



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR –
PPBM

***Fredius reflexifrons* (Crustacea - Decapoda - Pseudothelphusidae) do Ceará:
análise morfológica e molecular sobre o seu status taxonômico**

LIVANIO CRUZ DOS SANTOS

CRATO - CE
2016

***Fredius reflexifrons* (Crustacea - Decapoda - Pseudothelphusidae) do Ceará:
análise morfológica e molecular sobre o seu status taxonômico**

LIVANIO CRUZ DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri- URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular – Área de concentração em Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Allysson Pontes Pinheiro

CRATO - CE

2016

Santos, Livanio Cruz dos.
S237f *Fredius reflexifrons* (Crustacea - Decapoda -
Pseudothelphusidae) do Ceará: análise morfológica e molecular sobre o
seu status taxonômico/ Livanio Cruz dos Santos. – Crato-CE, 2016.
42p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri- URCA.
Área de concentração em Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Allysson Pontes Pinheiro

1. Caranguejo de água doce; 2. Semiárido Nordeste; 3. Gene
16S RNA; 4. Espécie críptica; I. Título.

CDD: 595.3

LIVANIO CRUZ DOS SANTOS

***Fredius reflexifrons* (Crustacea - Decapoda - Pseudothelphusidae) do Ceará:
análise morfológica e molecular sobre o seu status taxonômico**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Allysson Pontes Pinheiro
(Orientador)

Prof. Dr. Célio Ubirajara Magalhães Filho
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA
(Membro avaliador externo)

Prof. Dr. William Ricardo Amâncio Santana
(Membro avaliador interno)

Prof. Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva
(Membro avaliador suplente)

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pelo dom da vida e por me permitir concluir mais uma etapa da vida acadêmica.

Aos meus familiares em especial aos meus avós por todo apoio e incentivo antes e durante o mestrado.

Ao meu orientador Allysson Pinheiro, por todo apoio e paciência ao longo de todos esses anos de caminhada científica, serei eternamente grato, muito obrigado.

A todo o corpo docente do Mestrado em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA.

Ao prof. Dr. Robson Waldemar pela doação dos espécimes de caranguejos oriundos da região Norte.

Ao prof. Dr. Marcelo Cervini por me acolher em sua residência e pelos valiosos conhecimentos repassados durante minha estada em Jequié/BA.

Ao prof. Dr. William Ricardo Amâncio Santana, pelas valiosas dicas, sugestões e orientações para o engrandecimento desse trabalho.

Ao prof. Dr. Célio Ubirajara Magalhães por me acolher no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia para que pudesse ter acesso a coleção com exemplares de *Fredius reflexifrons*, além de valiosos conhecimentos compartilhados.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela paciência para me ensinar as técnicas moleculares.

Ao Petinha Lira pelo apoio durante as coletas no Município de Ipu, sem ele nunca teríamos conseguido chegar aos Pontos de Coleta.

A toda equipe da Área de Proteção Ambiental da Bica do Ipu por sempre estarem dispostos a nos receber em especial a Paloma, sempre solícita, aos Coordenadores Juliana e Bartolomeu sempre tão atenciosos com nossa equipe e aos vigilantes da APA- Ipu.

Ao Marcelo que nos ajudou a desbravar a Serra da Ibiapaba/Ipu e assim conseguirmos chegar aos pontos de coleta.

A Jéssica (pessoa maravilhosa, mesmo sendo amundiçada) e Damaris por toda ajuda nas coletas, espero que não tenham se arrependido em ir tão longe para a coleta de *Fredius reflexifrons*.

A Whanderson Machado pelas discussões em laboratório, ajuda nas coletas e na confecção dos desenhos, muito obrigado.

A Daniele (que serei eternamente grato), Isis, Mariane e Lucineide por todo apoio, conversas, dicas e broncas ao longo dessa jornada.

A todos os colegas do mestrado turma de 2014, em especial a Nyrreyne Dias, por ser tão alegre fazendo com que o fardo se tornasse leve.

A toda equipe do Laboratório de Crustáceos do Semiárido (Rayury, Rosy, Taiane, Wellington, Geovana, Caio, Kaio, Denis, David e Dauí) da Universidade Regional do Cariri- LACRUSE/URCA pelo companheirismo e por fazer o laboratório uma segunda casa.

A CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição da família Pseudothelphusidae nas Américas Central e do Sul	12
Figura 2- <i>Fredius cf reflexifrons</i> coletado no município de Ipu – CE	13
Figura 3- Localização do Planalto da Ibiapaba.....	17
Figura 4- Demonstração das chuvas orográficas dos brejos de altitude no Nordeste Brasileiro	18
Figura 5- Representação esquemática da molécula circular do genoma mitocondrial, em destaque para o 16S DNA.....	20
Figura 6- A- Sitio Caranguejo. B- Toca de <i>Fredius cf reflexifrons</i> . C- Coleta de esforço manual. D- <i>F. cf reflexifrons</i> recém-capturado.....	22
Figura 7- Alinhamento das sequencias no Software BioEdit	25
Figura 8- Teste para verificação de saturação dos dados obtidos através do software DAMBE (XIA, 2013).....	26
Figura 9- Árvore filogenética baseado no método de maximum Likelihood, no software MEGA, pelo método de HKY +G, sugerido no jmodeltest.	30
Figura 10- Gonópodo de <i>F. cf reflexifrons</i> (CE). A- Visualização mesial. B- visualização lateral. Abreviações- MS: lobo cefálico, AL: lobo auxiliar, CS: espinho cefálico, FAS: campo de espinhos marginais, MEL: lobo mesial, SMA: espinhos marginais, MS: sutura marginal, MES: cerdas mesiais, MAL: lobo marginal. Escala: 10mm.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número e área florestal dos brejos de altitude ocorrentes na Floresta Atlântica Nordeste	16
Tabela 2- Passos da amplificação do gene 16S rRNA	23
Tabela 3- Caranguejos de água doce usados na comparação molecular	24
Tabela 4- Matriz de diferença genética na região 16S incluída no presente estudo	29

***Fredius reflexifrons* (Crustacea - Decapoda - Pseudothelphusidae) do Ceará:
análise morfológica e molecular sobre o seu status taxonômico**

RESUMO

Fredius reflexifrons (Ortmann, 1897) é uma espécie de caranguejo exclusiva de ambientes dulcícolas, com distribuição nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e alguns países da América do Sul como: Peru, Suriname e Guianas. As variações climáticas durante o Pleistoceno favoreceram a espécie se dispersar para o Nordeste Brasileiro. *Fredius cf. reflexifrons* do Ceará possivelmente está isolado por barreiras geográficas das demais espécies do Gênero. Diante disso, há dúvidas quanto ao seu status taxonômico, fazendo com que a integração de técnicas moleculares com a sistemática tradicional venha a ser utilizada para se ter uma caracterização adequada de seus status taxonômico. O presente estudo pretendeu verificar possíveis diferenças morfológicas e moleculares entre *Fredius cf. reflexifrons* encontrado no Ceará e *F. reflexifrons* da região Norte, as análises morfológicas mostraram poucas diferenças entre eles. No entanto, em nível de gonópodo, observou-se um campo de espinhos marginais presentes em todos os espécimes oriundos do Ceará que estão depositados no Laboratório de Crustáceos do Semiárido, não sendo observados nos espécimes depositados na Coleção do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. O gene 16S RNA, mostrou que existe uma diferença de 4% entre *Fredius cf. reflexifrons* do Ceará e *F. reflexifrons* do Pará o que candidata a espécie do Ceará a uma possível espécie críptica.

Palavras-chave: Caranguejo de água doce- Semiárido Nordestino- gene 16S RNA, espécie críptica.

***Fredius reflexifrons* (Crustacea - Decapoda - Pseudothelphusidae) of Ceará:
morphological and molecular analysis about their taxonomic status**

ABSTRACT

Fredius reflexifrons (Ortmann, 1897) is a species of crab exclusive of freshwater group environments, with distribution in the North and Northeast regions of Brazil and some countries in South America as: Peru, Suriname and Guiana. Climatic variations during the Pleistocene favored the specie if disperse for the Brazilian Northeast. *Fredius cf reflexifrons* of Ceará possibly is isolated by geographical barriers of more species of the genus. Therefore, there are doubts as to its taxonomic status, causing the integration of molecular techniques with the traditional systematic come to be used to have an adequate characterization of their taxonomic status. The present study sought to check possible morphological differences and molecular between *Fredius cf reflexifrons* found in Ceará and *F. reflexifrons* in the North region, morphological analyzes showed few differences between them. However, in gonopod level, it was observed a field of spines marginals present in all specimens from the Ceará that are deposited in the Laboratory of Crustaceans Semiarid, Not being observed in the specimens deposited in the Collection of the National Institute for Amazônia Research. The 16S RNA gene, showed that there is a difference of 4% between *Fredius cf reflexifrons* of Ceará and *Fredius reflexifrons* from Para which candidate the species of Ceará to a possible cryptic specie.

Keywords: freshwater crab, semiarid northeast, 16S rRNA, cryptic species.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1.1- Considerações iniciais	11
1.2- <i>Fredius reflexifrons</i>	13
1.3- Teoria dos refúgios	14
1.4- Brejos de altitude	15
1.5- DNA mitocondrial	18
2- OBJETIVO GERAL	21
2.1- Objetivos específicos	21
3- MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1- Coleta de material	22
3.2- Obtenção dos dados moleculares	22
3.3- Edição das sequências	23
3.4- Análise dos dados moleculares	26
3.5- Análises morfológicas	27
4- RESULTADOS	29
4.1- Molecular	29
4.1.1- Distância par a par	29
4.1.2- Cladograma de distância	30
4.2- Morfologia	31
4.2.1- Morfologia externa e do gonópodo	31
5 – DISCUSSÃO	33
5.1- Gene 16S	34
5.2- Análises morfológicas	35
6- CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

INTRODUÇÃO

1.1- Considerações iniciais

Na ordem Decapoda se encontram os grupos mais importantes economicamente dos crustáceos que são os caranguejos, siris, lagostas e camarões; possuem um notável sucesso, que se reflete no número de espécies viventes, no sucesso na colonização de diferentes habitats, repercutindo em uma diversidade de padrões de ciclo de vida e estratégias reprodutivas (MARTIN; DAVIS, 2001; SASTRY, 1983).

