

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**“Variação morfológica e análise da distribuição do caranguejo
Pyromaia tuberculata Lockington, 1877 (Crustacea: Decapoda)”**

Carla Kühl de Figueiredo

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

“Variação morfológica e análise da distribuição do caranguejo *Pyromaia tuberculata* Lockington, 1877 (Crustacea: Decapoda)”

Carla Kühl de Figueiredo

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Msc. Tatiana Magalhães

Co - orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Figueiredo, Carla K.

“Variação morfológica e análise da distribuição do caranguejo *Pyromaia tuberculata* Lockington, 1877 (Crustacea: Decapoda)”

Ribeirão Preto, 2015.

XIV+65p

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – (FFCLRP–USP).

Orientador: Magalhães, T.; Co-orientador: Mantelatto, F. M

1. Brachyura 2. Espécie introduzida 3. Morfometria 4. Taxonomia 5. Variabilidade genética

Aos meus pais, Helena e Ronaldo,
por todo amor e dedicação.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto, obrigada pela oportunidade de realizar meu projeto e por fazer parte da equipe do Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos, pela orientação e confiança durante esse tempo. Foi um período de grande crescimento pessoal.

A minha orientadora Tatiana Magalhães pela dedicação, paciência, zelo e amizade. Por estar sempre disponível a ajudar, pelos ensinamentos e por sempre buscar as respostas para os meus questionamentos. Pelo apoio nos problemas pessoais e pelas palavras de incentivo. Obrigada por tudo!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (Processo 2014/13439-3). Aos projetos: FAPESP - projeto temático BIOTA FAPESP (2010/50188-8), CNPq (Edital Universal 471011/2011-8 e PQ 302748/2015-5), Coleções Científicas (504322/2012-5) e CAPES (Ciências do Mar II Proc. 2005/2014 - 23038.004308/201414) pelo apoio financeiro ao LBSC concedido ao professor Fernando L. Mantelatto e que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Departamento de Biologia e FFCLRP-USP, docentes e funcionários que fizeram parte da minha formação.

A todos os membros do Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC) pelo convívio, por toda ajuda, pelos momentos de descontração, e pela amizade. Agradeço a Mariana Terossi, Rafael Robles, Raquel Buranelli, Mariana Negri (Kana), Natália Rossi, Ana Francisca (Kelps), Vanda Carvalho, Mayara Miyazaki, Caio Oliveira e Ana Luiza aos que saíram Fabrício Carvalho e Mateus Lopes, e aos agregados Sabrina e Abner. Vou levar todos comigo com muito carinho.

Em especial à Raquel e Kana pela ajuda na molecular, com bibliografia, com os questionamentos sobre a análise de dados, pela paciência e preocupação. À Vanda pela ajuda

na molecular e pela oportunidade de trabalhar na Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia (CCDB). À Kelps, pela animação de todo dia, pela ajuda com as edições das imagens, os dados e análises morfométricas e pelas sugestões na molecular com os espécimes de *Pyromaia*. À Mayara pelas sugestões com as extrações com Chelex e pela preocupação com os materiais da sala da molecular. À Sabrina pela imensa ajuda com os dados morfométricos e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos curadores de todos os museus que emprestaram os espécimes de *Pyromaia tuberculata* sem os quais esse trabalho não seria possível. Agradeço também aos que doaram/emprestaram os espécimes para a Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia (CCDB): Marcos Tavares (MZUSP), Michel Hendrickx (UNAM), Shane Ah Yong (AM), Emiliano Ocampo (Argentina), Dr. Matasori Tary (Japão) e todos os que participaram das coletas do Biota e trouxeram material.

Aos que trouxeram os materiais de empréstimos que também foram de extrema importância: Raquel e Kana, da Austrália e Mariana Terossi, de Paris e Fernando Mantelatto, da Austrália.

À Elis Regina e Silvia companheiras de laboratório e graduação, por toda a ajuda e pela companhia na arrumação da coleção.

A todos da turma 49^a da Biologia, por esses 4 anos de convivência, pela amizade, pelos momentos de alegria, de bom humor e até mesmo os desentendimentos, pelas experiências e pelo crescimento pessoal. Em especial à Marcela Oliveira, Elis Regina Mesquita, Wendy Ishimoto e Guilherme Pereira Ennes pela amizade sincera, pelos momentos divertidos, pelas conversas de madrugada, pelas risadas, pelo amor e carinho. À Olívia Ambrozini por sempre estar disposta a me escutar, pelos conselhos, pelas constantes gordices durante a graduação e principalmente por ter me acolhido em sua casa quando mais precisei.

