizarem o LabDros e seus equipamentos em todas as vezes que precisamos de auxílio.

À Paula Angélica, pela ilustre contribuição na banca e por toda a “herança” de material e conhecimento deixada no laboratório.

À Sonia, sempre incansável, por todas as vezes que tirou as minhas dúvidas e me estendeu a mão nos momentos difíceis.

Ao secretário Sidnei, pelo auxílio com a parte burocrática da pós-graduação.

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

À CAPES, pelo suporte financeiro através das bolsas.

Aos colegas do DiverGe que convivi durante esses seis anos. Ter colegas para dividir as alegrias, frustrações e os bons momentos auxilia muito na rotina laboratorial. Agradeço, em especial, à Cíntia que foi meu braço direito nesses dois anos e contribui para que este trabalho fosse realizado. Muito obrigada pela amizade, ajuda e os pelos momentos de descontração.

Ao pessoal do LabDros e do Lacrust que me auxiliaram nos momentos que precisei.

À minha amiga Elenize, companheira das lamentações do mestrado e de muitas conversas maravilhosas pelo laboratório ou pelo campus.

Aos meus familiares e aos do Thiago, minha segunda família, pelo apoio e compreensão na minha ausência.

À minha avó Geni, pela sua dedicação infinita, pelo seu carinho e pelas orações para que tudo desse certo.

À minha mãe Carmen, minha “relações públicas”, pela sua disposição em percorrer toda a cidade, a UFSM e todos os outros lugares que fossem necessários para me auxiliar com documentos, pela constante busca de informações que eu nunca sabia onde encontrar, pelas inúmeras ligações para saber se “estava tudo bem” e pela dedicação que teve desde o início para que um dia eu chegasse até aqui.

À minha irmã Thielle, pela ajuda em todos os momentos, por me ouvir falando de biologia, de DNA e reclamar do mestrado. Por sempre me salvar com os assuntos referentes a internet, sistemas computacionais e por me auxiliar com seu rico conhecimento na parte textual. Por todos os momentos bons que passamos juntas e por ser sempre a minha “bebê”.

Ao Thiago, meu amor, pelo seu apoio incondicional. Por assumir diversos papéis ao longo desses dois anos, desde psicólogo para me auxiliar nos momentos de desespero até faxineiro para que eu pudesse me dedicar exclusivamente ao trabalho. Pela sua confiança, paciência e compreensão na minha constante ausência, fundamentais para eu conseguir realizar este trabalho. Obrigada por tudo!

À TODOS, MUITO OBRIGADA!!!

*...From so simple an origin,
through the process of gradual
selection of infinitesimal changes,
endless forms most beautiful and most
wonderful have been evolved.*

(Charles Darwin)

RESUMO

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

EVOLUÇÃO DO GENE MITOCONDRIAL COI EM A EGLIDAE (CRUSTACEA, ANOMURA) E IMPLICAÇÕES PARA DNA BARCODING

AUTORA: THAÍS KAUS DE FREITAS
ORIENTADORA: MARLISE LADVOCAT BARTHOLOMEI-SANTOS
Data e Local de Defesa: Santa Maria, 10 de abril de 2013.

O gene mitocondrial COI é amplamente utilizado como marcador molecular, sendo a região de DNA *barcoding* cada vez mais popular para delimitação e identificação de espécies. No entanto, os padrões de evolução variam ao longo dos genes dependendo de fatores como posição do gene no genoma, grupo taxonômico, entre outros. O uso de uma única região delimitada para qualquer grupo pode não ser adequado para o táxon de interesse ou para responder suas questões evolutivas. Nós examinamos os padrões de divergência nucleotídica intra e interespecíficas no gene COI de crustáceos eglídeos e obtivemos: perfis de divergência altamente variáveis ao longo de todo COI; possível padrão de evolução na região de Jerry-Pat; ausência de pressões evolutivas por divergência concentrada; sobreposição de níveis de divergência intraespecífica e com interespecífica, mas sem sobreposição dos perfis de substituição ao longo do gene; sugestão de nova região para acessar a diversidade total de COI em eglídeos. Concluimos que a região de *barcoding* não reflete acuradamente a evolução do gene mitocondrial COI em eglídeos.

Palavras-chave: *Aegla*, COI, DNA *barcoding*, divergência nucleotídica

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduation in Animal Biodiversity
Universidade Federal de Santa Maria

EVOLUTION OF THE MITOCHONDRIAL GENE COI IN AEGLIDAE (CRUSTACEA, ANOMURA) AND IMPLICATIONS FOR DNA BARCODING

AUTORA: THAÍS KAUS DE FREITAS
ORIENTADORA: MARLISE LADVOCAT BARTHOLOMEI-SANTOS

The mitochondrial gene COI is widely used as a molecular marker, and the region used for DNA *barcoding* is getting more and more popular to species delimitation and identification. However, the evolution patterns can vary along the genes depending on factors as the gene position in genome and taxonomic group, among others. Using one unique delimited region for all groups may not be suitable to a certain targeted taxon, or to answer its evolutionary questions. We examined the patterns of COI intra- and interspecific nucleotide divergence for aeglid crustaceans and we found highly variable divergence profiles along the COI gene; a possible evolutionary pattern for the Jerry-Pat region; lacking of evolutionary pressures by concentrated divergence; intra- and interspecific divergence levels overlap, but no overlapping in substitution profiles along the gene; a putative new COI region to access the total COI diversity in aeglids. We conclude that the barcoding region does not accurately reflect the evolution of the gene COI in aeglids.

Key words: *Aegla*, COI, DNA *barcoding*, nucleotide divergence

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diversidade nucleotídica intraespecífica	29
Tabela 2 – Divergência nucleotídica interespecífica	32

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Perfis de diversidade nucleotídica intraespecífica	30
Figura 2 – Perfis de divergência nucleotídica interespecífica	33
Figura 3 – Perfis aleatórios	35
Figura 4 – Perfis de divergência relativa	36
Figura 5 – Efeito do tamanho do fragmento	37
Figura 6 – Perfis de saturação	39

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	
Filogenia de Aeglidae	58

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A

Lista de espécimes utilizados 59-63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Revisão bibliográfica	15
1.1.1 Eglídeos	15
1.1.2 DNA mitocondrial	17
1.1.2 Gene citocromo c oxidase I (COI) e DNA <i>barcoding</i>	17
1.2 Objetivos	19
1.2.1 Objetivo Geral	19
1.2.2 Objetivos Específicos	19
2 ARTIGO	20
Resumo	22
Abstract	22
1 Introdução	23
2 Materiais e Métodos	24
2.1 Coleta de dados	24
2.2 Análises de <i>Sliding window</i>	25
2.3 Randomizações	25
2.4 Divergência nucleotídica localizada como indicadora de divergência total.....	26
2.5 Efeito do tamanho do fragmento na estimativa de divergência nucleotídica.....	27
2.6 Análises de saturação do DNA.....	27
3 Resultados	28
3.1 Diversidade intraespecífica.....	28
3.2 Divergência interespecífica.....	31
3.3 Randomizações.....	34
3.4 Divergência nucleotídica localizada como indicadora de divergência total.....	36
3.5 Efeito do tamanho do fragmento na estimativa de divergência nucleotídica.....	37
3.6 Análises de saturação de DNA.....	37
4 Discussão	40
5 Conclusão	42
6 Referências bibliográficas	43
3 CONCLUSÃO	49
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
5 ANEXO A	58
6 APÊNDICE A	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Eglídeos

Os caranguejos eglídeos fazem parte do Subfilo Crustacea que apresenta grande variação morfológica, estrutural, de habitats e modos de vida, formando um grupo extenso com muitas subdivisões (HICKMAN, 2001). Eles estão inseridos na Classe Malacostraca, a mais diversa, representando mais da metade de todas as espécies de crustáceos. A Ordem Decapoda, à qual pertencem, apresenta aproximadamente um quarto das espécies de crustáceos conhecidas (BARNES, 1996) e se destaca como uma das mais diversas em termos de variações expressas em seu plano corporal (SCHRAM et al., 2009). Segundo Ahyong et al. (2009) a Infraordem Anomura é composta por 7 superfamílias, 17 famílias e cerca de 200 gêneros. No entanto, os eglídeos constituem uma superfamília composta por uma única família e um único gênero, sendo os únicos anomuros de água doce.

Atualmente os eglídeos estão classificados na Superfamília Aegloidea Dana, 1852 (AHYONG et al., 2009; MCLAUGHLIN et al., 2010). A mudança sistemática é recente, embora estudos apontassem divergências morfológicas (MARTIN & ABELE, 1988; TUDGE & SCHELTINGA, 2002; MCLAUGHLIN et al., 2007) e filogenéticas (MARTIN & ABELE, 1986; PÉREZ-LOSADA et al., 2002a; MORRISON et al. 2002; AHYONG & O'MEALLY, 2004; PORTER et al., 2005; MACPHERSON et al., 2005; MCLAUGHLIN et al., 2007) que separavam os eglídeos da superfamília Galattheoidea, na qual estava incluída anteriormente.

A Família Aeglididae Dana, 1852, apresenta características peculiares que fazem dos eglídeos seres únicos. A família, restrita às águas continentais e endêmica do sul da América do Sul (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994), tem registros fósseis na Nova Zelândia (FELDMANN, 1984) e México (FELDMANN et al., 1998) datados de cerca de 75 milhões de anos (Mya) que sugerem origem marinha ao grupo. Baseado em análises heurísticas de genes mitocondriais e nuclear, PÉREZ-LOSADA et al. (2004) corrobora a hipótese de origem marinha e associa a ocupação continental da família à transgressão marinha ocorrida no Cretáceo Superior.

Apesar de sua origem não ser recente, a família apresenta um único gênero. *Aegla* Leach, 1820, é composto por 73 espécies e subespécies descritas até o momento (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994; BOND-BUCKUP et al., 2010; MCLAUGHLIN et al., 2010; SANTOS et al., 2012). Essas espécies podem ser consideradas indicadoras de qualidade de habitat considerando a ocorrência mais restrita a nascentes, o alto consumo de oxigênio dissolvido na água e a reciclagem de nutrientes como decompositoras de matéria orgânica (BOND-BUCKUP et al., 2003; BÜCKER et al., 2008; SANTOS et al., 2008; DALOSTO & SANTOS, 2011). Dada a sua distribuição restrita devido a atual degradação dos ambientes de água doce, segundo Bond-Buckup (2008), cerca de 36% das espécies de eglídeos estão ameaçadas de extinção.

Um amplo estudo foi realizado por Pérez-Losada et al. (2004) afim de esclarecer questões sobre a biogeografia e sistemática de *Aegla* usando os genes 28S, 12S, 16S, COI, COII. O gênero *Aegla* é composto por cinco clados com correlação biogeográfica, onde os clados A e B (com irradiação superior a 40 Mya) apresentam as espécies mais basais com ocorrência no Chile e sul da Argentina. O clado C (central, com irradiação superior a 30 Mya) é composto por espécies presentes no norte da Argentina, Uruguai e Brasil. Os clados D e E são mais derivados (irradiação a cerca de 25 Mya), sendo o primeiro representado por espécies do leste do Rio Grande do Sul até a fronteira entre Uruguai e Argentina, e o último clado representado apenas por espécies do RS. As associações filogenéticas entre os clados e suas espécies sugeriram um padrão de irradiação do grupo anterior aos padrões atuais de drenagem dos rios. O estudo também estabeleceu que o gênero é monofilético. No entanto seis espécies foram parafiléticas, característica que já foi apontada em estudos anteriores (PÉREZ-LOSADA et al., 2002a,b), sendo sugerida a possibilidade de espécies distintas, o que seria um indicativo de que o número de espécies estaria subestimado para o gênero.

Trabalhos populacionais com espécies apresentando padrão parafilético, ou monofilético em uma análise e parafilético em outra, mencionam a ausência de diferenças morfológicas entre as populações (BITENCOURT, 2007; BARTHOLOMEI-SANTOS et al., 2011; HAUSCHILD, 2011). Considerando que a taxonomia do gênero é baseada em caracteres morfológicos, as semelhanças morfológicas poderiam estar mascarando a ocorrência de espécies distintas ou em processo de diferenciação/especiação. Estas populações podem apresentar espécies crípticas que demandam muita prudência e precisão nas análises. Essas questões somadas a falta de compartilhamento de caracteres derivados em relação ao grande número de espécies existentes (PÉREZ-LOSADA et al., 2002a) fazem os

aeglídeos candidatos ideais para a sistemática molecular, a fim de esclarecer suas relações taxonômicas, populacionais e evolutivas, contribuindo para sua conservação.

1.1.2 DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) é uma molécula pequena e circular presente em grandes quantidades nas células. O genoma mitocondrial é composto por 37 genes envolvidos no processo de respiração aeróbica: 13 genes codificantes de proteínas, 22 de RNAs transportadores e 2 de RNAs ribossomais (SIMON et al., 1994). Características peculiares como muitas cópias por célula, aparente ausência de íntrons e de recombinação, herança uniparental, genes com taxas evolutivas diferentes e taxas mutacionais, geralmente, superiores às de genes nucleares fazem dos genes mitocondriais os marcadores mais comumente utilizados (SATTA et al., 1987; SIMON et al., 1994; SACCONI et al., 1999; GOTO & KIMURA, 2001; ROKAS et al., 2003).

Segundo Simon et al. (1994), os genes de RNAs transportadores (tRNA) apresentam taxas evolutivas menores que os genes codificadores enquanto os genes ribossomais (rRNA) apresentam grande variação evolutiva ao longo da molécula e ocorrência de *indels* (BUCKLIN et al., 2011) que podem interferir nas análises. Entre os genes codificantes o COI é o mais conservado em relação as taxas evolutivas a nível de aminoácidos (SIMON et al., 1994), além de possuir um sinal filogenético considerável sobre uma grande variação de níveis taxonômicos (BUCKLIN et al., 2011).

1.1.3 Gene citocromo c oxidase I (COI) e DNA *barcoding*

O gene codificante da proteína citocromo c oxidase I é comumente sequenciado por dois pares de *primers* estabelecidos a partir de *Drosophila yakuba* (CATERINO & SPERLING, 1999; ROE & SPERLING, 2007). A região de DNA *barcoding* é obtida a partir do par de *primers* LCO-HCO (FOLMER et al., 1994) com 658 pb e está posicionada na região 1514 pb-2173 pb. Já a região de Jerry-Pat é obtida a partir do par de *primers* C1J-TL2N (SIMON et al., 1994) com 830 pb e está posicionada na região 2183 pb-3014 pb.