A infraordem Brachyura, é composta atualmente por 6793 espécies, 1271 gêneros e subgêneros, 93 famílias e 1781 espécies fósseis sendo o maior grupo entre os crustáceos decápodes (NG et al. 2008; DE GRAVE, 2009).

Os Brachyura são encontrados em ambientes diversos que vão desde fossas submarinas com mais de 6000m de profundidade até em montanhas com mais de 2000 metros de altura (NG et al. 2008). Apesar de serem bastante estudados, não se pode afirmar que o conhecimento sobre este grupo esteja completo ou que se tenha alcançado um patamar que não se possa ultrapassar (ARAÚJO et al. 2014).

Caranguejos de água doce são elementos importantes da biota aquática de riachos, rios, lagos e açudes, tanto pelo aspecto ecológico quanto pelo econômico (MAGALHÃES, 1999 e 2003). Estes obtiveram sucesso na conquista dos ambientes terrestres por sua capacidade de respirar fora da água, fato que se deve ao aumento da cavidade branquial e epibranchial para um maior armazenamento de água; Além disso, apresentam uma grande resistência fisiológica às variações de temperatura (BLISS, 1966).

Entre as adaptações para sobreviver em ambiente terrestre estão, a utilização de respingos d'água como recurso de umidade, utilização de tocas como refúgio de predadores e ambientes desfavoráveis, habilidade para absorver a umidade do substrato e a capacidade de reter grandes quantidades de água antes da ecdise (BLISS, 1968; MACINTOSH, 1988).

Existem seis famílias que englobam caranguejos exclusivamente dulcícolas: Gecarcinucidae Rathbun, 1904, Parathelphusidae Alcock, 1910, Pseudothelphusidae Ortmann, 1893, Pontamidae Ortmann, 1986,

Pontamonautidae Bott, 1970 e Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853 (NG et al. 2008).

Na América Central e do Sul os caranguejos de água doce estão restritos a apenas duas famílias, Pseudothelphusidae e a Trichodactylidae (RODRÍGUEZ, 1981; MAGALHÃES, 2003). Von Prah (1982) cita que as espécies das famílias Trichodactylidae e Pseudotelphusidae mostram grande interesse zoogeográfico, com padrões evidenciados por suas rotas de migração. Além de se destacarem na composição faunística das grandes bacias continentais da América do Sul (RODRÍGUEZ, 1992).

As duas famílias podem ser separadas por diferenças morfológicas visíveis, onde a família Pseudothelphusidae apresenta carapaça elipsóide, pereiópodos com espinhos e terceiro maxilípodo com exopódito rudimentar. Já a família Trichodactylidae, tem-se como ênfase a sua carapaça suborbicular ou hexagonal, pereiópodos com cerdas e o 3º maxilípodo com exopódito desenvolvido (MAGALHÃES, 2003).

A família Pseudothelphusidae, possui atualmente 265 espécies descritas, distribuindo-se do norte do México ao limite sul da bacia amazônica, mas com representantes da família no estado do Ceará (figura 1), totalizando vinte espécies da família para o Brasil (CUMBERLIDGE, 2014; MAGALHÃES, 2005; RODRIGUES, 1981).

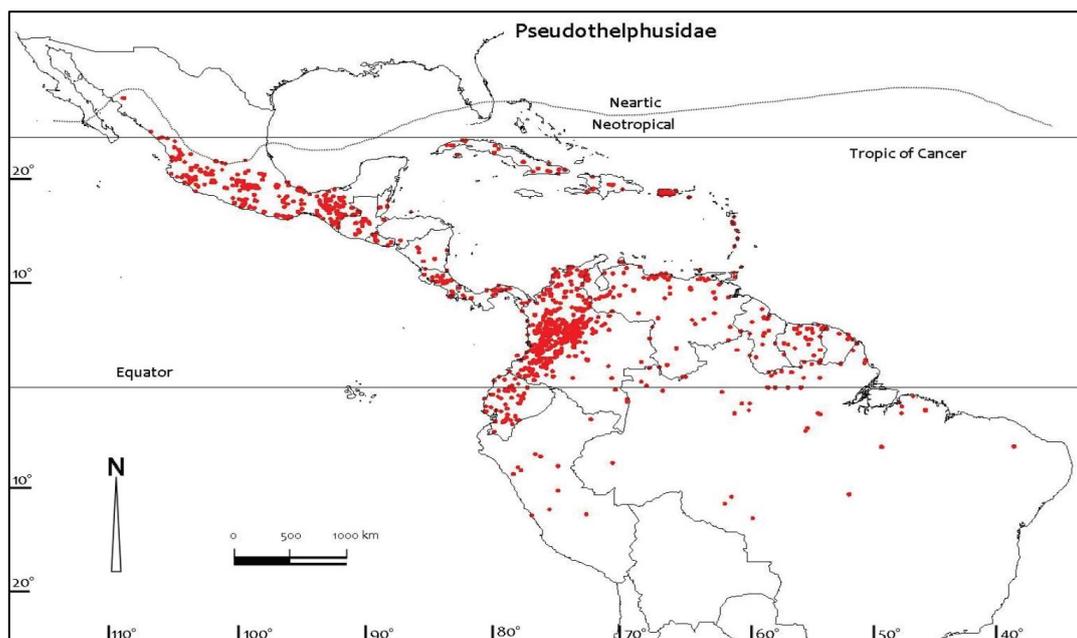


Figura 1- Distribuição da família Pseudothelphusidae nas Américas Central e do Sul
Fonte: Cumberlidge et. al. 2014

1.2- *Fredius reflexifrons*

Fredius reflexifrons (figura 2) é uma espécie de caranguejo pertencente à família Pseudothelphusidae com distribuição nas regiões Norte e Nordeste brasileiro, podendo ser encontrado em locais com pequenos igarapés da floresta de terra firme e em áreas úmidas da floresta (MAGALHÃES, 2003; MAGALHÃES et al. 2005).

No município de Ipu - CE essa espécie é encontrada em ambiente lamoso, coberto por serapilheira onde estão suas tocas, sendo capturado no período noturno, porque, durante o dia, eles ficam no interior de suas tocas, onde é mais difícil de capturá-lo por conta da profundidade das mesmas.



Figura 2- *Fredius cf reflexifrons* coletado no município de Ipu – CE

Magalhães et al. (2005), registraram pela primeira vez *F. cf reflexifrons*, no semiárido nordestino, nas cidades de Ipu e Viçosa do Ceará, mesmo estando isolados geograficamente e divergindo em algumas características quando comparados aos espécimes da bacia amazônica como a coloração da carapaça marrom intenso e avermelhado, quelípodo avermelhado e pernas ambulatoriais, com a ponta da quela esbranquiçada; no entanto, a morfologia de seus primeiros gonópodos se encaixa muito bem na redescrição dada por Magalhães & Rodríguez (2002): a coluna cefálica é reta, afiada, e curta; o lóbulo auxiliar

estabeleceu no lado caudal e é ligeiramente mais curto do que o lóbulo cefálico, com a sua parte distal que termina subterminalmente em relação ao lóbulo cefálico.

Para esta espécie existem poucos trabalhos publicados, referindo-se apenas a distribuição geográfica, notas de ocorrência e caracterização em nível molecular como os de MAGALHÃES et al. 2014; MAGALHÃES et al. 2005; ALVES et al. 2010; MAGALHÃES; RODRIGUEZ, 2002.

O registro de *F. cf reflexifrons* no semiárido nordestino expande a distribuição da família Pseudothelphusidae, o que leva a questionamentos como essa espécie conseguiu se dispersar além da Região Norte do Brasil para uma região com clima tão desfavorável para a manutenção dessa espécie.

1.3- Teoria dos refúgios

Segundo Rodrigues & Ribeiro (2009) a composição estrutural atual e biológica do planeta terra é resultado de uma longa história, cerca de 4,6 milhões anos, no entanto, os últimos 2 milhões de anos foram marcados por grandes oscilações climáticas que interferiram na distribuição da biota, esse período é conhecido como quaternário. Esse período, que engloba o Pleistoceno (1,6 M.A.) e o Holoceno (que inclui somente os últimos dez mil anos), caracteriza-se como um período de grandes pulsações climáticas, longos intervalos de tempo e temperaturas muito baixas (as glaciações) intercalados com tempos mais quentes, como o atual (SALGADO-LABOURIAU, 1994).

Do ponto de vista fitogeográfico, esse período é caracterizado pela ocorrência de muitas transformações na paleovegetação que se processaram em diferentes locais, como nas passagens dos estádios glaciais para os interglaciais e vice-versa (SUGUIO, 2001).

A teoria mais aceita para explicar a origem das glaciações e das mudanças climáticas, em especial no pleistoceno, são os denominados ciclos de Milankovitch ou ciclos astronômicos de Milankovitch. Tal ciclo está associado a três movimentos orbitais da terra em relação ao sol, que se modificaram com o tempo e com uma periodicidade característica. Com base nessa teoria, vários modelos foram criados na tentativa de se explicar a distribuição da fauna e da

flora pleistocênica ao redor dos continentes. Para a América do Sul, destaca-se o modelo proposto por Ab'Saber em 1977, postulado inicialmente por Jean Tricard e André Cailleux e que ficou conhecido como Teoria dos Refúgios (RODRIGUES; RIBEIRO, 2009).

A expansão destas manchas florestadas tropicais, em consequência da retomada da umidade do tipo climático que se impôs ao final do período seco e mais frio, deixou setores de maior diversidade e endemismos como evidência dos refúgios que atuaram no Pleistoceno terminal (SILVA; PASSOS, 2009).