Sob a perspectiva de uma forma sustentável de identificação de espécies frente a um possível colapso na habilidade taxonômica, Hebert et al. (2003a) sugerem a criação de um

sistema padrão para a identificação de espécies através da “leitura” de “códigos de barras” presentes nas sequências de DNA. Esses códigos estariam contidos em uma região de aproximadamente 660 pares de bases (pb), flanqueada por dois *primers* universais, na extremidade 5’ do gene mitocondrial COI (FOLMER et al., 1994). As diferenças obtidas nas sequências seriam suficientes para permitir a atribuição de organismos até para categorias taxonômicas superiores, sendo portanto um sistema global de classificação.

A principal razão para a escolha de COI como *barcode* seria o padrão de variação observado para numerosas espécies, com divergência acentuada e ausência de sobreposição entre distâncias genéticas intra e interespecíficas (HEBERT et al., 2003b). As vantagens apontadas por Hebert et al., 2003a seriam: ajudar em delineamentos iniciais das espécies, facilidade geral de diagnóstico de espécies, a possibilidade de usar um fragmento molecular padrão como guia de espécies em situações onde a taxonomia não tem sido suficiente.

A proposta de um grande sistema acessível, baixo custo e eficaz para a identificação de espécies foi ganhando força e hoje existem organizações conhecidas mundialmente como o *Barcode of Life Data Systems* (BOLD; <http://www.boldsystems.org>) e o *Consortium for the Barcode of Life* (<http://barcoding.si.edu/>).

A ampla utilização da região de *barcoding* para os mais diversos metazoários (HEBERT et al., 2003a,b, 2004a,b, COSTA et al., 2007; EKREM et al., 2007; STOECKLE & HEBERT 2008; WARD, 2009; LUO et al., 2011), bem como para plantas e fungos (RUBINOFF et al., 2006; CLARE et al., 2008) e até questões ecológicas (VALENTINI et al., 2008; UTHICKE et al., 2010), evidenciam a aceitação de um marcador universal.

Porém, esse critério de classificação tem gerado inúmeras críticas quanto à identificação de uma espécie sem considerar mais critérios como morfológicos, comportamentais, número e eficiência do marcador. A utilização de um fragmento, sem levar em conta que os padrões de evolução dentro do gene, a escolha do gene e o tamanho do fragmento variam conforme o organismo de interesse ou a questão evolutiva a ser respondida, também são questionamentos levantados por diversos autores (MORITZ & CICERO, 2004; WILL & RUBINOFF, 2004; EBACH & HOLDREGE, 2005; MEYER & PAULAY, 2005; LARSON, 2007; BUHAY, 2009; DAVISON et al., 2009). No entanto, como colocado por Roe & Sperling (2007), na maioria dos casos as críticas são referentes ao tamanho do fragmento ou a utilização de um fragmento único. Raras são as discussões sobre os efeitos potenciais da utilização desta região em particular na delimitação de espécies estreitamente relacionadas.

Levando em conta a utilização crescente de DNA *barcoding* e sua importância junto às análises morfológicas, é necessário o conhecimento dos padrões evolutivos dentro do gene COI para compreender como tais fatores podem afetar a delimitação de espécies estreitamente relacionadas e demais questões evolutivas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Investigar os padrões de evolução do gene mitocondrial codificante da proteína citocromo c oxidase I (COI) na Família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura).

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Analisar os padrões de divergência nucleotídica interespecífica e intraespecífica ao longo do gene.
- ✓ Avaliar os efeitos de tamanho do fragmento na estimativa de divergência nucleotídica.
- ✓ Investigar a presença de fatores influentes nas taxas evolutivas.
- ✓ Verificar se existem outras regiões e/ou tamanhos de fragmento mais informativos para o gênero *Aegla*.

2 ARTIGO

A região de *barcode* reflete a evolução do gene mitocondrial COI em Aeglidae (Crustacea, Anomura)?

**A região de *barcode* reflete a evolução do gene mitocondrial COI em Aeglidae
(Crustacea, Anomura)?**

Thaís Kaus de Freitas¹, Cíntia Regina Niederauer Ramos², Marlise Ladvoocat Bartholomei-
Santos^{1,2,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal,

² Curso de Ciências Biológicas,

³ Departamento de Biologia,

Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 –
Santa Maria, RS, Brasil.

Corresponding author: marliselbs@gmail.com

Laboratório de Diversidade Genética - DiverGe

Departamento de Biologia, sala 1140-H, prédio 17

Universidade Federal de Santa Maria

Av. Roraima, n° 1000, Camobi

97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

Fone: +55 55 3220 8665 e 3220 8629

Sub-ramal: 25

Resumo

O gene COI é amplamente utilizado como marcador molecular, sendo a região de DNA *barcoding* cada vez mais popular para delimitação e identificação de espécies. No entanto, os padrões de evolução variam ao longo do gene dependendo de fatores como posição do gene no genoma, grupo taxonômico, entre outros. O uso de uma única região delimitada para qualquer grupo pode não ser adequado para o táxon de interesse ou para responder suas questões evolutivas. Nós examinamos os padrões de divergência nucleotídica intra e interespecíficas no gene COI de eglídeos e obtivemos: perfis de divergência variáveis ao longo de todo COI; possível padrão de evolução na região de Jerry-Pat; ausência de pressões evolutivas por divergência concentrada; sobreposição de divergência intraespecífica com interespecífica; sugestão de nova região para acessar a diversidade total de COI em eglídeos. Concluimos que a região de *barcoding* não reflete a evolução do gene mitocondrial COI.

Palavras-chave: *Aegla*, COI, DNA *barcoding*, divergência nucleotídica

Does the barcode region reflect the evolution of the mitochondrial gene COI in Aegliidae (Crustacea, Anomura)?

The COI gene is widely used as a molecular marker, and the region used for DNA barcoding is getting more and more popular to species delimitation and identification. However, the evolution patterns can vary along the genes depending on factors as the gene position in genome and taxonomic group, among others. Using one unique delimited region for all groups may not be suitable to a certain targeted taxon, or to answer its evolutionary questions. We examined the patterns of COI intra- and interspecific nucleotide divergence for aeglid crustaceans and we found variable divergence profiles along the COI gene; a possible evolutionary pattern for the Jerry-Pat region; lacking of evolutionary pressures by concentrated divergence; intra- and interspecific divergence levels overlap, but no overlapping in substitution profiles along the gene; a putative new COI region to access the total COI diversity in aeglids.

Key words: *Aegla*, COI, DNA *barcoding*, nucleotide divergence

1 Introdução

Estudos de organismos através de abordagens moleculares são crescentes, não apenas por pesquisadores do ramo, mas por áreas tangentes que veem nas análises moleculares alternativas complementares para responder questões ecológicas, comportamentais e principalmente morfológicas. Análises moleculares podem preencher lacunas que a morfologia por si só não resolve, tais como relações filogenéticas, estruturas populacionais, classificação de espécies conhecidas ou grupos complexos e delimitação de espécies crípticas.

O gene mitocondrial da enzima citocromo c oxidase subunidade I (COI) vem sendo usado com bastante frequência em estudos de relações filogenéticas por apresentar regiões variáveis suficientes para análises de grupos taxonomicamente relacionados (SAHLS & NYBLOM, 2000). No entanto, a utilização do COI cresceu exponencialmente após Hebert et al. (2003a) recomendarem a utilização do DNA *barcoding*, um “sistema global para bioidentificação de animais” que utiliza um fragmento específico de aproximadamente 600 pb do gene COI como um “código de barras” para identificação de espécies, com a perspectiva de uma capacidade de identificação sustentável.

Porém, esse método de classificação tem gerado inúmeras críticas quanto à identificação de espécies por não considerar outros critérios como morfológicos, comportamentais, número e eficiência do marcador. A utilização de um fragmento único de 600 pb, sem levar em conta que os padrões de evolução dentro do gene podem ser variáveis e as escolhas do gene e do tamanho de fragmento que será analisado também podem variar conforme o organismo de interesse ou a questão evolutiva a ser respondida, também são questionamentos levantados por diversos autores (MORITZ & CICERO, 2004; WILL & RUBINOFF, 2004; EBACH & HOLDREGE, 2005; MEYER & PAULAY, 2005; LARSON, 2007; BUHAY, 2009; DAVISON et al., 2009).

No entanto, Avise (1994) lembra que a grande maioria das análises moleculares e filogenéticas são estabelecidas com base na morfologia. Quando o grupo alvo é altamente diverso e não compartilha caracteres morfológicos derivados, as relações filogenéticas e evolutivas podem ser subestimadas. Conforme colocado por Robe (2008), os dados moleculares são extremamente valiosos para esses casos por considerar inúmeros caracteres informativos filogeneticamente, capazes de revelar relações previamente obscuras. Portanto, para grupos complexos como os eglídeos a escolha de um marcador ideal não é suficiente para a acurácia dos dados, também é necessário levar em conta as lacunas morfológicas.

Os caranguejos de água doce do gênero *Aegla* (Decapoda, Anomura) são endêmicos da região Neotropical da América do Sul, sendo os macroinvertebrados mais amplamente distribuídos, e podem ser considerados indicadores de qualidade do habitat (BOND-BUCKUP & BUCKUP 1994; JARA 1996). Seus aspectos biológicos, ecológicos e filogenéticos são bem compreendidos (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994; PÉREZ-LOSADA et al., 2002c, 2004, 2009; BOND-BUCKUP et al., 2008, 2010; SANTOS et al., 2012). Porém, estudos populacionais apontam que o número atual de espécies possa ser subestimado devido à possível ocorrência de espécies crípticas (BITENCOURT, 2007; BARTHOLOMEI-SANTOS et al., 2011; HAUSCHILD, 2011).

A identificação de espécies crípticas é fundamental para o conhecimento da diversidade biológica, preenchendo lacunas taxonômicas e ecológicas, visando também a conservação das espécies (ROKAS et al., 2003; HEBERT et al, 2004; RISSLER, 2007; WARD et al., 2009). Portanto, é necessário testar a acurácia do gene mitocondrial COI para a delimitação de espécies em eglídeos e assim, futuramente, tentar preencher as lacunas existentes entre taxonomia e filogenética.

O objetivo deste trabalho foi verificar o padrão de evolução do gene mitocondrial COI na família Aeglidae, comparando as divergências intra e interespecíficas entre sequências de diversas espécies, e também, verificar se a região comumente mais utilizada para DNA *barcoding* é a mais informativa neste grupo de crustáceos.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta de dados

Foram obtidas 234 sequências parciais (de 800 pb a 1274 pb) de COI representantes de 58 espécies, incluindo duas subespécies, do gênero *Aegla* depositadas no banco de dados GenBank até dezembro de 2012 (Apêndice A). Para alinhar as sequências com a posição correta no gene, foi obtida uma sequência completa de COI (1545 pb) de *Mus musculus* (retirada do banco de dados BOLD - Barcode of Life Database, sob número de acesso GTENK017-11). O alinhamento no sentido 5'→3' estabeleceu, para as sequências de eglídeos, a região de DNA *barcoding* na posição 1-639 pb e a região de Jerry-Pat na posição 618-1214 pb, alinhadas as posições 67-705 pb e 684-1280 pb, respectivamente, em *M. musculus* (ROE

& SPERLING, 2007; ROBE et al., 2012). Também alinhamos às sequências de *M. musculus* sequências de dois pares de *primers* amplamente utilizados, específicos para eglídeos (XU et al., 2009) e universais (FOLMER et al., 1994) para verificar as regiões de abrangência dos *primers*. Todos os alinhamentos foram realizados no programa MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011).

Para fins de análises interespecíficas, selecionamos 14 pares de espécies irmãs com base nas relações filogenéticas apresentadas por PÉREZ-LOSADA et al. (2004) (ANEXO A), no estudo mais completo para o gênero *Aegla*, analisando genes mitocondriais e nucleares. Desconsideramos espécies com sequências únicas ou idênticas para análises intraespecíficas, totalizando 38 espécies avaliadas.

2.2 Análises de *Sliding window*

Para estimar os padrões de divergência nucleotídica ao longo do gene COI utilizamos a análise de *sliding window* (janela deslizante) implementada no programa DnaSP 5.10.1 (LIBRADO & ROZAS, 2011). Estabelecemos um comprimento de 600 pb para as janelas e um passo (deslize) a cada 5 pb, possibilitando melhor visualização das alterações nucleotídicas nas sequências. O tamanho de janela é ideal para comparar as regiões da análise com o tamanho do fragmento de DNA *barcoding*.

Avaliamos a diversidade nucleotídica (π) dentro das espécies e a divergência nucleotídica entre as espécies através do número de substituições por sítios entre populações (Da) (NEI, 1987; LIBRADO & ROZAS, 2011). Para as duas análises calculamos os pontos máximos e mínimos de divergência no fragmento total e em cada região do gene COI - *Barcoding* e Jerry-Pat.

Após a obtenção dos perfis intraespecíficos e interespecíficos testamos possíveis sobreposições desses perfis através de plotagem dos gráficos.

2.3 Randomizações

Para verificar a presença de divergência concentrada, ou seja, possíveis *hot spots* mutacionais, geramos sequências randômicas dos pares de espécies irmãs para comparar com os perfis das sequências originais. A hipótese de divergência concentrada em determinada

região pode ser aceita se os perfis originais extrapolarem significativamente a distribuição das sequências geradas aleatoriamente.

O programa jModeltest 2.0.2 (POSADA, 2008; GUINDON & GASCUEL, 2003) foi utilizado para identificar o modelo apropriado, usando testes hierárquicos de razão de verossimilhança. Uma árvore de verossimilhança ($-\ln L = 7468.9104$) foi obtida a partir de uma análise das sequências dos pares de espécies irmãs utilizando o modelo GTR + I + G: frequência de bases A = 0,3027, C = 0,1331, G = 0,1457, T = 0,4185; taxas de substituição AC = 5,0038, AG = 34,3376, AT = 2,1419, CG = 2,0297, CT = 25,6557, GT = 1,0000; parâmetro de correção gamma = 0,7560; proporção de sítios invariáveis = 0,6070. A partir dos parâmetros da árvore obtida, 50 conjuntos de sequências aleatórias foram geradas no programa Mesquite (MADDISON & MADDISON, 2011) usando o modelo e especificações acima e comprimento de ramo de 0,1.

Três pares de espécies irmãs (*A. affinis* X *A. neuquensis*, *A. uruguayana* X *A. rossiana*, *A. prado* X *A. violacea*) foram submetidos às análises de *sliding window* para cada simulação dos 50 conjuntos. Os perfis de divergência nucleotídica das sequências aleatórias foram comparados aos não-aleatórios para identificar possíveis regiões de divergência acima da divergência aleatória média ($n = 50$) e do limite de 95% de confiança.

2.4 Divergência nucleotídica localizada como indicadora da divergência total de COI

Através dos valores de divergência nucleotídica (D_a = número de substituições por sítios entre populações) foi possível avaliar se uma janela pode conter uma divergência representativa de todo o gene COI. Primeiramente, submetemos os pares de espécies irmãs às análises de *sliding window* do DNAsp novamente, mas considerando os sítios com gaps. Calculamos a razão entre a divergência nucleotídica de cada janela pela divergência total da sequência, obtendo a divergência relativa por janela, de modo a permitir a comparação entre pares de espécies com divergências nucleotídicas totais diferentes. Para todos os pares de espécies irmãs calculamos a divergência relativa média (em porcentagem) e desvio-padrão para cada janela.

Possíveis regiões indicadoras da divergência total devem apresentar divergência relativa média de 100% em relação à divergência total e baixo desvio-padrão, indicando variação mínima entre os pares de espécies irmãs.

2.5 Efeito do tamanho do fragmento na estimativa de divergência nucleotídica

Para avaliar o efeito do tamanho do fragmento na estimativa da diversidade nucleotídica do gene, calculamos a divergência nucleotídica para cada tamanho de fragmento dos pares de espécies irmãs e comparamos com divergências relativas calculadas para as análises do item 2.4. Foi utilizada também a Análise de Divergência entre Populações do DNAsp, no entanto não selecionamos a opção de janela deslizante. Começando pela extremidade 5' do COI, foi analisado, um fragmento de 200 pb, aumentando a cada 100 pb até chegar na extremidade 3'. Para cada fragmento foram calculados a divergência média relativa à divergência nucleotídica total e desvio padrão. Ao final foi gerado um gráfico para identificar possíveis fragmentos com estes dois parâmetros estabilizados em relação ao total de divergência do gene COI.

2.6 Análises de saturação do DNA

A análise de saturação de DNA também permite identificar *hot spots* avaliando como os níveis de saturação variam ao longo do gene. Assim, é possível examinar a relação entre a divergência nucleotídica e a frequência de saturação de transição ao longo do gene COI para séries de taxa com divergência crescente. As regiões ideais para análise filogenética devem apresentar alta divergência nucleotídica em relação a saturação.

Para estabelecer as séries de espécies com tempos filogenéticos diferentes utilizamos o programa SWAAP 1.0.3 (PRIDE, 2000) para obter as distâncias filogenéticas entre as espécies, utilizando Kimura 2-Parâmetros (KIMURA, 1980) e removendo sítios com *gaps*. Foi selecionado um grupo para cada clado (A, B, C, D, E) estabelecidos por Pérez-Losada et al. (2004), onde uma espécie foi tomada como referência para análise com três espécies em distâncias crescentes filogeneticamente.

A saturação foi estimada segundo Roe & Sperling (2007). A razão Ts/Tv foi convertida em porcentagem de transições (%Ts) para evitar valores indefinidos quando $Tv = 0$. As análises de *sliding window* e as razões Ts/Tv foram calculadas no SWAAP 1.0.3 (janela de 500 pb e passo de 5 pb). Após a conversão em %Ts geramos gráficos representando a proporção de transições e a proporção de divergência nucleotídica para as séries de tempo

filogenético. Regiões de baixa %Ts foram definidas como aquelas onde a %Ts foi menor ou igual a 50% ($Ts/Tv \leq 1$).

3 Resultados

3.1 Diversidade intraespecífica

Das 58 espécies e subespécies analisadas, 20 não foram informativas para a diversidade intraespecífica porque apresentaram haplótipos idênticos ou uma única sequência. As informativas foram altamente variáveis ao longo das regiões analisadas (Tabela 1). Algumas espécies apresentaram mais de uma janela com diversidade máxima (*A. violacea*, *A. marginata*, *A. franciscana*, *A. manni*, *A. inermis*, *A. leptochela*, *A. parana*, *A. schimitii*) e a maioria (20 espécies) apresentou mais de uma janela com diversidade mínima.

A diversidade nucleotídica intraespecífica do gene COI variou de 0,07% (*A. rostrata*) a 4,56% (*A. parana*), com média de 1,57% e desvio padrão de 1,39%. A diversidade mínima entre todas as janelas de 600 pb variou de zero (para 11 espécies) a 3,69% (*A. parana*), com média de 1,17%, enquanto que a diversidade máxima variou de 0,17% (*A. alacalufi* e *A. leptochela*) a 5,17% (*A. parana*), com média de 1,94%.

A região de *barcoding* (BC) apresentou maior diversidade nucleotídica média e em valores máximos absolutos e menor desvio padrão que a região de Jerry-Pat (JP). Porém a variação de diversidade (diferença entre a diversidade maior e a menor) para BC (4,13%) foi abaixo da variação total do gene (4,49%), enquanto em JP (5,17%) a variação foi próxima à de diversidade máxima (5,09%).

As médias de diversidade nucleotídica intraespecífica encontradas para todas as regiões não variam muito entre si, mas apresentam altos valores de desvios-padrão. Apesar da similaridade das médias, há uma grande amplitude de diversidade apresentada ao longo das espécies em cada região analisada.

Os perfis de *sliding window* (Figura 1) evidenciaram essa amplitude de diversidade, sendo variáveis, mostrando que não há um padrão de perfil de diversidade. Apenas *A. abtao* e *A. talcahuano* e, *A. parana* e *A. schimitii* apresentaram perfis similares (indicadas por seta na Figura 1), através de visualização após a sobreposição dos gráficos. Não houve evidência de diversidade concentrada em qualquer região.

Tabela 1 – Diversidade nucleotídica intraespecífica (π em %) para as 38 espécies com múltiplos espécimes (N)

Espécie	N	Total	Mín	PM	Máx	PM	BC Mín	PM	BC Máx	PM	JP	PM
<i>A. cholchol</i>	43	1,11	0,58	751	1,33	460	1,20	427	1,29	440	0,89	724
<i>A. rostrata</i>	42	0,07	0,04	656;659	0,08	741	0,06	437-447	0,07	427-435	0,07	724
<i>A. jarai</i>	10	2,47	1,93	430	2,82	840	1,94	430	2,17	437	2,78	893
<i>A. platensis</i>	9	3,08	2,70	755	3,40	452	3,08	437	3,30	424	3,03	892
<i>A. abtao</i>	6	1,67	1,00	416	2,00	840	1,07	416	1,44	424	1,98	915
<i>A. violacea</i>	5	2,08	1,70	605;610	2,40	730-740	1,99	429	2,36	439	2,06	892
<i>A. affinis</i>	4	0,13	0	780-840	0,22	451	0,19	469	0,22	451	0,09	903
<i>A. camargoi</i>	4	2,85	2,00	960	4,00	819	2,85	429	3,13	432	2,80	913
<i>A. grisella</i>	4	3,70	2,78	580-595	3,86	918	3,63	434	3,84	439	3,72	893
<i>A. marginata</i>	4	3,69	3,25	615-635	4,49	799;804	3,41	424	4,06	439	3,70	912
<i>A. castro</i>	3	2,51	1,89	780;785	3,03	424	2,72	444	3,03	424	2,80	913
<i>A. franciscana</i>	3	2,11	1,67	550; 585-620	2,44	820;835	1,79	434	1,94	437	2,30	905
<i>A. intercalata</i>	3	3,51	3,00	427	4,00	920	2,89	427	3,05	439	3,83	902
<i>A. ligulata</i>	3	2,82	0,11	810-895	0,57	424	0,51	444	0,57	424	0,11	905
<i>A. longirostri</i>	3	2,94	2,22	940;945	4,08	444	3,55	427	4,08	444	2,67	915
<i>A. manni</i>	3	1,04	1,00	461	1,33	615 640-720	1,06	416	1,22	419	1,00	915
<i>A. talcahuano</i>	3	3,74	2,82	453	4,39	961	2,84	428	3,08	435	4,33	915
<i>A. scamosa</i>	3	2,69	2,23	834-369	3,11	610	2,83	437	3,06	444	2,56	902
<i>A. serrana</i>	3	2,28	1,56	809-819	3,41	424	3,23	444	3,41	424	1,79	915
<i>A. strinatii</i>	3	1,72	1,11	955	2,62	452	2,08	424	2,44	439	1,56	915
<i>A. alacalufi</i>	2	0,10	0	442-685	0,17	690-966	0	442-462	0	442-462	0,17	915
<i>A. araucaniensis</i>	2	0,49	0,17	765;770	0,74	429	0,50	426	0,74	429	0,50	915
<i>A. concepcionensis</i>	2	0,11	0	426-436 900-923	0,27	438	0	426-436	0,27	438	0,18	893
<i>A. d. lacustris</i>	2	0,10	0	414-815	0,18	961	0	414-464	0	414-464	0,17	915
<i>A. inermis</i>	2	0,10	0	855-930	0,28	424	0,25	444	0,28	424;429	0	915
<i>A. jujuyana</i>	2	0,21	0	845-933	0,57	424	0,51	444	0,57	424	0	903
<i>A. leptochela</i>	2	0,10	0	424-840	0,17	845-966	0	424-444	0	424-444	0,17	894
<i>A. leptodactyla</i>	2	0,87	0,60	921	1,21	497	1,02	444	1,14	424	0,72	894
<i>A. neuquensis</i>	2	0,11	0	449-574	0,19	923-933	0	449-469	0	449-469	0,17	903
<i>A. obstipa</i>	2	0,42	0,17	550-635	0,67	665-845	0,25	444	0,28	424;429	0,52	903
<i>A. odebrechti</i>	2	0,33	0	831-924	0,85	424	0,76	444	0,85	424	0	894
<i>A. parana</i>	2	4,56	3,69	424	5,17	910-920	3,69	424	4,13	442	5,17	915
<i>A. paulensis</i>	2	0,79	0,33	955	1,47	452	1,00	429	1,36	432	0,50	915
<i>A. perobae</i>	2	0,10	0	830-966	0,28	424	0,25	444	0,28	424-429	0	915
<i>A. plana</i>	2	0,21	0	424-620	0,39	933	0	424-444	0	424-444	0,35	903
<i>A. sanlorenzo</i>	2	1,70	0,88	908	2,92	437	2,49	429	2,92	437	1,04	903
<i>A. schimittii</i>	2	2,88	1,61	434	3,83	915;920	1,61	434	1,86	437	3,83	915
<i>A. spinosa</i>	2	0,43	3,34	640-870	0,81	497	0,51	445	0,57	425	0,36	893
MÉDIA		1,57	1,17		1,94		1,47		1,66		1,52	
D. PADRÃO (\pm)		1,39	1,21		1,62		1,27		1,39		1,54	

Total: diversidade total de COI; Mín: diversidade mínima em janelas ao longo da sequência; Máx: diversidade máxima em janelas ao longo da sequência; PM: ponto médio das localizações de mínima e máxima diversidade.; BC: região de *barcoding*; JP: região de Jerry-Pat; (-) entre PMs representa um intervalo entre os PMs; (;) entre PMs separa PMs.

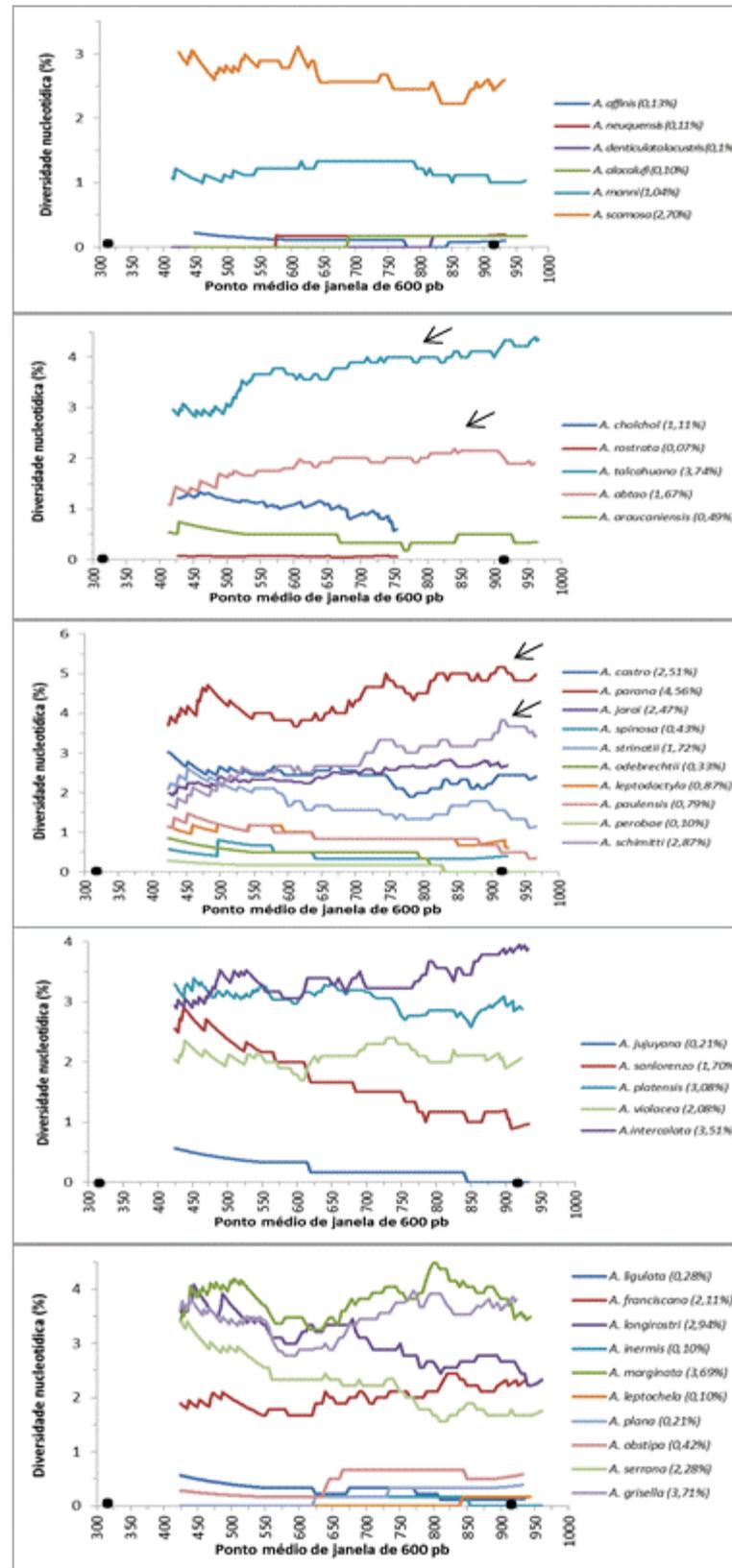


Figura 1 – Perfis de *sliding window* (janela de 600 pb e passo de 5 pb) da diversidade nucleotídica intraespecífica do gene COI para espécies de *Aegla* agrupadas por clados (do basal ao mais derivado, de acordo com a filogenia de Perez-Losada et al., 2004). Pontos pretos no eixo x representam os pontos médios das regiões de BC e JP, respectivamente. Diversidade total entre parênteses. Setas pretas indicam perfis similares.