Essa teoria comporta-se como uma das mais relevantes ideias referentes aos padrões de distribuição de flora e fauna atual na América Tropical (AB'SÁBER, 2006).

A teoria dos refúgios ecológicos, em síntese, relata que devido às flutuações climáticas da passagem para uma fase mais secas e mais fria durante o pleistoceno terminal, as florestas tropicais ficaram retraídas às pequenas áreas de permanência de umidade, conhecidos popularmente como brejos, a constituir os refúgios e a sofrer diferenciação resultante desse isolamento (VIADANA; CAVALCANTE, 2007).

1.4- Brejos de altitude

Quando se faz uma comparação do semiárido nordestino com outras regiões semiáridas da terra, percebe-se que a diversidade biológica do semiárido nordestino é altamente significativa, apresentando características marcantes, no entanto, é um dos biomas menos conhecidos no Brasil (GIULIETTI et al. 2004; SILVA, 2003).

Brejos de altitude são enclaves da Mata Atlântica, formando ilhas de floresta úmida em plena região semiárida cercada por vegetação de Caatinga, tendo uma condição climática bastante atípica com relação à umidade, temperatura e vegetação (PORTO et al. 2004).

Estes são locais de refúgio de flora e fauna que sofreram um isolamento geográfico durante o Pleistoceno e o Plioceno superior, permitindo que a Floresta Atlântica penetrasse nos domínios da Caatinga, e ao retornar a sua distribuição original, após períodos interglaciais, ilhas de Floresta Atlântica permaneceram em

locais de microclima favoráveis; eles fazem parte da floresta atlântica nordestina, “Ilhas” de floresta úmida estabelecidas na região semiárida (ANDRADE-LIMA 1982).

Segundo Ab’Sáber (1999), na cultura popular é comum referir-se a brejo como qualquer subsetor com umidade elevada existindo no domínio semiárido, sendo sempre um enclave de tropicalidade no interior do semiárido: ilhas de paisagens úmidas, quentes ou subsequentes, com solos de matas e sinais de antigas coberturas florestais.

São normalmente relevos excedentes com altitudes superiores a 600m, sendo recobertos por vegetação caracterizada do tipo florestal, provavelmente da Amazônia e da Mata Atlântica (COIMBRA- FILHO; CÂMARA 1996). Servindo de abrigo para uma fauna relictual, de característica umbrófila, abrigando elementos precedentes de áreas mais secas circundantes (BORJES-NOJOSA; CARAMASCHI, 2003).

Existem 43 brejos de altitudes distribuídos na Floresta Atlântica nordestina (tabela 1), os quais estão localizados nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, abrangendo uma área de aproximadamente 18.589 Km² (VASCONCELOS - SOBRINHO, 1971).

Tabela 1- Número e área florestal dos brejos de altitude ocorrentes na Floresta Atlântica Nordeste

Estados	Nº de brejos	Área florestal (Km²)	%
Ceará	9	6.596,50	35,48
Rio Grande do Norte	5	1.147,50	6,18
Paraíba	8	6.760,00	36,37
Pernambuco	21	4.850,00	21,97
Total	43	18.589,00	100

Fonte: Adaptado de Vasconcelos Sobrinho (1971)

O estado do Ceará é revestido na sua quase totalidade por caatinga (92%), porém apresenta um conjunto de ilhas de florestas úmidas, resultando em nove,

situadas nas vertentes da chapada do Araripe e planalto da Ibiapaba, sobre as Serras (cristalinas) da Mata, do Machado, da Aratanha, Maranguape, Meruoca, Uruburetama e Baturité. Estas serras úmidas favorecem uma maior produção agrícola e concentração demográfica, por apresentarem melhores condições edafo-climáticas que as encontradas na semiaridez das depressões sertanejas (CAVALCANTE, 2005).

Localizado no estado do Ceará, o planalto da Ibiapaba (Figura 3), é um brejo de altitude mais ocidental, fazendo fronteira com o estado do Piauí, possuindo uma extensão de 110 km de serra com altitudes que podem variar de 800 a 1100m (FIGUEIREDO, 1997).

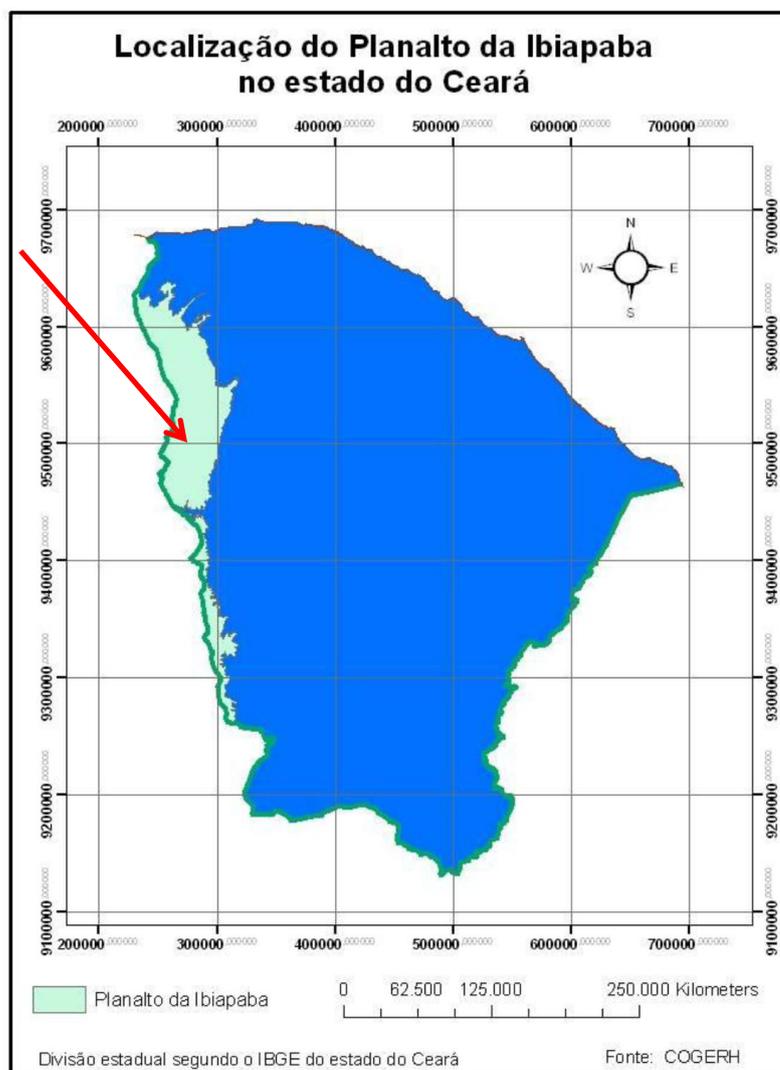


Figura 3- Localização do Planalto da Ibiapaba
Fonte: COGERH

Esta área é beneficiada por ter uma localização próxima ao litoral além de apresentar chuvas orográficas (Figura 4), fazendo com que essa região possua as temperaturas médias mais baixas do estado do Ceará (BORGES-NOJOSA; CARAMASCHI, 2003).

Nos períodos quentes do ano, quando todo o Nordeste está em torno de 34 a 40 graus, a Ibiapaba apresenta uma temperatura que é a metade do seu entorno semiárido. Fazem parte da Chapada de Ibiapaba as cidades de Viçosa do Ceará, Ipu, Guaraciaba do Norte, Carnaubal, São Benedito, Ibiapina, Ubajara e Tianguá (OLIVEIRA; AQUINO, 2007);

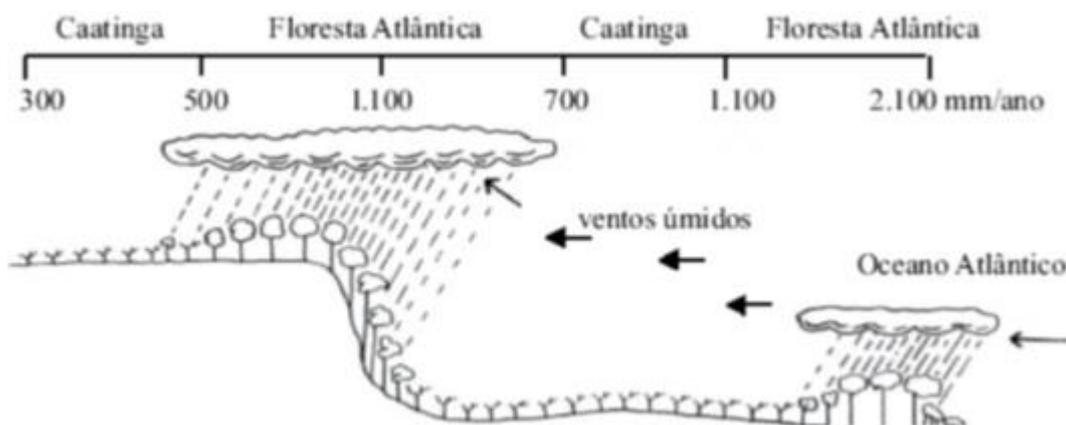


Figura 4- Demonstração das chuvas orográficas dos brejos de altitude no Nordeste Brasileiro
Fonte: Adaptado de Tabarelli;Santos, 2004

O Planalto Sedimentar da Ibiapaba dada às características topográficas e consequentemente climáticas enquadram-se na Teoria dos Refúgios defendida por Ab' Saber e Vanzolini na década de 70 (OLIVEIRA; AQUINO, 2007).

Frente a essas características onde a espécie é encontrada no estado do Ceará, muito distante do seu centro de dispersão, é provável que a conexão e consequente fluxo gênico entre populações sejam restritos, dessa forma, favorecendo o processo de especiação.

1.5- DNA mitocondrial

Diante disso, a descrição taxonômica dos organismos, que serve de base para a identificação e classificação destes, tradicionalmente, é realizada com base na morfologia dos indivíduos. Entretanto, algumas espécies, mesmo

divergindo geneticamente ao longo do tempo, não adquirem diferenças morfológicas conspícuas (MAYR, 1969).