3.2 Divergência interespecífica

Os pares de espécies irmãs analisados também apresentaram grande variação de divergências nucleotídicas (Tabela 2). Quatro pares de espécies irmãs apresentaram mais de uma janela com divergência máxima e três pares apresentaram mais de uma com divergência mínima. Nos dois casos as janelas eram contínuas ou próximas, ficando portanto na mesma região do gene.

Dos 14 pares de espécies irmãs, sete apresentaram maior divergência nucleotídica, em valores absolutos, na região de *barcoding* (BC) e as outras sete na região de Jerry-Pat (JP). Porém a região de BC teve maior divergência média enquanto JP apresentou média de divergência menor que a divergência média total.

Comparando as variações de divergência (diferença entre divergência maior e menor), JP teve maior variação (5,69%) enquanto BC teve variação similar (4,89%) à de divergência máxima (4,82%).

Curiosamente, o par de subespécies irmãs (*A. denticulata denticulata* X *A. d. lacustres*) apresentou variação apenas na região de JP (PM 885-961 pb). Já o único par com valores negativos (*A. castro* X *A. parana*) apresentou divergência positiva, embora muito pequena, apenas em uma região (PM 499-504 pb) compreendida dentro da região de BC.

Os perfis de *sliding window* dos pares de espécies irmãs (Figura 2), assim como os perfis intraespecíficos, foram altamente variáveis. No entanto, sete pares (os de maior divergência na região de Jerry-Pat, indicados por setas na Figura 2) parecem seguir um mesmo perfil de divergência nucleotídica em que, apesar da escala de divergência, seus valores aumentam após os pontos médios de 600 pb - 650 pb. Os demais pares não parecem seguir um perfil de divergência.

Também plotamos cada gráfico de divergência interespecífica com os de diversidade intraespecífica para verificação visual de possíveis sobreposições de perfis (dados não amostrados). Não houve sobreposição de perfil para nenhuma das espécies utilizadas nas duas análises, porém 10 espécies (*A. jarai*, *A. abtao*, *A. castro*, *A. franciscana*, *A. ligulata*, *A. longirostri*, *A. talcahuano*, *A. strinatii*, *A. parana*, *A. sanlorenzo*) apresentaram maior diversidade intraespecífica do que divergência interespecífica (Tabelas 1 e 2).

Tabela 2 – Divergência nucleotídica interespecífica (Da em %) para os 14 pares de espécies irmãs

Pares de espécies irmãs	Total	Mín.	PM	Máx.	PM	Mín. BC	PM	Máx. BC	PM	JP	PM
<i>A. affinis</i> X	4,05	3,25	820	4,85	469	4,27	451	4,85	464	3,65	903
<i>A. neuquensis</i>			825								
<i>A. d. denticulata</i> X	0,49	0	414-506	0,87	961	0	414-434	0	414-434	0,67	915
<i>A. d. lacustres</i>											
<i>A. abtao</i> X	1,21	0,66	414	1,48	952	0,66	414	0,93	421	1,29	915
<i>A. riolimayana</i>											
<i>A. laevis</i> X	1,70	1,01	505	2,14	961	1,16	428	1,23	430	2,06	915
<i>A. talcahuano</i>											
<i>A. cholchol</i> X	1,88	0,01	749-754	2,64	460	2,26	430	2,59	440	0,96	724
<i>A. rostrata</i>											
<i>A. castro</i> X <i>A. parana</i>	-0,13	-0,33	700-745	0,03	499-504	-0,05	424-434	-0,04	437-444	-0,19	915
<i>A. cavernícola</i> X	1,29	1,04	424	1,78	765 770	1,04	424	1,33	437	1,39	915
<i>A. strinatti</i>											
<i>A. jarai</i> X <i>A. spinosa</i>	0,64	0,41	515	0,80	764-784	0,51	435	0,55	437	0,73	893
<i>A. platensis</i> X	4,37	3,58	755	4,61	442	4,20	429	4,61	442	4,34	892
<i>A. singularis</i>											
<i>A. rossiana</i> X	4,56	3,04	429	5,67	880 910	3,04	429	3,62	442	5,50	915
<i>A. uruguayana</i>											
<i>A. prado</i> X <i>A. violacea</i>	3,48	2,51	912	4,74	439	4,36	429	4,74	439	2,80	892
<i>A. jujuyana</i> X	0,64	0,37	923	0,98	452	0,76	444	0,84	427	0,52	903
<i>A. sanlorenzo</i>											
<i>A. franciscana</i> X	1,43	0,89	547	1,71	935	1,19	444	1,33	424	1,53	905
<i>A. ligulata</i>											
<i>A. inermis</i> X	2,50	1,87	954	3,49	497	3,03	424	3,27	427	2,22	915
<i>A. longirostri</i>											
MÉDIA	2,01	1,31		2,56		1,89		2,13		1,96	
D. PADRÃO (±)	1,54	1,31		1,80		1,61		1,78		1,61	

Total: diversidade total de COI; Mín: diversidade mínima em janelas ao longo da sequência; Máx: diversidade máxima em janelas ao longo da sequência; PM: ponto médio das localizações de mínima e máxima divergência; BC: região de *barcoding*; JP: região de Jerry-Pat; (-) entre PMs representa um intervalo entre os PMs.

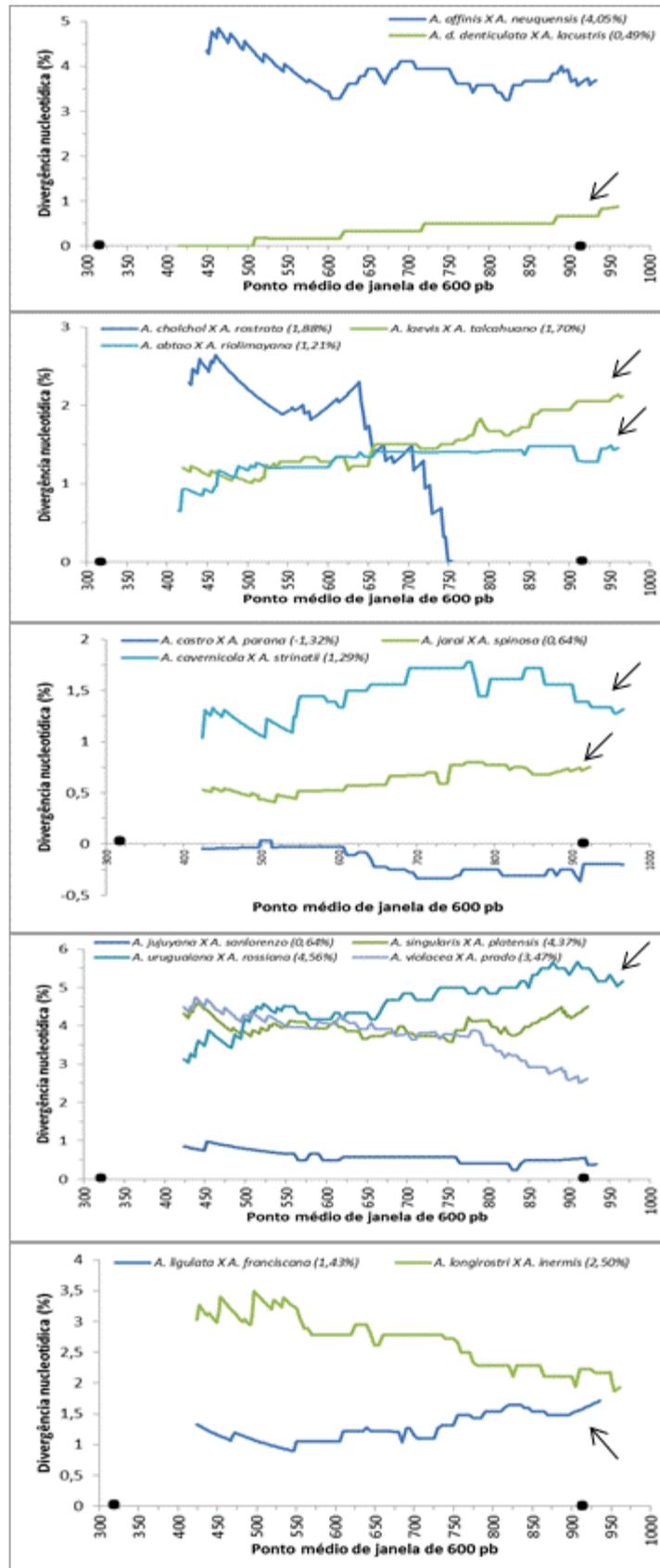


Figura 2 – Perfis de *sliding window* (janela de 600 pb e passo de 5 pb) de divergência nucleotídica interespecífica para o gene COI em 14 pares de espécies irmãs agrupadas por clados (do basal ao mais derivado, de acordo com a filogenia de Perez-Losada et al., 2004). Pontos pretos no eixo x representam os pontos médios das regiões de BC e JP, respectivamente. Divergência total entre parênteses. Setas pretas indicam perfis similares.

3.3 Randomizações

As comparações de três perfis de pares de espécies irmãs com os perfis randomizados (Figura 3) mostraram que os perfis estão dentro da distribuição dos perfis aleatórios. Dois perfis estão inteiramente dentro do intervalo de confiança de 95%. O perfil original de *Aegla uruguayana* X *A. rossiana* apresenta sua porção inicial (5') abaixo do intervalo de confiança e dos perfis randômicos que excederam o intervalo, além de apresentar toda a sequência abaixo da divergência aleatória média. Somente o perfil real de *A. prado* X *A. violacea* ficou acima da divergência média, mas não excedeu o intervalo de confiança.

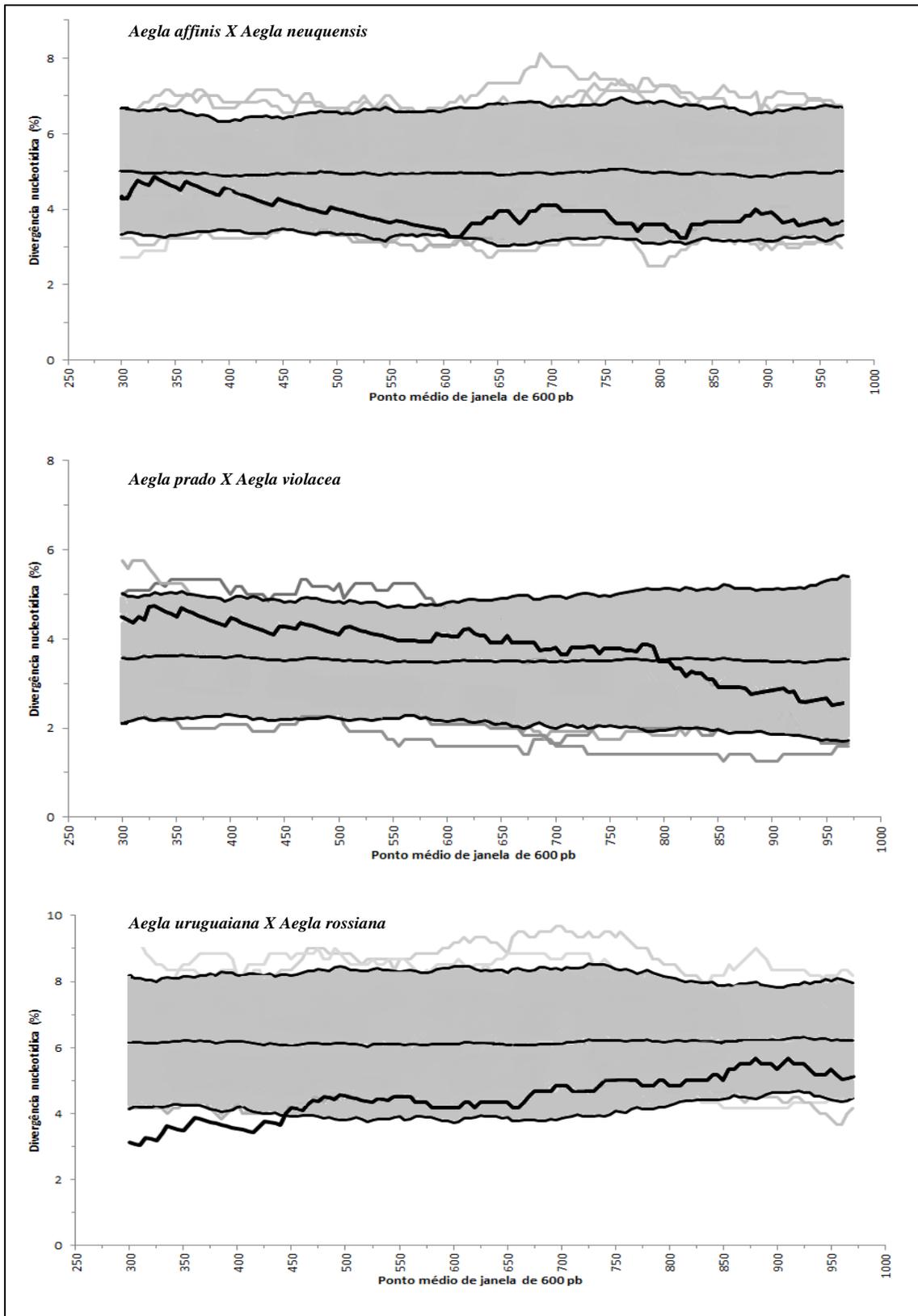


Figura 3 - Perfis de *sliding window* para três pares de espécies irmãs e 50 perfis gerados aleatoriamente para cada par. Perfil original (linha em negrito), divergência média dos perfis aleatórios (linha central em preto), intervalos de confiança de 95% dos perfis aleatórios (região sombreada), e perfis aleatórios que excedam o intervalo de confiança (linhas em cinza).

3.4 Divergência nucleotídica localizada como indicadora da divergência total de COI

O gene COI apresentou divergências relativas variáveis (Figura 4). A divergência relativa média para cada janela variou de 116,25% (ponto médio = 745 pb) a 80,44% (PM = 500 pb), com desvio padrão de $\pm 50,78\%$ (PM = 910 pb) a $\pm 15,56\%$ (PM = 620 pb). Embora nenhuma região tenha apresentado simultaneamente os dois critérios para uma região ótima, as janelas com pontos médios de 640 pb a 660 pb foram as que mais se aproximaram da divergência total com menores desvios-padrão. Dentro dessa região, nós estabelecemos a janela de 351-950 pb (PM = 650 pb) como indicadora da divergência total do gene. Apesar de não apresentar o menor desvio-padrão (24,66%), ele está entre os mais baixos e a divergência média (100,03%) é a que mais se aproxima da divergência total.

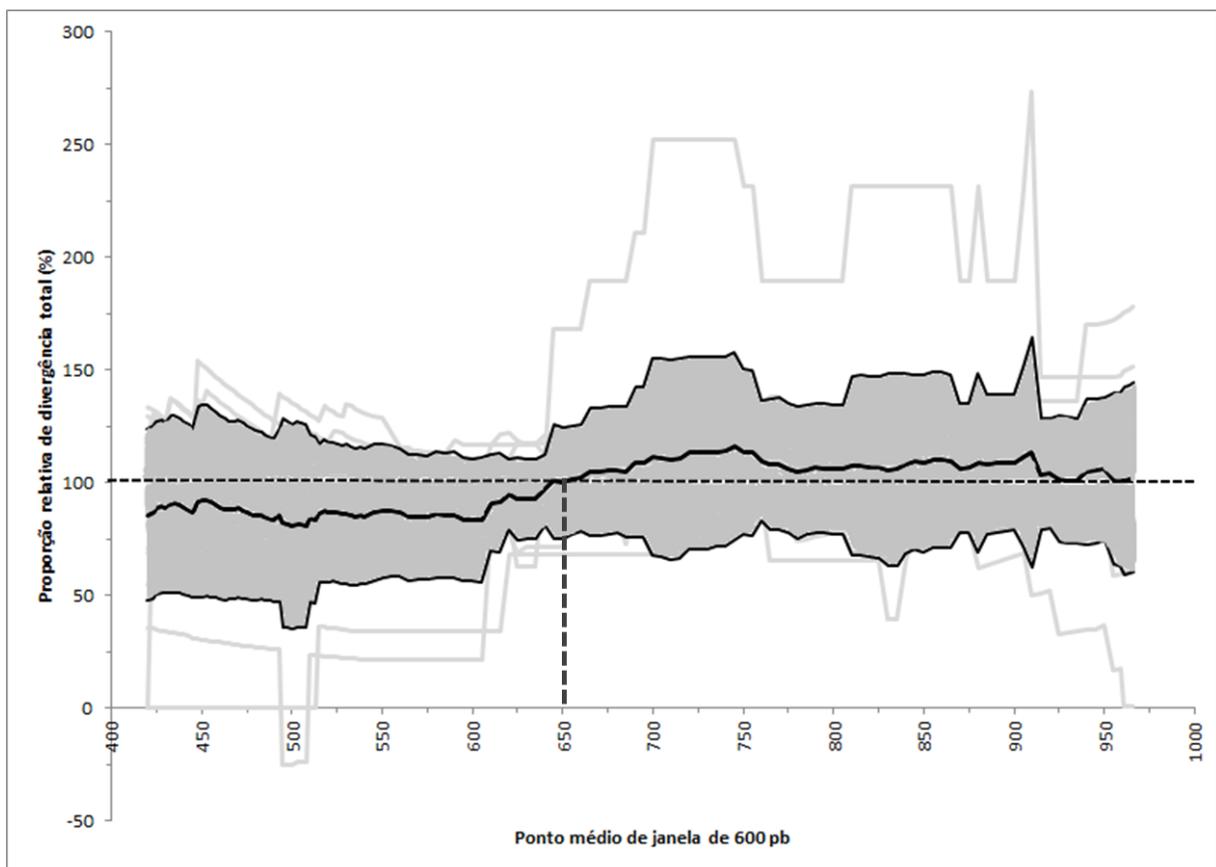


Figura 4 - Perfis de *sliding window* de divergência relativa média (em negrito) e desvio padrão de ± 1 (sombreado) para os 14 pares de espécies irmãs. Os perfis individuais (linhas em cinza) mostram pares que ultrapassaram a zona de ± 1 DP. A linha pontilhada (vertical) indica o PM da janela sugerida.

3.5 Efeito do tamanho do fragmento na estimativa de divergência nucleotídica

O gráfico gerado (Figura 5) para verificar a influência do tamanho do fragmento na estimativa de divergência nucleotídica é claro. Até 500 pb a variância é muito grande e as divergências instáveis (de 0 a 83%). A partir de 600 pb a variância diminui drasticamente e as divergências não apresentam diferenças significativas entre 600 pb e 900 pb. Fragmentos com 1000 pb ou mais tendem a apresentar pouca variância até zerar e aumentar a divergência relativa até alcançar 100%.

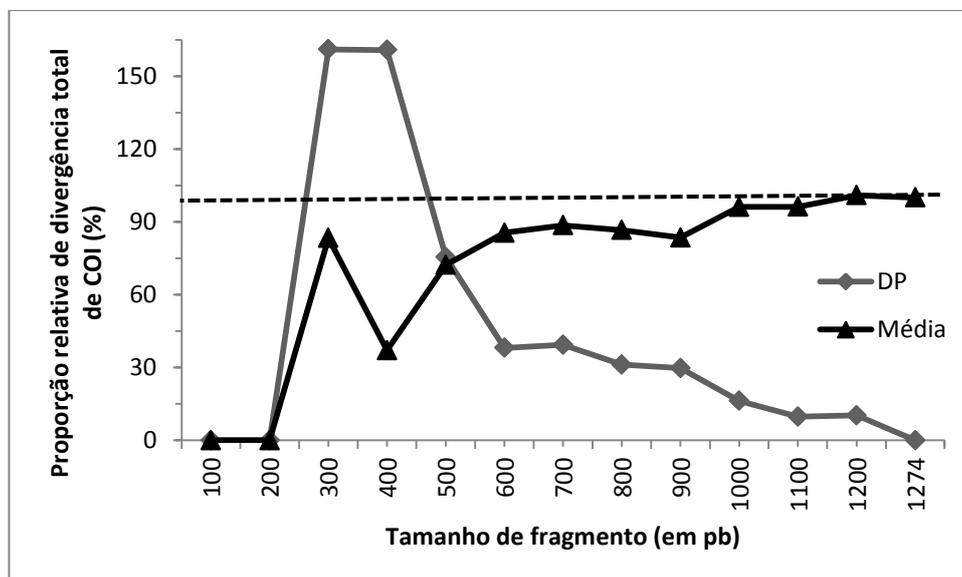


Figura 5 – Média de divergência nucleotídica relativa e desvio padrão (DP) de fragmentos de comprimentos crescentes a partir da extremidade 5' de COI. Linha pontilhada marca 100% de divergência.

3.6 Análises de saturação de DNA

Cinco espécies foram usadas como referência para a análise de saturação, comparando-as com outras espécies do mesmo clado, em ordem crescente de divergência. Os gráficos gerados (Figura 6) com os perfis de divergência nucleotídica e %Ts para séries de tempos filogenéticos diferentes mostraram padrões distintos. Regiões de máxima informação filogenética foram variáveis em todo o gene e taxa, e não houve um padrão comum nos pares de espécies amostradas. Espera-se, para espécies estreitamente relacionadas, baixa divergência e alta porcentagem de transições. A medida que a distância filogenética entre as espécies aumenta, espera-se que a %Ts diminua enquanto a %Tv aumente. No caso de

saturação, espera-se alta divergência e baixa % de transições [onde baixa %Ts < 50% (razão Ts/Tv < 1)]. A informação filogenética é máxima quando tanto a divergência nucleotídica quanto a %Ts são maximizadas.

Na primeira coluna da figura 6, observa-se que três pares de espécies mais próximas apresentaram baixa divergência nucleotídica ao longo de todo o gene e alta %Ts. O par *A. riolimayana* X *A. abtao*, apesar de apresentar baixa divergência, apresentou regiões do COI com baixas %Ts enquanto que o par *A. camargoi* X *A. odebrechtii*, além de apresentar saturação, também apresentou regiões do gene com alta divergência. Regiões gênicas com %Ts < 50% ocorreram apenas em espécies estreitamente relacionadas (*A. riolimayana* X *A. abtao*, *A. camargoi* X *A. odebrechtii*, *A. grisella* X *A. plana*), não apresentando esse quadro quando analisadas com espécies mais distantes filogeneticamente. Por outro lado, em alguns perfis não ocorre baixa %Ts mesmo com níveis relativamente elevados de divergência (*A. camargoi* e *A. singularis*, com suas espécies mais divergentes).

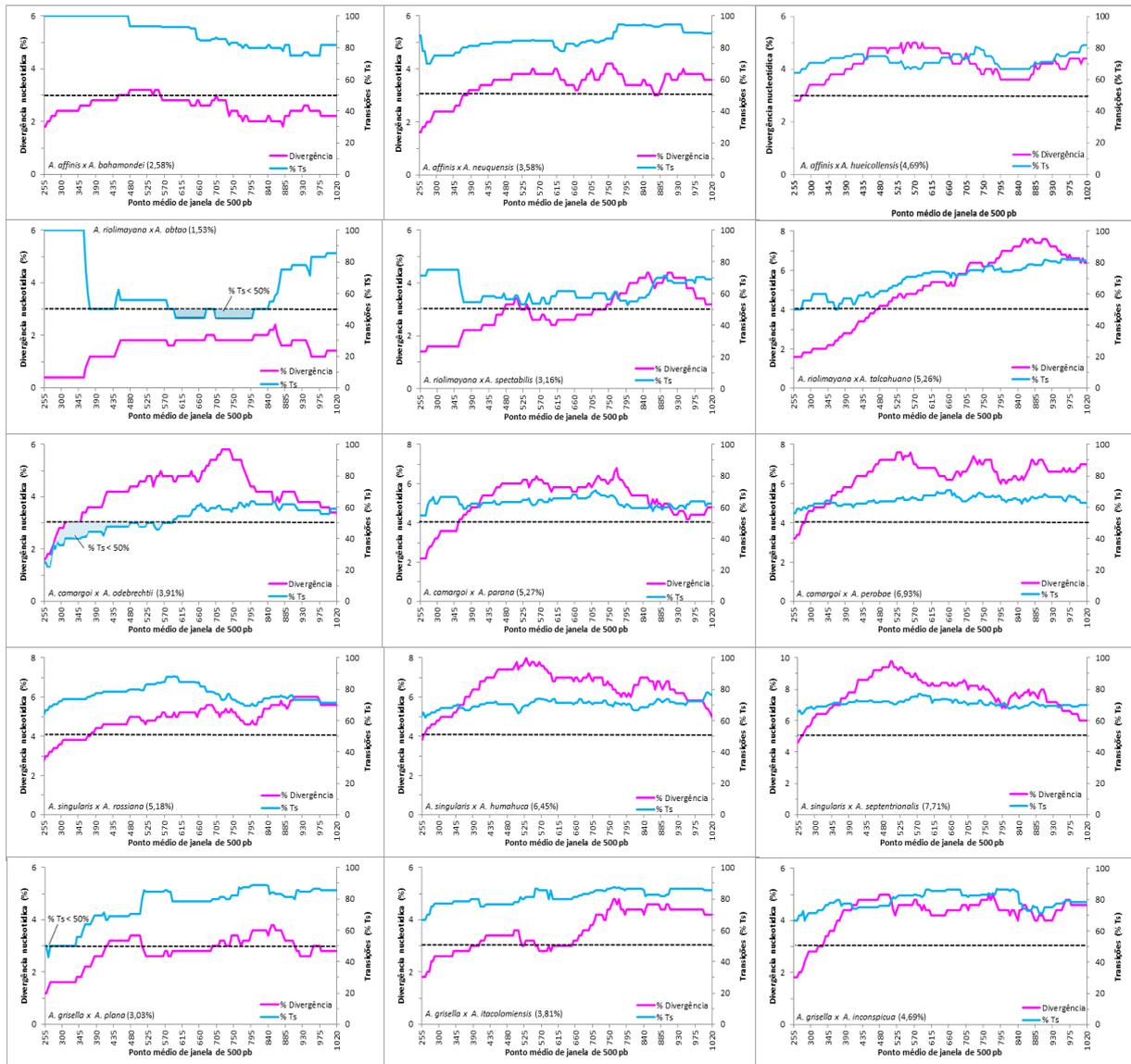


Figura 6 – Séries de tempos filogenéticos em ordem crescente de divergência dispostas a cada coluna. Cada linha apresenta uma espécie de um clado (do basal ao mais derivado) comparada a três espécies com distâncias distintas e crescentes.

4 Discussão

Um amplo estudo em oito filós animais apontou divergências semelhantes ao longo do gene mitocondrial COI (HEBERT et al., 2003b). Porém, nossos dados mostram que as divergências nucleotídicas são heterogêneas ao longo do gene para as espécies de *Aegla*, resultado também encontrado para Diptera e Lepidoptera (ROE & SPERLING, 2007).

Levando em conta que a divergência nucleotídica é um critério primário avaliado para responder questões evolutivas (HEBERT et al., 2003a,b, 2004a,b; TAUTZ et al., 2003;

MONAGHAN et al., 2006; HEIMEIER et al., 2010), o uso indiscriminado de um único fragmento, sem levar em conta a heterogeneidade do grupo em estudo, pode levar a estimativas errôneas de sua diversidade genética. Por isso, avaliamos quatro padrões nucleotídicos: a) diversidade intraespecífica e divergência interespecífica e suas sobreposições; b) presença de *hot spots* mutacionais; c) níveis de divergência relativa ao tamanho e localização do fragmento; e d) saturação do DNA que poderia levar a perda de informatividade filogenética.