Existe uma dificuldade no reconhecimento de espécies ditas crípticas pelo fato de coincidirem morfológicamente, podendo resultar em erros de identificação e, conseqüentemente em perda de informação sobre a biodiversidade (LEBÉFURE et al. 2006; PFENNINGER; SCHWENK, 2007). Dessa forma, técnicas moleculares associadas à taxonomia morfológica estão sendo utilizadas para a identificação de espécies crípticas (PFENNINGER; SCHWENK, 2007).

Dentre a diversidade de organismos, os crustáceos decápodos, são identificados e descritos utilizando apenas caracteres morfológicos, por serem de fácil acesso e de baixo custo quando comparados a outras técnicas (CARVALHO et al. 2013).

A análise de sequências de DNA seja diretamente, ou indiretamente pela análise de proteínas, pode ser utilizada para a discriminação de espécies (WARD et al. 2005). A identificação de espécies animais através do DNA mitocondrial utiliza, em regra, marcadores genéticos de diversos genes da região codificante do DNA mitocondrial (figura 5). O DNA mitocondrial é um único filamento duplo de DNA circular com genes de cópia única, caracterizado por ausência de combinação gênica, ineficiência nos mecanismos de reparo de mutações, regiões não codificadoras raras ou ausentes, mutações pontuais constituindo a principal fonte de variação e herança geralmente uniparental (VERGAMINI, 2009; MAZZANTI et al. 2010).

A popularidade dessa metodologia é resultado de uma maior facilidade em sua utilização, visto que a quantidade de genoma mitocondrial em uma célula é muito superior àquela de um gene nuclear, tornando sua amplificação menos complicada (SCHUBART, 2009).

Adicionalmente, genes mitocondriais possuem uma elevada taxa de mutação quando comparado com o gene nuclear, fazendo com que um sinal filogenético seja acumulado em um curto período de tempo, além de ser herdado de forma uniparental, (SCHUBART, 2009). Uma grande disponibilidade de “primers” universais para esses genes e seus respectivos sequenciamentos no GenBank, aumentam a preferência dos genes mitocondriais em estudos filogenéticos dentro de Crustacea (TOON et al. 2009).

O gene 16S rRNA (Small subunit ribosomal RNA) é um gene estrutural não codificante (figura 5), cuja combinação de regiões variáveis e conservadas é provavelmente uma das razões de ter se tornado o gene mais popular para a reconstrução de filogenias animais. Se devidamente utilizado, permite estudo de relações filogenéticas antigas assim como eventos recentes (SCHUBART et al. 2000).

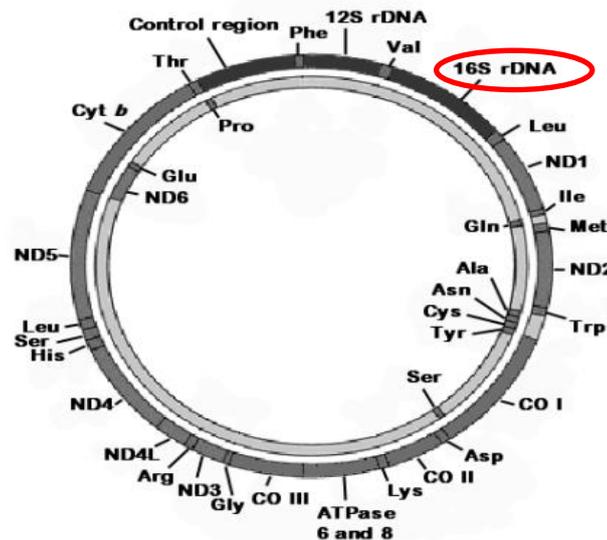


Figura 5- Representação esquemática da molécula circular do genoma mitocondrial, em destaque para o 16S DNA.

Fonte: Pereira, 2000 com modificações.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o status taxonômico de *Fredius cf reflexifrons* por métodos morfológicos e moleculares. Seria um extremo distribucional de uma espécie com origem amazônica ou uma espécie críptica que divergiu a partir das oscilações climáticas pleistocênicas?

2- OBJETIVO GERAL

- Avaliar o status taxonômico de *Fredius cf. reflexifrons* do Ceará por meio de métodos morfológicos e moleculares.

2.1- Objetivos específicos

- Comparar molecularmente *Fredius cf. reflexifrons* do Ceará com as espécies nominais conhecidas.
- Comparar morfológicamente exemplares de *Fredius cf. reflexifrons* do Ceará e de outras localidades

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Coleta de material

Os espécimes foram coletados na Serra da Ibiapaba em uma localidade conhecida como Sítio Caranguejo (figura 6-A) pertencente ao município de Ipu, Estado do Ceará, nos meses de abril e outubro de 2014 e abril de 2015; verificou-se a presença de indivíduos nas tocas e por meio da técnica do esforço manual os espécimes foram capturados, acondicionados em sacos plásticos com gelo picado e levados ao Laboratório de Crustáceos do Semiárido da Universidade Regional do Cariri – LACRUSE/URCA. Em laboratório os espécimes foram identificados por meio de chave dicotômica provida em Magalhães (2003), sexados, mensurados e depositados na coleção do LACRUSE.

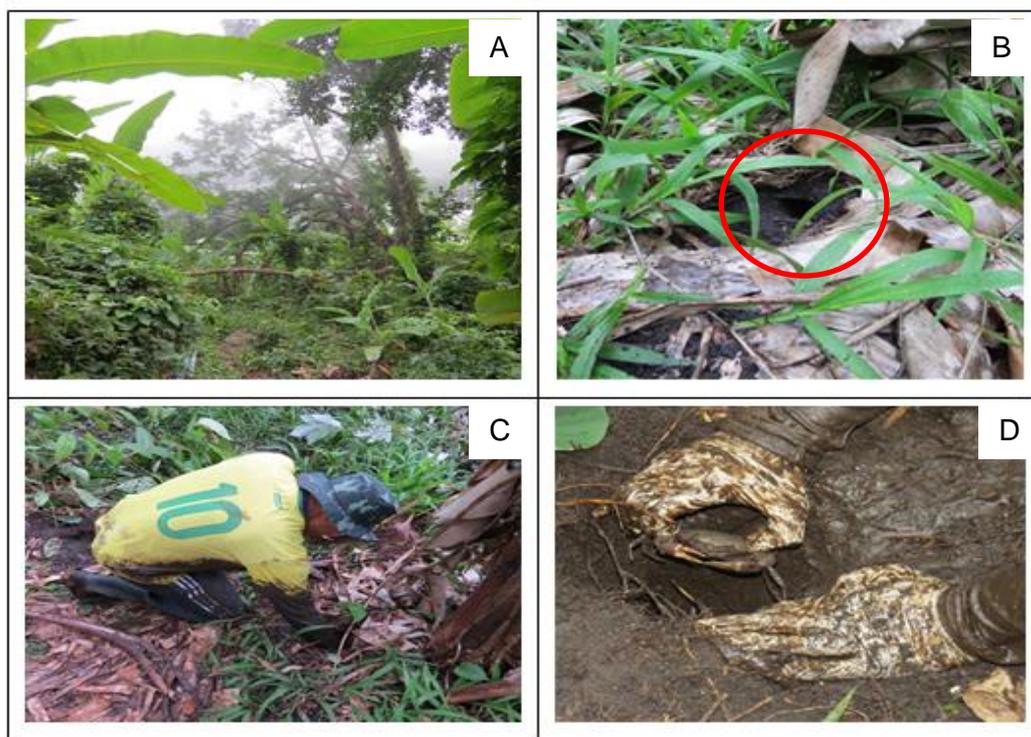


Figura 6- A- Sítio Caranguejo. B- Toca de *Fredius cf reflexifrons*. C- Coleta de esforço manual. D- *F. cf reflexifrons* recém-capturado.

3.2- Obtenção dos dados moleculares

Para obtenção dos dados moleculares foi retirada uma amostra de tecido muscular do dactílo de *Fredius cf reflexifrons* (coletado no estado do Ceará), de

Fredius buritizatis (coletado no estado do Rondônia) e *Prionotelphusa eliasi* (coletado no estado do Amazonas) os quais foram colocados em um recipiente com álcool absoluto e enviados ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia- LBM/UESB.

No LBM/UESB foram feitas as Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) em um termociclador utilizando os seguintes *primers* para o gene 16S: 16Sar (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') e 16Sbr (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') (Palumbi et al. 1991). Os parâmetros da reação de amplificação são detalhados na tabela 2.

Tabela 2- Passos da amplificação do gene 16S rRNA

Passo	Etapas do processo	Temperatura	Período
1	Desnaturação inicial	95°C	2 minutos
2	Desnaturação	95°C	30 segundos
3	Anelamento	46-50°C	45 segundos
4	Extensão	72°C	1 minuto
5	Retorna ao passo 2	-----	25 vezes
6	Extensão final	72°C	5 minutos

A purificação foi realizada por meio do kit SureClean Plus[®] e o sequenciamento das amostras foi realizado em um sequenciador automático no Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Jaboticabal.

3.3- Edição das sequências

As sequências de *F. cf reflexifrons* (Ortmann,1897) e *F. buritizatis* Magalhães & Mantelatto, 2014 (coletados no estado do Ceará e Rondônia respectivamente) bem como a de *Prionotelphusa eliasi* Rodriguez,1980 (estado do Amazonas) foram obtidas por sequenciamento de ambas as fitas (senso e anti-senso), os consensos foram obtidos por meio do software BioEdit 7.0.5 (Hall, 2005) e confirmados por meio de um BLAST. As demais sequencias usadas neste trabalho foram adquiridas no GenBank (Tabela 3).

Todas as sequencias foram submetidas ao sistema BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar com a assembleia do banco de dados NCBI (Nacional Center for Biothechnology Information), no intuito de confirmar suas respectivas identidades.