Diversidade intraespecífica e divergência interespecífica

Tanto as análises intra quanto as interespecíficas mostraram intervalos de variação ao longo de todo o gene COI (Tabela 1 e 2). Nossos resultados vão de encontro com trabalhos para outros grupos de artrópodos (ROE & SPERLING, 2007; ROBE et al., 2012). A análise interespecífica apontou um possível padrão de divergência na segunda porção do gene (em direção a 3') que engloba a região de Jerry-Pat. Sete dos quatorze pares de espécies irmãs (Figura 2) apresentaram esse padrão, no entanto são necessárias outras abordagens para verificar se o padrão se mantém.

Nossos resultados não apontaram sobreposições de perfis intra e interespecíficos, porém 10 espécies apresentaram maior diversidade intra do que divergência interespecífica (Tabelas 1 e 2). Considerando que o padrão típico de variação para a maioria das espécies deveria ser dado por divergência acentuada e ausência de sobreposição inter e intraespecífica (HEBERT et al., 2003b; MEYER & PAULAY, 2005), nossos dados tangem à questão da divergência acentuada. Das 10 espécies com maior variação intraespecífica, oito já foram estabelecidas como espécies não-monofiléticas em estudos anteriores (PÉREZ-LOSADA et al., 2002b, 2004). Essa questão das espécies parafiléticas levanta a possibilidade de classificação errônea das espécies devido ao embasamento morfológico simplório comparado à diversidade genética. Ainda entre as 10 espécies está o par de espécies irmãs (*Aegla castro* X *Aegla parana*), único a apresentar divergência negativa (Tabela 2). Segundo Nei & Tajima (1981) a divergência entre espécies intimamente relacionadas pode ser negativa quando o n for baixo, portanto isso dá suporte à sua classificação de espécies irmãs. Por outro lado o par também mostra a grande variação dentro do COI, pois mesmo estritamente relacionadas apresentam valores de diversidade (Tabela 1) significativamente distintos e valores máximos em posições opostas do gene.

Hot spots

Embora os perfis de *sliding window* (Figuras 1 e 2) sejam variáveis ao longo de todo o gene, as regiões de alta divergência se mostraram dentro do intervalo de 95% de confiança da divergência média aleatória dos perfis aleatórios (Fig. 3).

Apesar da análise não indicar *hot spots*, algumas evidências tangem à hipótese de evolução ao acaso. Como visto anteriormente, 50% dos pares de espécies irmãs (Fig. 2) apresentaram padrão similar de divergência (a partir de 600-650 pb) mesmo em taxa mais distintos, ocorrendo pelo menos um perfil padrão a cada clado filogenético. As médias de divergência relativa (Fig. 4) aumentam a partir do ponto médio de 645 pb (janela 346-945 pb). Dos 52 valores máximos de divergência (intra e interespecíficos, tabelas 1 e 2), apenas quatro não estão dentro da região estabelecida como ótima (PM: 650 pb, janela 351-950 pb).

Nossos dados vão de encontro aos de Roe & Sperling (2007) que sugerem análises mais aprofundadas através de amostragem significativa e sequências maiores de DNA para minimizar efeitos estocásticos localizados. Essa investigação seria interessante para o gênero *Aegla* devido aos elevados níveis de diversidade intraespecíficos, os baixos níveis de divergência interespecíficos, as possíveis evidências de espécies crípticas e a estruturação populacional (PÉREZ-LOSADA et al., 2002a,b, 2004; BITENCOURT, 2007; BARTHOLOMEI-SANTOS et al., 2011; HAUSCHILD, 2011).

Saturação de DNA

Assim como nas análises de *hot spots*, as análises de saturação (Figura 6) também não apresentaram qualquer evidência de saturação. Regiões de máxima informação filogenética foram variáveis em todo o gene e taxa, e não houve um padrão comum nos pares de espécies amostradas.

Apenas três pares de espécies (*A. riolimayana* X *A. abtao*, *A. camargoi* X *A. odebrechtii*, *A. grisella* X *A. plana*) apresentaram regiões gênicas com %Ts < 50%, sendo essas espécies estreitamente relacionadas e não apresentando esse quadro quando analisadas com espécies mais distantes filogeneticamente. Ao contrário do esperado, um par (*A. riolimayana* X *A. abtao*) apresentou baixa divergência e regiões com baixas %Ts enquanto outro par (*A. camargoi* X *A. odebrechtii*) além de apresentar saturação, também apresentou regiões do gene com alta divergência. Alguns perfis não apresentam baixa %Ts mesmo com

níveis relativamente elevados de divergência (*A. camargoi* e *A. singularis*, com suas espécies mais divergentes).

Tamanho e localização de fragmento para delimitação de espécies

Um fragmento de DNA ideal para *barcoding* é aquele que reflete de forma precisa e consistente a divergência do gene sem ser muito extenso. Nossos dados apresentam janelas com maiores divergências a partir do ponto médio de 620 pb (Fig. 4), sendo a janela de 351-950 pb (PM = 650 pb) a possível indicadora da divergência total do gene (100,03%, $\pm 24,66\%$) para as espécies irmãs. Essa região está localizada a 32 pb após o PM da região de *barcoding* (limite 5') e a 34 pb após o PM de Jerry-Pat (limite 3'). Um indicativo favorável é que 87,5% dos valores máximos de divergência apresentados para os eglídeos tem seus PMs dentro da região proposta. Avaliamos as posições de dois pares de *primers* amplamente utilizados, específicos para eglídeos (XU et al., 2009) e universais (FOLMER et al., 1994). Ambos abrangem mais a região de *barcoding* e estão mais a 5' da região sugerida (dados não mostrados).

Analisando tamanhos de fragmentos (Fig. 5) concluímos que fragmentos de 600 pb são suficientes para eglídeos já que não há variação de divergência significativa entre fragmentos de 600 a 900 pb, embora a variância apresente pequena diminuição. Somente fragmentos \geq a 1000 pb a tendem a atingir a divergência relativa absoluta. Diferentemente dos insetos (ROE & SPERLING, 2007), fragmentos com 600 pb parecem ser bons indicadores de divergência para eglídeos, não havendo necessidade de aumento de tamanho dos fragmentos.

5 Conclusão

A utilização de uma região de 600 pb do gene mitocondrial COI para a identificação e delimitação tem sido controversa, apesar de sua ampla utilização. Os crustáceos eglídeos pertencem a um único gênero, com mais de 70 espécies descritas, algumas em processo de descrição no momento, e ainda possíveis espécies crípticas. A avaliação da utilidade de um fragmento do gene COI para *barcoding* torna-se fundamental para ajudar não somente na delimitação e identificação de novas espécies de eglídeos, mas também para ajudar a responder questões evolutivas sobre o grupo.

Das 58 espécies utilizadas, 38 foram informativas para as análises intraespecíficas e não apresentaram um perfil padrão de diversidade. Para as análises de divergência interespecíficas foram selecionados 14 pares de espécies irmãs, apesar da variabilidade de perfis sete pares parecem seguir um mesmo perfil de divergência. Plotagens de perfis de diversidade X divergência não apresentaram sobreposições de substituições nucleotídicas, apenas sobreposições de níveis de diversidade em relação à de divergência de 10 espécies.

Análises de saturação e randomização evidenciam provável ausência de pressões evolutivas ao longo de todo o gene COI. Já a análise de divergência concentrada sugere uma nova região (351-950 pb, PM 650 pb) de 600 pb para acessar a diversidade total do gene em eglídeos. Também concluímos que o tamanho de fragmento de 600 pb é suficiente para refletir a divergência do gene.

Nossos resultados apontam consistência na taxa evolutiva e no sinal filogenético e, portanto a região sugerida que apresentou uma boa representatividade em relação a diversidade total do gene poderia ser utilizada no lugar da tradicional região de *barcoding*. Nossos dados podem contribuir para futuras análises filogenéticas e evolutivas do gênero *Aegla*, auxiliando na identificação e classificação de eglídeos juntamente com análises morfológicas, ecológicas e comportamentais.

7 Referências bibliográficas

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2ª ed. Sinauer Associates, Sunderland, 684p., 2004.

BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L.; RORATTO, P. A.; SANTOS, S. High genetic differentiation of *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura) populations as revealed by multi-loci microsatellite. **Genetics and Molecular Research**, v. 10 (4), p. 4133-4146. 2011.

BITENCOURT, J.V.T.; RORATTO, P.A.; SANTOS, S.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M.L. Comparison of different methodologies for DNA extraction from *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 989-994, 2007.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. A família Aeglididae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**, v. 32, p. 159-347, 1994.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L.; ARAUJO, P. B. Crustáceos. In: FONTANA, C. S.; BENCKE, G. A.; REIS, R. E. (Org.). **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. EDIPUCRS, Porto Alegre, 2003. 632p.

BOND-BCKUP, G.; JARA, C. G.; PÉREZ-LOSADA, M.; BUCKUP, L.; CRANDALL, K. A. Global Diversity of Crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in Freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 267-273, 2008.

BOND-BUCKUP, G.; JARA, C. G.; BUCKUP, L.; PÉREZ-LOSADA, M.; BUENO, A. A. P.; CRANDALL, K. A.; SANTOS, S. New Species and New Records of Endemic Freshwater Crabs from the Atlantic Forest in Southern Brazil (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 30, n. 3, p. 495-502, 2010.

BÜCKER, F.; GONÇALVES, R.; BOND-BUCKUP, G.; MELO, A. S. Effect of Environmental Variables on the Distribution of Two Freshwater Crabs (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 28, n. 2, p. 248-251, 2008.

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

DAVISON, A.; BLACKIE, R. L. E.; SCOTHERN, G. P. DNA barcoding of stylommatophoran land snails: a test of existing sequences. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1092-1101, 2009.

EBACH, M. C., HOLDREGE, C., DNA barcoding is no substitute for taxonomy. **Nature**, v. 434, p. 697, 2005.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". **Systematic Biology**, v. 52, p. 696-704, 2003.

GOTO, S. G.; KIMURA, M. T. Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear *Gpdh* genes in *Drosophila*. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 18, n. 3, p. 404-422, 2001.

HAUSCHILD, C. B. **Aegla platensis (Schmitt, 1942): um complexo de espécies? Evidências a partir do gene mitocondrial COI**. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A. BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identification through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London - B Biological Sciences**, v. 270, p. 313-321, 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London - B Biological Sciences**, (Suppl.) v. 270, p. S96-S99, 2003b.

HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy Sciences** v.101, p. 14812-14817, 2004a.

HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. **Public Library of Science Biology**, v. 2, n. 10, p. 1657-1663, 2004b.

HEIMEIER, D.; LAVERY, S; SEWELL, M. A. Using DNA barcoding and phylogenetics to identify Antarctic invertebrate larvae: Lessons from a large scale study. **Marine Genomics**, v. 3, p. 165-177, 2010.

JARA, C. **Taxonomía, sistemática y zoogeografía de las especies chilenas del género *Aegla* Leach (Crustacea: Decapoda: Anomura: Aegliidae)**. 1996. PhD thesis, University of Concepción, Chile, 1996.

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

LEARSON, B. M. H. DNA *barcoding*: the social frontier. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 8, p. 437-442, 2007.

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

MADDISON, W.P., MADDISON, D.R. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 1.11, 2004.

MCLAUGHLIN, P. A.; LEMAITRE, 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**, n. 23, p. 131-137, 2010.

MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. **Public Library of Science Biology**, v. 3, n. 12, p. 2229-2238, 2005.

MONAGHAN, M.T. et al. Beyond barcodes: complex DNA taxonomy of a South Pacific island radiation. **Proceedings of the Royal Society of London - B Biological Sciences**, v. 273, p. 887-893, 2006.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. **Public Library of Science Biology**, v. 2, n. 10, e354, 2004.

NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York, 1987.

NEI, M.; TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonuclease. **Genetics**, v. 97, p. 145-163, 1981.

PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C. G.; BOND-BUCKUP, G.; CRANDALL, K. A. Conservation Phylogenetics of Chilean Freshwater Crabs *Aegla* (Anomura: Aeglidae): Assigning Priorities for Aquatic Habitat Protection. **Biological Conservation**, v. 105, p. 345-353, 2002a.

PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C. G.; BOND-BUCKUP, G.; CRANDALL, K. A. Phylogenetic Relationships Among the Species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) Freshwater Crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 2, p. 304-313, 2002b.

PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C. G.; BOND-BUCKUP, G.; PORTER, M. L.; CRANDALL, K. A. Phylogenetic Position of the Freshwater Anomuran Family Aeglidae. **Journal of Crustacean Biology**, v.22, n.3, p. 670-676, 2002c.

PÉREZ-LOSADA, M.; BOND-BUCKUP, G.; JARA, C. G.; CRANDALL, K. A. Molecular Systematics and Biogeography of the Southern South American Freshwater "Crabs" *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) Using Multiple Heuristic Tree Search Approaches. **Systematic Biology**, v. 53, n. 5, p. 767-780, 2004.

PÉREZ-LOSADA, M.; BOND-BUCKUP, G.; JARA, C. G.; CRANDALL, K. A. Conservation Assessment of Southern South American Freshwater Ecoregions on the Basis of the Distribution and Genetic Diversity of Crabs from the Genus *Aegla*. **Conservation Biology**, 2009.

POSADA, D. In press. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. Version 0.1.1, 2008.

PRIDE, D. T. SWAAP Version 1.0.3 - Sliding windows alignment analysis program: a tool for analyzing patterns of substitutions and similarity in multiple alignments. Distributed by the author, 2000.

RISSLER, L. J.; APODACA, J. Adding More Ecology into Species Delimitation: Ecological Niche Models and Phylogeography Help Define Cryptic Species in the Black Salamander (*Aneides flavipunctatus*). **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 924-942, 2007.

ROBE, L. J. Relações **Filogenéticas no Gênero Drosophila (Diptera, Drosophilidae): Uma Abordagem Molecular**. 2008. 303f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ROBE, L. J.; MACHADO, S.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. The DNA Barcoding and the Caveats with Respect to Its Application to Some Species of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda). **Zoological Science**, v. 29, n. 10, p. 714-724, 2012.

ROE, A. D.; SPERLING, F. A. H. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 44, p. 325-345, 2007.

ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOUROS, E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Ecology and Evolution**, v.18, n. 8, p. 411-417, 2003.

SAHLS, G.; NYBLOM, K. Phylogenetic analysis of the genus *Cheilisia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15, p. 235-241, 2000.

SANTOS, S.; AYRES-PERES, L.; CARDOSO, R. C. F.; SOKOLOWICZ, C. C. Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aegliidae). **Journal of Natural History**, v. 42, n. 13-14, p. 1027-1037, 2008.