Tabela 3- Caranguejos de água doce usados na comparação molecular

Espécie	Local da coleta	Nº de acesso no GenBank
<i>F. buritizatis</i>	Ji-Paraná, Rondônia, Brasil	JN402376
<i>F. buritizatis</i>	Ji-Paraná, Rondônia, Brasil	JN402377
<i>F. denticulatus</i>	Serra do Navio, Amapá, Brasil	JN402372
<i>F. estevisi</i>	Posto Indígena Parafuri, Roraima, Brasil	JN402379
<i>F. fittkaui</i>	Aldeia Balawa-ú, Amazonas, Brasil	JN402373
<i>F. platyacanthus</i>	Comunidade Paapi-ú, Roraima, Brasil	JQ414023
<i>F. reflexifrons</i>	Rio Chumucuí, Bragança, Pará, Brasil	JN402378
<i>F. cf reflexifrons</i>	Sítio Caranguejo, Ipu, Ceará, Brasil	Pendente
<i>F. buritizatis</i>	Chupinguaia, Rondônia, Brasil	Pendente
<i>F. stenolobus</i>	Rio Tawadu, Bolívar, Venezuela	JN402374
<i>F. stenolobus</i>	Aldeia Palimi-ú, Rio Uraricoera basin, Roraima, Brasil	JN402375
<i>Prionothelphusa eliasi</i>	Japurá, Vila Bittencourt, Amazônia	Pendente
<i>Trichodactylus dentatus</i>	Bahia, Brasil	FM208777

Em seguida, todas as sequencias foram agrupadas e editadas usando o BioEdit e alinhadas em ClustalW (Thompson et al. 1994) com interface no BioEdit como mostra a figura 7. Adotou-se como grupo externo um representante da família Pseudothelphusidae (*Prionothelephusa eliasi* Rodrigues, 1980) e um da família Trichodactylidae (*Trichodactylus dentatus* H. Milne-Edwards, 1853).

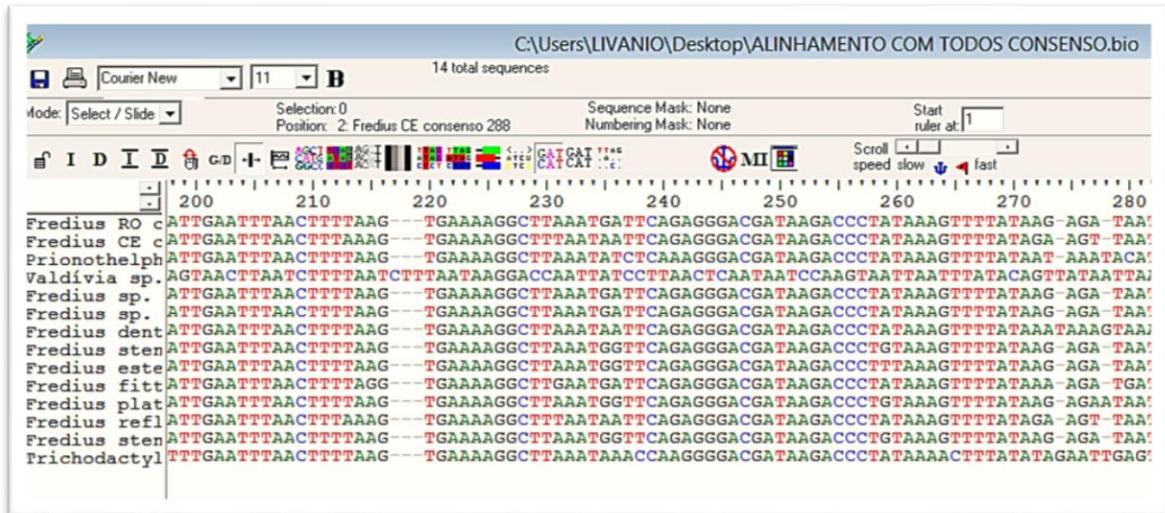


Figura 7- Alinhamento das sequencias no Software BioEdit

A análise para verificação de saturação dos dados mostrou que não há indícios de saturação, uma vez que os limiares para as taxas de transversão e substituição encontrados com o auxílio do software DAMBE (Xia et al. 2013) mostraram-se abaixo do limiar, ou seja, não houve diminuição da informação filogenética contida nas sequências pois o $ISS < ISS.c$ (Figura 8).

```

Test of substitution saturation (Xia et al. 2003; Xia and Lemey
2009)

Testing whether the observed Iss is significantly, lower than
Iss.c.

Part I. For a symmetrical tree.
=====
Prop. invar. sites
0,0000
Mean H
0,4547
Standard Error                                0,0347
Hmax
1,6527
Iss
0,2751
Iss.c
0,7240
T
12,9392
DF
538
Prob (Two-tailed)                            0,0000
95% Lower Limit                             0,2070
95% Upper Limit                             0,3433

=====
Part II. For an extreme asymmetrical (and generally very
unlikely) tree.
=====
Iss.c
0,5457
T
7,7984
DF
538
Prob (Two-tailed)                            0,0000

95% Lower Limit                             0,2070
95% Upper Limit                             0,3433

=====

```

Figura 8- Teste para verificação de saturação dos dados obtidos através do software DAMBE (XIA, 2013)

3.4- Análise dos dados moleculares

Os dados moleculares foram submetidos ao software jModeltest (POSADA, 2012) para verificar em qual modelo evolutivo se encaixaria os dados, tendo como modelo evolutivo mais adequado, escolhido pelo programa, o HKY + G.

Para a construção da árvore filogenética, como sugerido pelo software jModeltest (POSADA, 2012), utilizou-se o método estatístico de Maximum

Likelihood disponível no software MEGA 6.06 (TAMURA et al. 2013). Os suportes para os nós no cladograma foram medidos usando o teste estatístico de suporte bootstrap com valor de 1000 réplicas. Adicionalmente, foi computada através do software MEGA 6.06 a distância par a par entre as espécies do Gênero *Fredius*.

3.5- Análises morfológicas

Para dar um maior suporte aos dados moleculares foram realizadas análises morfológicas no período de 12 a 14 de janeiro no Laboratório de Carcinologia com os espécimes de *F. reflexifrons* tanto da coleção do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, quanto da coleção do Laboratório de Crustáceos do Semiárido – LACRUSE/ URCA.

Material examinado no INPA

Fredius reflexifrons (Ortmann, 1897)- 1 macho, INPA 1512, Brasil, Pará, Bragança, Rio Chumucuí, col. S. Alves, 12 Nov. 2004. *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897)- 1 macho, INPA 1382, Brasil, Ceará, Viçosa do Ceará, Fonte do Caranguejo, col. M. Pereira, 24 de jun. de 2004, 03°33'43.2"S 41°5'09.6"W. *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897)- 1 macho, INPA 2125, Brasil, Amapá, município de Laranjal, 16 de jan. de 2012. *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897)- 1 macho, INPA 1254, Brasil, Pará, Com. Santa Rosa, Santarém. *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897)- 1 macho, INPA 851, Brasil, Pará, Rio do Peixe Boi, col. E. Matos e A. Henriques Jr, 03 de mar. de 1995, 01°11'30"S 47°18'54"W. *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897)- 1 macho, Brasil, Amazonas, Fazenda Dimona, 14 de abr. de 2009. *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897)- 1 macho, INPA 583, Brasil, Amazonas, Serra do Navio/ Serra do Veado, 07 de mai. de 1994. *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897)- 1 macho, INPA 889, Brasil, Amazonas, Manaus, Reserva do Km 41, 02°26'56"S 59°46'13"W. *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897)- 1 macho, INPA 850, Brasil, Amazonas, Manaus, 11 de jul. de 2001. *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897)- 1 macho, INPA 368, Brasil, Amazonas, Manaus, Reserva Ducke, 22 de fev. de 1986. *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897)- 1 macho, Brasil, Amazonas, Manaus, Município de Iranduba, Sítio Anaíra, INPA 852, 12 de Set. de 1999, 03°10'39"S 60°07'39"W.

Material examinado no LACRUSE

Fredius cf reflexifrons (Ortmann, 1897)- 6 machos, Brasil, Ceará, Ipú, Sítio caranguejo, col. L. Cruz. LACRUSE 0217, 21 de abr, de 2015, 04° 18' 50.2" S 40° 44' 47.3"W.

4- RESULTADOS

4.1- Molecular

4.1.1- Distância par a par

Foram obtidas sequências parciais do gene 16S para *Fredius cf reflexifrons*, (CE) com o total de 568 pares de base, *Fredius buritizaitilis* coletado no estado de Rondônia (com um total de 563 pares de base) e *Prionothelphusa eliasi* coletado no estado do Amazonas (com um total de 562 pares de base).

Na análise de distância genética para o gene 16S (par a par) foram utilizados onze indivíduos do gênero *Fredius*, provenientes das seguintes localidades: Amapá (AP), Amazonas (AM), Ceará (CE), Pará (PA), Roraima (RR), Rondônia (RO), Venezuela (VZ) e um grupo externo proveniente da Bahia (BA), como mostra a tabela 4 com suas respectivas distâncias.

Tabela 4- Matriz de diferença genética na região 16S incluída no presente estudo

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>Fredius cf reflexifrons</i>	CE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>Fredius reflexifrons</i>	PA	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>Fredius buritizaitilis</i>	RO	0,10	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>Fredius buritizaitilis</i>	RO	0,11	0,08	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>Fredius buritizaitilis</i>	RO	0,11	0,08	0,02	0,00	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>Fredius denticulatus</i>	AP	0,12	0,09	0,08	0,08	0,08	-	-	-	-	-	-
7	<i>Fredius stenolobus</i>	RR	0,10	0,07	0,07	0,06	0,06	0,10	-	-	-	-	-
8	<i>Fredius stenolobus</i>	VZ	0,10	0,07	0,07	0,06	0,06	0,10	0,00	-	-	-	-
9	<i>Fredius estevisi</i>	RR	0,11	0,07	0,07	0,06	0,06	0,09	0,02	0,02	-	-	-
10	<i>Fredius fittkai</i>	AM	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,09	0,08	0,08	0,08	-	-
11	<i>Fredius platyacanthus</i>	RR	0,10	0,07	0,06	0,06	0,06	0,09	0,02	0,02	0,02	0,08	-
12	<i>Prionothelphusa eliasi</i>	AM	0,16	0,13	0,12	0,12	0,12	0,13	0,12	0,12	0,12	0,13	0,12
13	<i>Trichodactylus dentatus</i>	BA	0,22	0,19	0,21	0,21	0,21	0,22	0,21	0,21	0,22	0,20	0,21

A matriz de diferença genética entre *F. cf reflexifrons* (CE) e *F. reflexifrons* (PA) mostra que há uma divergência entre os espécimes de 0,04 (4%).

4.1.2- Cladograma de distância

O método de Maximum Likelihood para o gene 16S rRNA de algumas espécies do gênero *Fredius* foi utilizado na construção da árvore filogenética mostrado na figura 9.

O cladograma mostra que o gênero *Fredius* é monofilético, sendo observada a formação de três clados, o primeiro clado formado por *F. stenolobus* (RR, VZ), *F. estevisi* (RR) e *F. platyacanthus* (RR), um segundo formado por três espécimes de *F. buritizatis*, todos do Estado de Rondônia e um terceiro clado formado por *F. fittkai* (AM), *F. reflexifrons* (PA) e *Fredius cf reflexifrons* (CE), *F. denticulatus* não tem muito suporte no cladograma pois o bootstrap foi inferior a 50% (figura 09).

Fredius cf reflexifrons (CE), constitui um grupo irmão de *F. reflexifrons* (PA) mesmo estando isolado na Serra da Ibiapaba por uma considerável área de semiárido e de ambientes transicionais o que representaria pouco ou nenhum fluxo gênico entre estas.

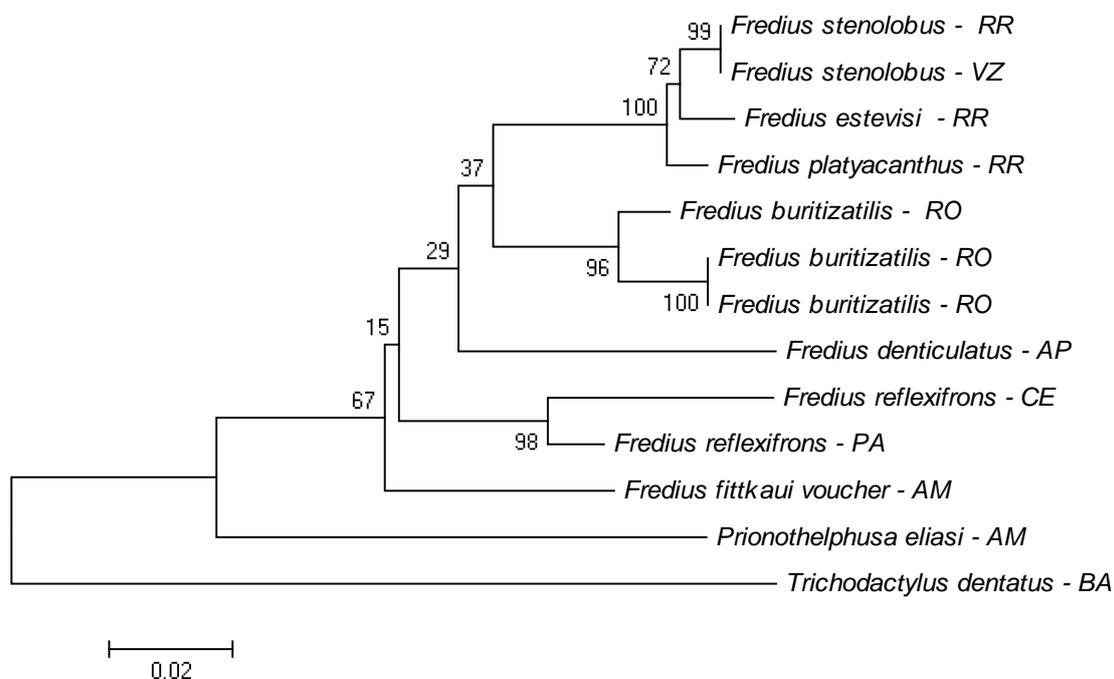


Figura 9 - Árvore filogenética baseado no método de maximum Likelihood, no software MEGA, pelo método de HKY +G, sugerido no jmodeltest.

4.2- Morfologia

4.2.1- Morfologia externa e do gonópodo

A morfologia dos espécimes de *F. cf reflexifrons* encaixa-se muito bem na diagnose provida por Magalhães (2003): carapaça ligeiramente convexa, lisa com margem anterolateral com um entalhe junto ao ângulo orbital externo, seguido de 1-5 grânulos e 16-20 dentes diminutos e rombudos, regiões gástricas e hepáticas bem definidas. Mero possuindo 9 espinhos cônicos, rombudos e enfileirados na parte superior interna, quelípodo com uma fileira irregular de pequenos espinhos cônicos e rombudos no bordo interno do mero, com uma média de 9 espinhos. Própodo com pequenas protuberâncias na margem superior e inferior bem evidentes.

A parte apical do gonópodo como mostra a figura 10, encaixou-se na descrição dada por Magalhães e Rodrigues (2002) – primeiro gonópodo robusto, mais forte na base, estreito no meio; protuberância subapical bem desenvolvida em torno das faces laterais e cefálicas. Sutura marginal reta, situada no lado mediano. Lobo marginal não diferenciado, contínuo com a superfície caudal. Lobo mesial distinto, acuminado, apontando para a direção caudal. Espinho cefálico maior que o lobo mesial, acuminado distintamente, apontando na direção caudolateral. Lobo cefálico projetado apicalmente, arredondado distalmente, com um trecho de pequenos espinhos ao longo do lado mesial e cefálico. Lobo auxiliar no lado caudal, ligeiramente menor que o lobo cefálico e contínuo com o espinho cefálico, colocado ligeiramente e obliquamente em relação para o lobo cefálico em vista lateral, sua junção formando um canal lateral, continuando apicalmente quase em linha reta e terminando subterminalmente. Campo de espinhos apicais desenvolvidos, formando um segmento de curva extensa ao longo do lado lateral, delimitado pelo ápice da borda cefálica e caudal.

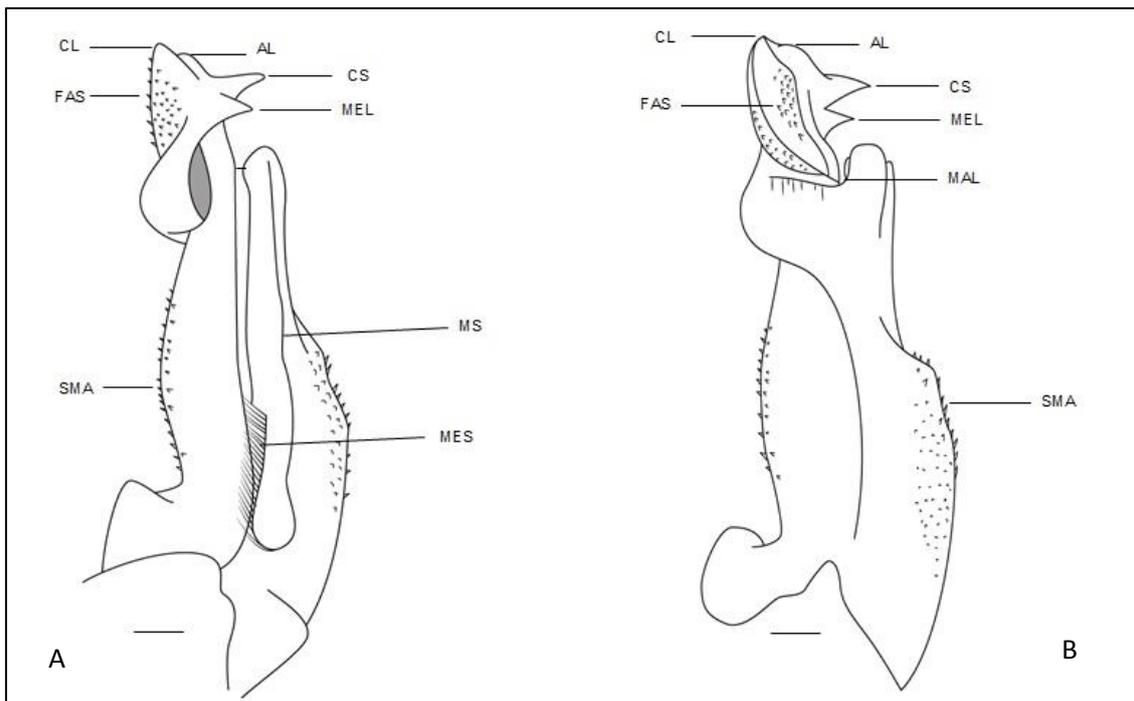


Figura 10- Gonópodo de *F. cf reflexifrons* (CE). A- Visualização mesial. B- visualização lateral. Abreviações- CL: lobo cefálico, AL: lobo auxiliar, CS: espinho cefálico, FAS: campo de espinhos marginais, MEL: lobo mesial, SMA: espinhos marginais, MS: sutura marginal, MES: cerdas mesiais, MAL: lobo marginal. Escala: 10mm.

5 – DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no cladograma mostram *F. reflexifrons* (PA) e *Fredius cf reflexifrons* (CE) como grupos irmãos com alto suporte, as divergências presentes internamente no ramo foram superiores a qualquer dos agrupamentos entre espécies no grupo. Desta forma, do ponto de vista filogenético molecular estes tratariam-se de espécies distintas.

Rodriguez & Campos (1998) realizando a relação cladística e biogeográfica do gênero *Fredius* postularam que *Fredius reflexifrons* juntamente com *F. denticulatus* provavelmente se originaram de um ancestral na região da Amazônia por um processo de vicariância e, posteriormente, *F. reflexifrons*, dispersou-se para a região da Guiana Francesa logo após ter existido uma regressão marinha nessa área. A espécie encontrada no município de Ipu habita áreas de terra firme, próximo a pequenos corpos d'água, quando comparado com a espécie de região amazônica, percebe-se semelhanças ecológicas entre as mesmas, pois não habitam em áreas inundadas.