SANTOS, S.; BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L.; PÉREZ-LOSADA, M.; FINLEY, M.; CRANDALL, K. A. Three New Species of *Aegla* (Anomura) Freshwater Crabs from the Upper Uruguay River Hydrographic Basin in Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 32, n. 4, p. 529-540, 2012.

SATTA, Y.; ISHIWA, H.; CHIGUSA, S. I. Analysis of nucleotide substitutions of mitochondrial DNAs in *Drosophila melanogaster* and its sibling species. **Molecular Biology Evolution**, v. 4, p. 638-650, 1987.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

WARD, R. D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1077-1085, 2009.

WILL, K. W. & RUBINOFF, D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics**, v. 20, p. 47-55, 2004.

XU, J.; PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C. G.; CRANDALL, K. A. Pleistocene glaciation leaves deep signature on the freshwater crab *Aegla alacalufi* in Chilean Patagonia. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 904-918, 2009.

3 CONCLUSÃO

A utilização de uma região de 600 pb do gene mitocondrial COI para a identificação e delimitação tem sido controversa, apesar de sua ampla utilização. Os crustáceos eglídeos pertencem a um único gênero, com mais de 70 espécies descritas, algumas em processo de descrição no momento, e ainda possíveis espécies crípticas. A avaliação da utilidade de um fragmento do gene COI para *barcoding* torna-se fundamental para ajudar não somente na delimitação e identificação de novas espécies de eglídeos, mas também para ajudar a responder questões evolutivas sobre o grupo.

Das 58 espécies utilizadas, 38 foram informativas para as análises intraespecíficas e não apresentaram um perfil padrão de diversidade. Para as análises de divergência interespecíficas foram selecionados 14 pares de espécies irmãs, apesar da variabilidade de perfis sete pares parecem seguir um mesmo perfil de divergência. Plotagens de perfis de diversidade X divergência não apresentaram sobreposições de substituições nucleotídicas, apenas sobreposições de níveis de diversidade em relação à de divergência de 10 espécies.

Análises de saturação e randomização evidenciam provável ausência de pressões evolutivas ao longo de todo o gene COI. Já a análise de divergência concentrada sugere uma nova região (351-950 pb, PM 650 pb) de 600 pb para acessar a diversidade total do gene em eglídeos. Também concluímos que o tamanho de fragmento de 600 pb é suficiente para refletir a divergência do gene.

Nossos resultados apontam consistência na taxa evolutiva e no sinal filogenético e, portanto a região sugerida que apresentou uma boa representatividade em relação a diversidade total do gene poderia ser utilizada no lugar da tradicional região de *barcoding*. Nossos dados podem contribuir para futuras análises filogenéticas e evolutivas do gênero *Aegla*, auxiliando na identificação e classificação de eglídeos juntamente com análises morfológicas, ecológicas e comportamentais.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHYONG, S. T.; SCHNABEL, K. E.; MAAS, E. W. Anomuran Phylogeny: New Insights from Molecular Data. In: **Decapod Crustacean Phylogenetics** / Joel W. Martin. Taylor & Francis Group, New York, p.16-27, 2009.

AHYONG, S. T.; O'MEALLY, D. Phylogeny of the decapoda reptantia: resolution using three molecular loci and morphology. **The Raffles Bulletin of Zoology**. v. 52, n. 2, p. 673-693, 2004.

BARNES, R. D.; RUPPERT, E. E.; FOX, R. S. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª ed. Roca, São Paulo, 1029p., 1996.

BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L.; RORATTO, P. A.; SANTOS, S. High genetic differentiation of *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura) populations as revealed by multi-loci microsatellite. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 4133-4146. 2011.

BITENCOURT, J.V.T.; RORATTO, P.A.; SANTOS, S.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M.L. Comparison of different methodologies for DNA extraction from *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 989-994, 2007.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**, v. 32, p. 159-347, 1994.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L.; ARAUJO, P. B. Crustáceos. In: FONTANA, C. S.; BENCKE, G. A.; REIS, R. E. (Org.). **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. EDIPUCRS, Porto Alegre, 2003. 632p.

BOND-BCKUP, G.; JARA, C. G.; PÉREZ-LOSADA, M.; BUCKUP, L.; CRANDALL, K. A. Global Diversity of Crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in Freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 267-273, 2008.

BOND-BUCKUP, G.; JARA, C. G.; BUCKUP, L.; PÉREZ-LOSADA, M.; BUENO, A. A. P.; CRANDALL, K. A.; SANTOS, S. New Species and New Records of Endemic Freshwater Crabs from the Atlantic Forest in Southern Brazil (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 30, n. 3, p. 495-502, 2010.

BÜCKER, F.; GONÇALVES, R.; BOND-BUCKUP, G.; MELO, A. S. Effect of Environmental Variables on the Distribution of Two Freshwater Crabs (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 28, n. 2, p. 248-251, 2008.

BUCKLIN, A.; STEINKE, D.; BLANCO-BERCIAL, L. DNA *Barcoding* of Marine Metazoa. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, p. 471-508, 2011.

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

CATERINO, M. S.; SPERLING, F. A. H. *Papilio* Phylogeny Based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase I and II Genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 122-137, 1999.

CLARE, E.; KERR, K.; VON KÖNIGSLÖW, T.; WILSON, J.; HEBERT, P. Diagnosing mitochondrial DNA diversity: applications of a sentinel gene approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 66, p. 362-67, 2008.

COSTA, F. O.; DEWAARD, J. R.; BOUTILLIER, J.; RATNASINGHAM, S; DOOH, R. T.; HAJIBABAEI, M.; HEBERT, P. D. N. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal Aquatic Science**, v. 64, p. 272-295, 2007.

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**, v.160 (A), p. 461-466, 2011.

DAVISON, A.; BLACKIE, R. L. E.; SCOTHERN, G. P. DNA barcoding of stylommatophoran land snails: a test of existing sequences. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1092-1101, 2009.

EBACH, M. C., HOLDREGE, C., DNA barcoding is no substitute for taxonomy. **Nature**, v. 434, p. 697, 2005.

EKREM, T.; WILLASSEN, E.; STUR, E. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, p. 530-542, 2007.

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

FELDMANN, R. M.; VEGA, F. L.; APPLGATE, S. P.; BISHOP, G. A. Early Cretaceous Arthropods from the Thayúa Formation at Tepexi de Rodríguez, Puebla, México. **Journal of Paleontology**, v. 72, n. 1, p. 79-90, 1998.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". **Systematic Biology**, v. 52, p. 696-704, 2003.

GOTO, S. G.; KIMURA, M. T. Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear *Gpdh* genes in *Drosophila*. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 18, n. 3, p. 404-422, 2001.

HAUSCHILD, C. B. **Aegla platensis (Schmitt, 1942): um complexo de espécies? Evidências a partir do gene mitocondrial COI**. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A. BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identification through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London - B Biological Sciences**, v. 270, p. 313-321, 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London - B Biological Sciences**, (Suppl.) v. 270, p. S96-S99, 2003b.

HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy Sciences** v.101, p. 14812-14817, 2004a.

HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. **Public Library of Science Biology**, v. 2, n. 10, p. 1657-1663, 2004b.

HEIMEIER, D.; LAVERY, S.; SEWELL, M. A. Using DNA barcoding and phylogenetics to identify Antarctic invertebrate larvae: Lessons from a large scale study. **Marine Genomics**, v. 3, p. 165-177, 2010.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Integrated Principles of Zoology**. 11th ed. McGraw-Hill, New York, 918p, 2001.

JARA, C. **Taxonomía, sistemática y zoogeografía de las especies chilenas del género *Aegla* Leach (Crustacea: Decapoda: Anomura: Aeglidae)**. 1996. PhD thesis, University of Concepción, Chile, 1996.

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

LEARSON, B. M. H. DNA *barcoding*: the social frontier. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 8, p. 437-442, 2007.

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

LUO, A.; ZHANG, A.; HO, S. Y. W.; XU, W.; ZHANG, Y.; SHI, W.; CAMERON, S. L.; ZHU, C. Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. **BMC Genomics**, v. 12, n. 84, p. 1-13, 2011.

MACPHERSON, E.; JONES, W.; SEGONZAC, M. A new squat lobster family of Galatheoidea (Crustacea, Decapoda, Anomura) from the hydrothermal vents of the Pacific-Antarctic Ridge. **Zoosystema**, v. 27, n. 4, p. 709-723, 2005.

MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.75, 2011.

MARTIN, J. W.; ABELE L. G. Phylogenetic relationships of the genus *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae), with comments on anomuran phylogeny. **Journal of Crustacean Biology**, v. 6, p. 576-616, 1986.

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

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

MCLAUGHLIN, P. A.; LEMAITRE, R.; CRANDALL, K. A. Annotated checklist of 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**, n. 23, p. 131-137, 2010.

MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. **Public Library of Science Biology**, v. 3, n. 12, p. 2229-2238, 2005.

MONAGHAN, M.T. et al. Beyond barcodes: complex DNA taxonomy of a South Pacific island radiation. **Proceedings of the Royal Society of London - B Biological Sciences**, v. 273, p. 887-893, 2006.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. **Public Library of Science Biology**, v. 2, n. 10, e354, 2004.

MORRISON, C. L.; HARVEY, A. W., LAVERY, S., TIEU, K., HUANG, Y.; CUNNINGHAM, C.W. Mitochondrial gene rearrangements confirm the parallel evolution of the crab-like form. **Proceedings of the Royal Society of London - B Biological Sciences**, v. 269, p. 345-350, 2002.

NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York, 1987.

NEI, M.; TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonuclease. **Genetics**, v. 97, p. 145-163, 1981.

PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C. G.; BOND-BUCKUP, G.; CRANDALL, K. A. Conservation Phylogenetics of Chilean Freshwater Crabs *Aegla* (Anomura: Aeglidae): Assigning Priorities for Aquatic Habitat Protection. **Biological Conservation**, v. 105, p. 345-353, 2002a.

PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C. G.; BOND-BUCKUP, G.; CRANDALL, K. A. Phylogenetic Relationships Among the Species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) Freshwater Crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 2, p. 304-313, 2002b.

PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C. G.; BOND-BUCKUP, G.; PORTER, M. L.; CRANDALL, K. A. Phylogenetic Position of the Freshwater Anomuran Family Aeglidae. **Journal of Crustacean Biology**, v.22, n.3, p. 670-676, 2002c.

PÉREZ-LOSADA, M.; BOND-BUCKUP, G.; JARA, C. G.; CRANDALL, K. A. Molecular Systematics and Biogeography of the Southern South American Freshwater “Crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) Using Multiple Heuristic Tree Search Approaches. **Systematic Biology**, v. 53, n. 5, p. 767-780, 2004.

PÉREZ-LOSADA, M.; BOND-BUCKUP, G.; JARA, C. G.; CRANDALL, K. A. Conservation Assessment of Southern South American Freshwater Ecoregions on the Basis of the Distribution and Genetic Diversity of Crabs from the Genus *Aegla*. **Conservation Biology**, 2009.

PORTER, M. L.; PÉREZ-LOSADA, M.; CRANDALL, K. A. Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergence times. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, p. 355-369, 2005.

POSADA, D. In press. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. Version 0.1.1, 2008.

PRIDE, D. T. SWAAP Version 1.0.3 - Sliding windows alignment analysis program: a tool for analyzing patterns of substitutions and similarity in multiple alignments. Distributed by the author, 2000.

RISSLER, L. J.; APODACA, J. Adding More Ecology into Species Delimitation: Ecological Niche Models and Phylogeography Help Define Cryptic Species in the Black Salamander (*Aneides flavipunctatus*). **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 924-942, 2007.

ROBE, L. J.; MACHADO, S.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. The DNA Barcoding and the Caveats with Respect to Its Application to Some Species of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda). **Zoological Science**, v. 29, n. 10, p. 714-724, 2012.

ROE, A. D.; SPERLING, F. A. H. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 325-345, 2007.

ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOUROS, E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Ecology and Evolution**, v.18, n. 8, p. 411-417, 2003.

RUBINOFF, D.; CAMERON, S.; WILL, K. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. **Journal of Heredity**, v. 97, p. 581-94, 2006.

- SACCONI, C.; GIORGI, C. D.; GISSI, G.; PESOLE, G.; REYES, A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. **Gene**, v. 238, p. 195-209, 1999.
- SAHLS, G.; NYBLUM, K. Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15, p. 235-241, 2000.
- SANTOS, S.; AYRES-PERES, L.; CARDOSO, R. C. F.; SOKOLOWICZ, C. C. Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). **Journal of Natural History**, v. 42, n. 13-14, p. 1027-1037, 2008.
- SANTOS, S.; BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L.; PÉREZ-LOSADA, M.; FINLEY, M.; CRANDALL, K. A. Three New Species of *Aegla* (Anomura) Freshwater Crabs from the Upper Uruguay River Hydrographic Basin in Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 32, n. 4, p. 529-540, 2012.
- SATTA, Y.; ISHIWA, H.; CHIGUSA, S. I. Analysis of nucleotide substitutions of mitochondrial DNAs in *Drosophila melanogaster* and its sibling species. **Molecular Biology Evolution**, v. 4, p. 638-650, 1987.
- SCHRAM, F. On the Origin of Decapoda. In: **Decapod crustacean phylogenetics** / Joel W. Martin. Taylor & Francis Group, New York, p. 1-13, 2009.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.
- STOECKLE, M. Y.; HEBERT, P. D. N. Barcode of Life: DNA Tags Help Classify Animals. **Scientific American**, v. 299, p. 82-88, 2008.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.
- TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, p. 70-74, 2003.

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

UTHICKE, S.; BYRNE, M.; CONAND, C. Genetic barcoding of commercial Bêche-de-mer species (Echinodermata: Holothuroidea). **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 634-46, 2010.