Mesmo com o Rio Amazonas tendo funcionado no passado e atualmente como uma barreira, *Fredius reflexifrons* teria encontrado condições propícias à sua dispersão tanto para a Amazônia ocidental quanto para o Nordeste brasileiro, durante o pleistoceno, quando houve uma expansão e uma retração das manchas florestais. (SOARES, 2012; SILVA; PASSOS, 2009)

Soares (2012) estudando a filogeografia do complexo *Micrastur ruficolis*, afirmou que esses complexos são limitados pelos principais afluentes do Rio Amazonas, propondo que a evolução da drenagem nessa bacia foi a principal ferramenta para a diversificação dos táxons que correspondem esse complexo, especialmente durante o pleistoceno.

Ademais, o autor acima reforça que os membros do complexo *Micrastur* estão relacionados ao sub-bosque da floresta de terra firme, fato este que está relacionado ao mecanismo de insularização, resultado da influência dos rios amazônicos e as florestas que sofrem processo de inundação.

No entanto, as diferenças morfológicas observadas não suportam os níveis de divergência encontrados molecularmente.

Magalhães et al. (2005), a partir de análises morfológicas apresenta a hipótese, que *F. reflexifrons*, encontra-se distribuído desde a Região Norte do

Brasil até a região Nordeste, faltando novas coletas para comprovar essa informação, apesar de, ressaltar que *F. cf reflexifrons* não encontraria as mesmas condições presentes na região norte.

Adicionalmente, nas observações realizadas nas localidades do Ceará, foi possível observar que ao redor da área onde é encontrado *F. cf reflexifrons* é presente uma vegetação típica de caatinga e ambiente com solo lamoso restrito, fato que deve estar relacionado a delimitação da área dessa espécie.

O isolamento geográfico e conseqüentemente a divergência genética poderá atuar em populações de ambientes dulcícolas que habitam bacias hidrográficas distintas, porque o ambiente terrestre pode representar uma barreira insuperável impedindo a dispersão e a conectividade entre estas (CARINI; HUGHES, 2004).

5.1- Gene 16S

Os dados moleculares mostraram uma diferenciação de 4% entre a espécie nominal de *F. cf reflexifrons* (CE). Em crustáceos decapódes, não há um padrão definido para que haja a caracterização de uma nova espécie em nível de 16S, diferentemente do gene Citocromo Oxidase I (COI) que foi utilizado pioneiramente para distinção de espécies em nível molecular, onde uma diferença de 2% é o suficiente para classificação de novas espécies.

No entanto, Fouquet et al. (2007) realizando estudos com rãs para estimar a riqueza de espécie por meio de DNA mitocondrial (16S), estabeleceu que divergências maiores que 3,8% são suficientes para separar espécies crípticas e 3% para identificar candidatos a espécies de anuros. Tais resultados caso transplantados para decápodos suportariam *F. cf reflexifrons* encontrado na Serra da Ibiapaba elevado ao nível de espécie.

Espécies consideradas como crípticas apresentam morfologia idêntica, que foram classificadas como uma única espécie nominal, no entanto, não inter cruzam, além de possuírem outras características, como variação genética (FUTUYAMA, 2003; BICKFORD et al. 2007).

Carvalho et al. (2013) utilizando o gene mitocondrial 16S, mostraram a existência de dois grupos dentro da espécie de *Macrobrachium potiuna*, o que possivelmente seriam espécies crípticas, no entanto, os autores não realizaram

uma análise morfológica da espécie em questão para ter um suporte aos dados moleculares que foram encontrados (4,6%)

5.2- Análises morfológicas

Os exemplares examinados de ambas as coleções (INPA e LACRUSE), possibilitaram constatar algumas diferenças da espécie nominal com os espécimes cearenses: coloração de *F. cf reflexifrons* Ipu (CE), em seu habitat natural, os seus pereiópodos tendem para um vermelho cor de vinho, enquanto sua carapaça tende para um marrom escuro avermelhado (Magalhães et al. 2005). As demais características morfológicas se encaixam na diagnose provida em Magalhães (2003).

Magalhães et al. (2005) descreveram que a morfologia do gonópodo de *F. cf reflexifrons* (CE) se encaixa na redescrição dada por Magalhães & Rodrigues (2002). No entanto, não há uma descrição detalhada do gonópodo no trabalho que descreve a espécie para o estado do Ceará. Todos os gonópodo dos espécimes de *F. cf reflexifrons* analisados no LACRUSE possuem um campo espinhos marginais- SMA (figura 10-A e B), bem evidentes e acuminados, sendo uma característica não tão bem evidente nos espécimes da coleção do INPA, em alguns espécimes não foram encontrados esse campo de espinhos marginais, como os exemplares de tombo: INPA 1512, INPA 2125, INPA 889, INPA 850.

Os primeiros gonópodos dos integrantes da família Pseudothelphusidae mostram em sua porção final estruturas complexas que consistem normalmente em vários processos, cada espécie possui nessa estrutura características distintas que a difere de qualquer outra espécie dentro da família (RODRIGUES; MAGALHÃES, 2005). Estes órgãos são usados para identificar espécies porque sofrem uma pressão externa relativamente pequena, abrigados na cavidade abdominal, exceto no acasalamento ou no período de muda (STERNBERG et al. 1999).

Como já relatado anteriormente, todos os processos do ápice do gonópodo coincidiram com os das demais espécies da coleção do INPA, o fato de todos os machos possuírem espinhos marginais nas extremidades do gonópodo pode ser uma característica da população de *F. cf reflexifrons* do Ceará.

6- CONCLUSÃO

- O gênero *Fredius* corresponde a um grupo monofilético.
- As análises mostraram que há diferenças entre *Fredius cf reflexifrons* (CE) e *Fredius reflexifrons* (PA) em nível de 16S rRNA.
- *Fredius cf reflexifrons* (CE) pode ser uma espécie críptica.
- A diversidade de espécies dentro do gênero *Fredius* parece ser maior que relatada até o momento.

REFERÊNCIAS

AB' SÁBER, A. N. **Brasil: Paisagens de Exceção: o litoral e o Pantanal Mato – grossense: patrimônios básicos**. Cotia – SP: Ateliê Editorial, 2006.

AB'SABER, A. N. Sertões e sertanejos: uma geografia humana sofrida. **Estudos avançados**, vol.13, n.36, p. 7-59, 1999.

ALVES, S. T. M.; ABRUNHOSA, F. A.; LIMA, J.F. Foregut morphology of Pseudothelphusidae and Trichodactylidae (Decapoda: Brachyura) from northeastern Pará, Brazil. **Zoologia**, vol.27, n.2, p. 228-244, 2010.

ANDRADE-LIMA, D. Present-day forest refuges in Northeastern Brazil. Pp. 245-251, *in*: Prance, G.T. (ed.) **Biological diversification in the tropics**, Columbia University Press, New York, 1982.

ARAÚJO, M.S.L.C.; TENÓRIO, D.O.; CASTIGLIONE, D.S. Diversidade e distribuição dos Crustacea Brachyura dos manguezais dos rios Ariquindá e Mamucabas, litoral sul de Pernambuco, Brasil. **Gestão costeira integrada**, v.14, n.3, p. 483-499, 2014.

BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v.22, n.3, p. 148-155, 2007.

BORJES-NOJOSA, D.M.; CARAMASCHI. Composição e análise comparativa da diversidade e das afinidades biogeográficas dos lagartos e anfisbenídeos (Squamata) dos brejos nordestinos. In *Ecologia e conservação da Caatinga* (I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva, eds). Editora Universitária UFPE, Recife, p.463-512, 2003.

BLISS, D. E. **Transition from Water to Land in Decapod Crustaceans**, *American Zoologist*, v. 8, p. 355-392, 1968.

BLISS, D. E. Relation between reproduction and growth in decapod crustaceans. **American Zoologist**, v. 6, p. 231-233. 1966.

CAVALCANTE, A. Jardins suspenso no Sertão. **Scientific American**, nº32, 2005

CARINI, G.; HUGHES, J.M. Population structure of *Macrobrachium australiense* (Decapoda: Palaemonidae) in Western Queensland, Australia: the role of contemporary and historical processes. **Heredity**, v.93, n.4, p. 350-363, 2004.

CARVALHO, F.; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Molecular data raise the possibility of cryptic species in the Brazilian endemic prawn *Macrobrachium potiuna* (Decapoda, Palaemonidae). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v.41, n.4, p. 707-717, 2013.

CUMBERLIDGE, N.; ALVAREZ, F.; VILLALOBOS, J. L. Results of the global conservation assessment of the freshwater crabs (Brachyura, Pseudothelphusidae

and Trichodactylidae): The Neotropical region, with an update on diversity. **ZooKeys**, v.457, p. 133–157, 2014.

COIMBRA-FILHO, A.F.; CÂMARA, I.G. **os limites originais do bioma Mata Atlântica na região Nordeste do Brasil**. Fundação brasileira para a conservação da Mata Atlântica, São Paulo, 1996. 86 p.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". **Nature Methods**, v. 9, n.8, p. 772, 2012.

DE GRAVE, S.; PENTCHEFF, N.D.; AHYONG, S.T.; CHAN, T.Y.; CRANDALL, K.A.; DWORSCHAK, P.C.; FELDER, D.L.; FELDMANN, R.M.; FRANSEN, C.H.J.M.; GOULDING, L.Y.D.; LEMAITRE, R.; LOW, M.E.Y.; MARTIN, J.W.; NG, P.K.L.; SCHWEITZER, E.; TAN, S.H.; TSHUDY, D.; WETZER, R. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. **Raffles Bull. Zool**, v. 21, p.1-109, 2009.

FIGUEIREDO, M.A. A cobertura vegetal do Ceará (Unidades Fitoecológicas), p. 28-29. In: **Atlas do Ceará**. Fortaleza: IPLANCE. 1997.

FOUQUET, A.; GILLES, A.; VENCES, M.; MARTY, C.; Blanc, M. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. **PLoS ONE**, v.2, n.10, 2007.

GIULIETTI, A.M.; BOCAGE, N. A.; CASTRO, A.A.J.F.; GAMARRA-ROJAS. C.F.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; VIRGÍNIO. J.F.; QUEIROZ, L.P.; FIGUEIREDO, M.A.; RODAL, M.J.N.; BARBOSA, M.R.V.; HARLEY, R.M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. Pp. 47-90. In: SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; FONSECA. M.T.; LINS. L.V. (Orgs.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente. 2004.

HALL, T. BioEdit v.7.0.5. Biological sequences alignment editor for Windows. 2005.

LEFÉBURE, T.; DOUADY, C.J.; GOUY, M. & GIBERT, J. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.40, n.2, p. 435-447, 2006.

LI, W.H. **Molecular evolution**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. 432p, 1997.

MACINTOSH, D.J. The Ecology and physiology of decapods of mangroveswamps. **Symposium of Zoological Society**, London, v.59, p. 315-341, 1988.

MAGALHÃES, C.; SANCHES, V. Q. A.; PILEGGI, L. G.; METELATTO, F. L. Morphological and molecular characterization of a new species of *Fredius*

(decapoda, pseudothelphusidae) from Rondônia, Southern Amazonia, Brazil. **Crustaceana**, v. 19, p. 101-114, 2014.

MAGALHÃES, C.; ABRUNHOSA, F. A.; PEREIRA, M. O.; MELO, M. A. New records of *Fredius denticulatus* (H. Milne-Edwards, 1853) and *F. reflexifrons* (Ortmann, 1897), and the eastern limits of the distribution of Pseudothelphusid crabs (Crustacea: Decapoda) in Brazil. **Acta Amazonica**, Amazonia, v. 35, n.1, p. 93-96. 2005.

MAGALHÃES, C. **Famílias Pseudotheuphusidae e Trichodactylidae. In: MELO, G.A.S. (Ed.) Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil.** São Paulo: Editora Loyola. p.143-287. 2003.

MAGALHÃES, C.; G. RODRÍGUEZ. The systematic and biogeographical status of *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897) and *F. fittkaui* (Bott, 1967) (Crustacea: Brachyura) from the Amazon and Atlantic Guianas river basins. **Acta Amazonica**, Manaus, v.32, n. 4, p. 677-689, 2002.

MAGALHÃES, C. Família Trichodactylidae (Caranguejos braquiúros de água doce). *In: BUCKUP, L.; BOND-BUCKUP, G. Os Crustáceos do Rio Grande do Sul.* Porto Alegre. 1 ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

MARTIN, J.W.; DAVIS, G.E. **An updated classification of the recent Crustacea.** Los Angeles: Science Series 39, Natural History Museum of Los Angeles County, 2001. 124p.

MAYR, E. **Principles of Systematic Zoology.** McGraw-Hill. New York, 428p. 1969.

MAZZANTI, M.; ALESSANDRINI, F.; TAGLIABRACCI, A.; WELLS, J. COMPOBASSO, C. DNA degradation and genetic analysis of empty puparia: Genetic identification limits in forensic entomology. **Forensic Sci Int**, v. 195, p.99-102, 2010.

NG, P.K.L.; GUINOT, D.; DAVIE, P.J.F. Sistema Brachyurorum: Part I. Na annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology*, v. 17, p. 1-286, 2008.

OLIVEIRA, L.N.; AQUINO, C.M.S. Características geoambientais do planalto sedimentar da ibiapaba - uma ilha de refúgio. **Cadernos de cultura e ciência**, v.2, n.2, 2007.

PALUMBI, S.; A. MARTIN, S.; ROMANO, W. O.; MCMILLAN, L.; STICE.; G. RABOWSKI. **The simple fool's guide to PCR.** (University of Hawaii, Department of Zoology, Honolulu), p. 1-46. 1991.

PFENNINGER, M.; SCHWENK, K. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p. 121, 2007.

PORTO, K.C.; CABRAL, J.J. P.; TABARELLI, M. Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: História natural, ecologia e conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 2004.

RODRIGUES, B.D.; RIBEIRO, C.M. Aplicação da Teoria dos Refúgios Ecológicos sobre a Flora Rupestre de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. **XII Encontro de Geógrafos da América Latina**. Montevideu, Uruguai. Artigo Completo. 15f. 2009. Disponível em: <http://egal2009.easyplanners.info/area07/7464_Durao_Rodrigues_Bruno.pdf> Acesso em 31 de ago 2015.

RODRIGUEZ, G. Decapoda. In HURLBERT, S.H.; RODRIGUEZ, G.; SANTOS, N. D. Aquatic biota of tropical south America , part 1: Arthropoda. San diego, San Diego State University, p. 41-45, 1981.

RODRIGUEZ, G. **The freshwater crabs of America. Family Trichodactylidae and supplement to the Family Pseudothelphusidae**. FauneTropicale XXXI, 188p. 1992.

RODRIGUEZ, G.; MAGALHÃES, C.; Recent advances in the biology of the Neotropical freshwater crab family Pseudothelphusidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura). **Revista Brasileira de zoologia**, v. 22, n. 2, p. 334-365, 2005.

RONCE, O. How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. **Ann Rev Ecol Evol**, v.38, p. 231–253, 2007.

SALGADO-LABOURIAU, M. L. **História Ecológica da Terra**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1994.

SASTRY, A.N. Ecological aspects of reproduction. In: BLISS, D. E.; VERNBERG, F. J.; VERNBERG, W. B. (Eds.). **The Biology of Crustacea: Environmental adaptations**. New York: Academic Press, p. 179-270, 1983.

SILVA, R. M. A. Entre dois paradigmas: combate à seca e convivência com o semiárido. **Sociedade e Estado**, Brasília, v.18, n.1/2, p.361-385, 2003.

SILVA, P. A. H; PASSOS, H. A teoria dos refúgios florestais: distribuição e evolução das paisagens ao fim do pleistoceno. **Geografar (Resumos do VII Seminário Interno de Pós-Graduação em Geografia)** Curitiba, 2009.

SOARES, L. M.S. Biogeografia e Filogeografia comparada do complexo *Micrastur ruficollis* (Aves, Falconidae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém do Pará, 40p. 2012.

SOLÉ-CAVA, A.M.; WÖRHEIDE, G. The perils and merits (or The Good, the Bad and the Ugly) of DNA barcoding of sponges a controversial discussion, p. 603-612, 2007. In: Custódio, M.R.; G. Lôbo-Hajdu; E. Hajdu & G. Muricy (Eds.). **Porifera Research - Biodiversity, Innovation and Sustainability**. Rio de Janeiro: Editora do Museu Nacional do Rio de Janeiro, v. 28.

SUGUIO, K. Geologia do Quaternário e Mudanças Ambientais (Passado + Presente = Futuro?). 1. reimp. São Paulo: Paulo's comunicação e Artes Gráficas, 2001.

SCHUBART, C.D.; NEIGEL, J.E.; FELDER, D.L. Use of mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. **Crustacean Issues**, v.12, p. 817-830, 2000.

SCHUBART, C.D. Mitochondrial DNA and Decapod phylogenies: the importance of pseudogenes and primer optimization. In: Martin, J.W., K.A. Crandall, and D.L. Felder (eds.) **Decapod Crustacean Phylogenetics**. Crustacean Issues. KOENEMANN, S. (series ed.). Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, v. 18, p. 47–65, 2009.

STERNBERG, R. V.; N. CUMBERLIDGE.; G. RODRÍGUEZ. On the marine sister groups of freshwater crabs. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin, v. 37, p.19-38, 1999.

SWOFFORD, D.L. Phylogenetic Analisis Using Parsimony – PAUP. (and another methods). Versão 4.0 Beta. Sinauer Associates. Sunderland Massac, 2002.

TABARELLI, M.; SANTOS, A. M. M. **Uma Breve Descrição Sobre a História Natural dos Brejos Nordestinos**. Brasília, 2004.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TOON, A.; Finley, M; Staples, J. & K.A. Crandall. Decapod phylogenetics and olecular evolution. In: Martin, J.W., K.A. Crandall, and D.L. Felder (eds.) **Decapod Crustacean Phylogenetics**. Crustacean Issues. Koenemann, S. (series ed.). Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, v. 18, p. 15–29, 2009.

THOMOPSON, J. D.; HIGGINS, Desmond G.; GIBSON, Toby J. ClustalW. **Nucleic Acids Res**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VASCONCELOS SOBRINHO, J. **As regiões naturais do Nordeste, o meio e a civilização**. Conselho de Desenvolvimento de Pernambuco, Recife, 1971.

VERGAMINI, F.G. **Análise comparativa entre populações costeiras e continentais do camarão *Macrobrachium* (Heller, 1862) (Crustacea, Palaemonidae) por meio de dados morfológicos e moleculares**. Faculdade de Filosofia e Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 101 pp, Dissertação de mestrado, 2009.

VIADANA, A. G.; CAVALCANTI, A.P.B. A teoria dos refúgios florestais aplicada ao Estado de São Paulo. **Revista da casa de geografia de Sobral**. v. 8/9, n. 1, p. 61-80, 2007.

VON PRAHL, J. Notas sobre *Sylviocarcinus piriformes* (Pretzman, 1968) (Crustacea, Brachyura, Trichodactylidae) con enfasis en su zoogeografía. **Actual. Biol**, v. 11, n.39, p. 23-25, 1982.

WARD, R.D.; ZEMLAK T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HERBERT, P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. **Phil. Trans. R. Soc. B**. published online, v.360, p. 1847–1857, 2005.

Xia, X. DAMBE 5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Mol Biol Evol**, v.30, n.7, p. 1720-1728, 2013.

FUTUYAMA, D.J. *Biología evolutiva*. Ribeirão Preto: FUNPEC editora, p. 111-116, 2003.