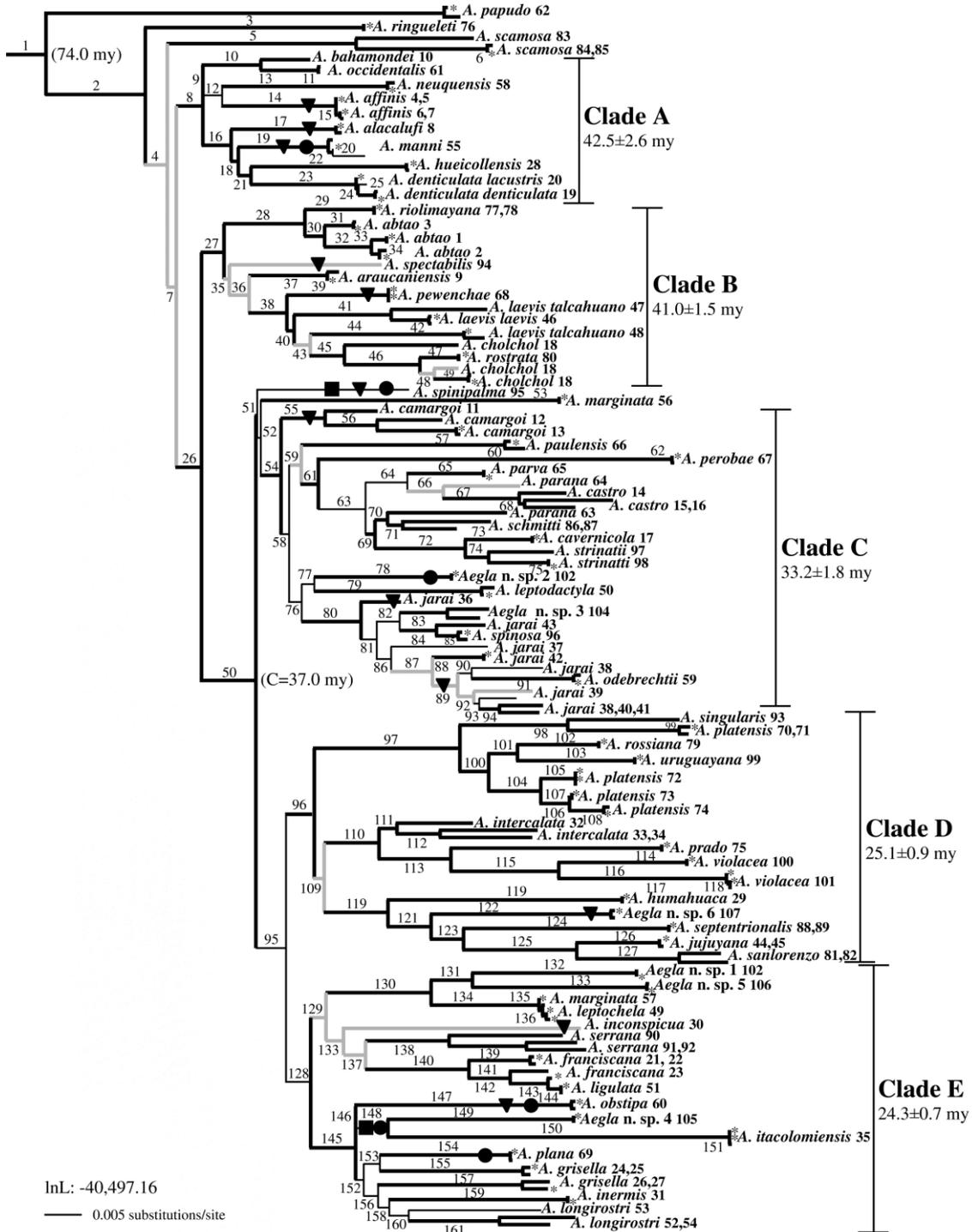
VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 24, n. 2, p. 2-8, 2008.

WARD, R. D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1077-1085, 2009.

WILL, K. W. & RUBINOFF, D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics**, v. 20, p. 47-55, 2004.

XU, J.; PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C. G.; CRANDALL, K. A. Pleistocene glaciation leaves deep signature on the freshwater crab *Aegla alacalufi* in Chilean Patagonia. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 904-918, 2009.

5 ANEXO A – Filogenia de Aeglidae retirada de Pérez-Losada et al. (2004)



6 APÊNDICE A

Lista dos espécimes utilizados.

Espécie	Haplótipo	GenBank
<i>Aegla abtao</i> Schmitt, 1942	KAC-A99	AY050108 ^b
	KAC-A102	AY050109
	KAC-Aa1	AY050110
	KAC-Aa2	AY050111
	KAC-Aa4	AY050112
	KAC-Aa5	AY050113
<i>Aegla affinis</i> Schmitt, 1942	KAC-A13	AY050079 ^b
	KAC-A21	AY050080
	KAC-A33	AY050081
	KAC-A37	AY050082
<i>Aegla alacalufi</i> Jara e López, 1981	KAC-A89	AY050104 ^b
	KAC-A90	AY050105
<i>Aegla araucaniensis</i> Jara, 1980	KAC-A52	AY050088 ^b
	KAC-A56	AY050089
<i>Aegla bahamondei</i> Jara, 1982	KAC-A58	AY050090 ^b
<i>Aegla camargoi</i> Buckup e Rossi, 1977	KACa0215	AY595580 ^c
	KACa0256	AY595589
	KACa0258	AY595590
	KACa0358	AY595620
	KACa0120	AY595561 ^c
<i>Aegla castro</i> Schmitt, 1942	KACa0128	AY595562
	KACa0246	AY595586
	KACa0400	AY595635 ^c
<i>Aegla cavernícola</i> Türkay, 1972	KACa0412	AY595636
	KAC-A68	AY050093 ^b
<i>Aegla cholchol</i> Jara, 1999	KAC-A69	AY050094
	KAC-A70	AY050095
	KAC-A71	AY050096
	KACa1992	HQ236258 ^a
	KACa1993	HQ236259
	KACa1994	HQ236260
	KACa1995	HQ236261
	KACa1996	HQ236262
	KACa1997	HQ236263
	KACa1998	HQ236264
	KACa1999	HQ236265
	KACa2000	HQ236266
	KACa2001	HQ236267
	KACa2002	HQ236268
	KACa2003	HQ236269
KACa2004	HQ236270	
KACa2005	HQ236271	
KACa2006	HQ236272	
KACa2007	HQ236273	

Espécie	Haplótipo	GenBank
	KACa2008	HQ236274 ^a
	KACa2009	HQ236275
	KACa2010	HQ236276
	KACa2011	HQ236277
	KACa2012	HQ236278
	KACa2013	HQ236279
	KACa2014	HQ236280
	KACa2015	HQ236281
	KACa2016	HQ236282
	KACa2017	HQ236283
	KACa2018	HQ236284
	KACa2019	HQ236285
	KACa2021	HQ236286
	KACa2022	HQ236287
	KACa2023	HQ236288
	KACa2024	HQ236289
	KACa2025	HQ236290
	KACa2026	HQ236291
	KACa2027	HQ236292
	KACa2028	HQ236293
	KACa2029	HQ236294
	KACa2030	HQ236295
	KACa2031	HQ236296
<i>Aegla conceptionensis</i> Schmitt, 1942	a692	FJ360704 ^d
	a694	FJ360705
<i>Aegla denticulata denticulata</i> Nicolet, 1849	KAC-A97	AY050106 ^b
	KAC-A98	AY050107
<i>Aegla denticulata lacustris</i> Jara, 1989	KAC-Ad1	AY050114 ^b
	KAC-Ad2	AY050115
<i>Aegla franciscana</i> Buckup e Rossi, 1977	KACa0295	AY595603 ^c
	KACa0301	AY595605
	KACa0309	AY595606
<i>Aegla grisella</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0331	AY595611 ^c
	KACa0336	AY595612
	KACa0339	AY595613
	KACa0350	AY595616
<i>Aegla hueicollensis</i> Jara, 1989	KAC-A84	AY050102 ^b
	KAC-A85	AY050103
<i>Aegla humahuaca</i> Schmitt, 1942	KACa0485	AY595660 ^c
	KACa0487	AY595661
<i>Aegla inconspicua</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0296	AY595604 ^c
<i>Aegla inermis</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0366	AY595621 ^c
	KACa0367	AY595622
<i>Aegla intercalata</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0498	AY595664 ^c
	KACa0508	AY595665
	KACa0520	AY595666
<i>Aegla itacolomiensis</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0281	AY595598 ^c
	KACa0282	AY595599
	KACa0287	AY595600

Espécie	Haplótipo	GenBank
<i>Aegla jarai</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0158	AY595568 ^c
	KACa0165	AY595569
	KACa0169	AY595570
	KACa0180	AY595573
	KACa0201	AY595578
	KACa0210	AY595579
	KACa0221	AY595581
	KACa0229	AY595582
	KACa0272	AY595594
	KACa0273	AY595595
<i>Aegla jujuyana</i> Schmitt, 1942	KACa0434	AY595652 ^c
	KACa0447	AY595653
<i>Aegla laevis</i> Latreille, 1818	KAC-A104	AY050083 ^b
	KAC-A105	AY050084
<i>Aegla talcahuano</i> Schmitt, 1942	KAC-A42	AY050085 ^b
	KAC-A47	AY050086
	KAC-A49	AY050087
<i>Aegla leptochela</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0401	AY595637 ^c
	KACa0402	AY595638
<i>Aegla leptodactyla</i> Buckup e Rossi, 1977	KACa0352	AY595618 ^c
	KACa0353	AY595619
<i>Aegla ligulata</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACali20	AY595555 ^c
	KACali21	AY595556
	KACali22	AY595557
<i>Aegla longirostri</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0315	AY595608 ^c
	KACa0318	AY595609
	KACa0325	AY595610
<i>Aegla manni</i> Jara, 1980	KAC-Am1	AY050116 ^b
	KAC-Am2	AY050117
	KAC-Am3	AY050118
<i>Aegla marginata</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0106	AY595558 ^c
	KACa0108	AY595559
	KACa0407	AY595641
	KACa0417	AY595642
<i>Aegla neuquensis</i> Schmitt, 1942	KACa0528	AY595667 ^c
	KACa0530	AY595668
<i>Aegla obstipa</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0525	AY595645 ^c
	KACa0527	AY595646
<i>Aegla odebrechtii</i> Müller, 1876	KACa0174	AY595571 ^c
	KACa0175	AY595572
<i>Aegla papudo</i> Schmitt, 1942	KAC-A1	AY050077 ^b
	KAC-A7	AY050078
<i>Aegla parana</i> Schmitt, 1942	KACa0139	AY595564 ^c
	KACa0142	AY595565
<i>Aegla parva</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0260	AY595591 ^c
	KACa0262	AY595592
<i>Aegla paulensis</i> Schmitt, 1942	KACa0237	AY595584 ^c
	KACa0238	AY595585
<i>Aegla perobae</i> Hebling and Rodrigues, 1977	KACa0249	AY595587 ^c

Espécie	Haplótipo	GenBank
<i>Aegla pewencha</i> Jara, 1994	KACa0250	AY595588 ^c
	KAC-A79	AY050099 ^b
	KAC-A80	AY050100
<i>Aegla plana</i> Buckup e Rossi, 1977	KAC-A81	AY050101
	KACa0293	AY595601 ^c
	KACa0294	AY595602
<i>Aegla platensis</i> Schmitt, 1942	KACap101	AY595549 ^c
	KACap102	AY595550
	KACap103	AY595551
	KACa0383	AY595627
	KACa0384	AY595628
	KACa0420	AY595643
	KACa0421	AY595644
	KACa0494	AY595662
	KACa0495	AY595663
	KACa0397	AY595633 ^c
<i>Aegla prado</i> Schmitt, 1942	KACa0398	AY595634
	KACa0469	AY595656 ^c
<i>Aegla ringueleti</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0473	AY595657
<i>Aegla riolimayana</i> Schmitt, 1942	KACa0533	AY595548 ^c
	KAC-A75	AY050098 ^b
<i>Aegla rossiana</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0371	AY595623 ^b
	KACa0372	AY595624
<i>Aegla rostrata</i> Jara, 1977	KAC-Ar1	AY050119 ^b
	KAC-Ar4	AY050120
	KACa1952	HQ236218 ^a
	KACa1953	HQ236219
	KACa1954	HQ236220
	KACa1955	HQ236221
	KACa1956	HQ236222
	KACa1957	HQ236223
	KACa1958	HQ236224
	KACa1959	HQ236225
	KACa1960	HQ236226
	KACa1961	HQ236227
	KACa1962	HQ236228
	KACa1963	HQ236229
	KACa1964	HQ236230
	KACa1965	HQ236231
	KACa1966	HQ236232
KACa1967	HQ236233	
KACa1968	HQ236234	
KACa1969	HQ236235	
KACa1970	HQ236236	
KACa1971	HQ236237	
KACa1972	HQ236238	
KACa1973	HQ236239	
KACa1974	HQ236240	
KACa1975	HQ236241	

Espécie	Haplótipo	GenBank
	KACa1976	HQ236242 ^a
	KACa1977	HQ236243
	KACa1978	HQ236244
	KACa1979	HQ236245
	KACa1980	HQ236246
	KACa1981	HQ236247
	KACa1982	HQ236248
	KACa1983	HQ236249
	KACa1984	HQ236250
	KACa1985	HQ236251
	KACa1986	HQ236252
	KACa1987	HQ236253
	KACa1988	HQ236254
	KACa1989	HQ236255
	KACa1990	HQ236256
	KACa1991	HQ236257
<i>Aegla sanlorenzo</i> Schmitt, 1942	KACa0456	AY595654 ^c
	KACa0457	AY595655
<i>Aegla scamosa</i> Ringuélet, 1948	KACaA395	AY595647 ^c
	KACaA404	AY595648
	KACaA416	AY595649
<i>Aegla schmitti</i> Hobbs III, 1979	KACa0134	AY595563 ^c
	KACa0231	AY595583
<i>Aegla septentrionalis</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0423	AY595650 ^c
	KACa0424	AY595651
<i>Aegla serrana</i> Buckup e Rossi, 1977	KACa0264	AY595593 ^c
	KACa0312	AY595607
	KACa0351	AY595617
<i>Aegla singularis</i> Ringuélet, 1948	KACa0347	AY595614 ^c
<i>Aegla spectabilis</i> Jara, 1986	KAC-A73	AY050097 ^b
<i>Aegla spinipalma</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0348	AY595615 ^c
<i>Aegla spinosa</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0199	AY595576 ^c
	KACa0200	AY595577
<i>Aegla strinatii</i> Türkay, 1972	KACa0117	AY595560 ^c
	KACa0404	AY595639
	KACa0405	AY595640
<i>Aegla uruguayana</i> Schmitt, 1942	KACa0394	AY595631 ^c
	KACa0395	AY595632
<i>Aegla violacea</i> Bond-Buckup e Buckup, 1994	KACa0378	AY595625 ^c
	KACa0379	AY595626
	KACavi11	AY595552
	KACavi12	AY595553
	KACavi14	AY595554

^a sequências de Bracken-Grissom et al. (2011), ^b sequências de Perez-Losada and Crandall (2002), ^c sequências de Perez-Losada et al. (2004), ^d sequências de Perez-Losada et al. (2009).