As meninas do Pensionato “Integra” que deixaram meu primeiro ano longe de casa mais animado.

A Thamires Bruschi pela amizade de tantos anos, pelas risadas e por tudo que já fez por mim.

A toda minha família, especialmente meus pais Helena e Ronaldo por todo amor, carinho e ajuda, quando mesmo distantes conseguiam me fortalecer quando estava triste e por todo incentivo e dedicação.

Obrigado a todos que de alguma forma fizeram parte dessa jornada.

Smile

Smile, though your heart is aching
Smile, even though it's breaking
When there are clouds in the sky
You'll get by...

If you smile
With your fear and sorrow
Smile and maybe tomorrow
You'll see the sun come shining through, for you

Light up your face with gladness
Hide every trace of sadness
Although a tear may be ever so near
That's the time you must keep on trying
Smile, what's the use of crying?
You'll find that life is still worthwhile
If you'll just smile

That's the time you must keep on trying
Smile, what's the use of crying?
You'll find that life is still worthwhile
If you'll just smile.

Charles Chaplin

Sumário

Lista de Figuras.....	XII
Lista de Tabelas.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XIV
1. Resumo.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introdução.....	5
3.1 Processo de introdução de espécies.....	6
3.2 <i>Pyromaia tuberculata</i> : classificação e características gerais.....	7
3.3 <i>Pyromaia tuberculata</i> : histórico de introdução.....	9
3.4 Marcadores moleculares mitocondriais.....	11
4. Objetivos.....	13
4.1 Objetivos gerais.....	14
4.2 Objetivos específicos.....	14
5. Material e Métodos.....	15
5.1 Obtenção dos exemplares.....	16
5.2 Obtenção dados moleculares.....	16
5.2.1 Análises moleculares.....	19
5.3 Obtenção dos dados morfológicos	21
5.3.1 Análises morfométricas.....	23
6. Resultados.....	24
6.1 Análises Moleculares.....	25
6.2 Análises Morfológicas.....	29
6.3 Análises Morfométricas tradicional.....	32
7. Discussão.....	42
7.1 Dados Moleculares.....	43
7.2 Dados morfológicos.....	44
8. Conclusões.....	51
9. Referências.....	53

Lista de Figuras

- Figura 1.** Fêmea adulta de *Pyromaia tuberculata*. Foto obtida por Buranelli, R. C. 2015..... 9
- Figura 2.** Distribuição geográfica da espécie *Pyromaia tuberculata*. Ocorrência natural da espécie registrada na literatura em vermelho. Ocorrência da espécie considerada introduzida em azul. (Modificado de Brockerhoff & McLay, 2011)..... 10
- Figura 3.** Vista dorsal do caranguejo *Pyromaia tuberculata* e caracteres mensurados. Comprimento da carapaça (CC) e largura da carapaça (LC), comprimentos do ísquio-mero (CIM), comprimento do carpo (CCa), comprimento do dátilo (CD), comprimento do própodo (CP), largura do própodo (LP). Imagem modificada de <http://researcharchive.calacademy.org/research/izg/SFBay2K/Pyromaia.htm>..... 22
- Figura 4.** Vista ventral do caranguejo *Pyromaia tuberculata* e caracteres mensurados. Comprimento do abdômen (CA) e largura do abdômen (LA). Imagem modificada de <http://researcharchive.calacademy.org/research/izg/SFBay2K/Pyromaia.htm>..... 22
- Figura 5.** Dendrograma para *Pyromaia tuberculata* e outras espécies da família Inachoididae (*Inachoides leavis*, *Collodes gibbosus* e *Aepinus septemspinosus*) e outros representantes da superfamília Majoidea (*Ethusa sexdentata*, *Acanthonyx lunulatus*, *Chorinus hero* e *Epialtus bituberculatus*), obtido por máxima verossimilhança com sequências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase COI. (Números correspondem a valores de *bootstrap*; valores $\leq 50\%$ não apresentados)..... 26
- Figura 6.** Dendrograma para *Pyromaia tuberculata* e outras espécies da família Inachoididae (*Inachoides leaves*, *Collodes gibbosus* e *Aepinus septemspinosus*) e outros representantes superfamília Majoidea (*Ethusa panamensis*, *Acanthonyx lunulatus*, *Chorinus hero* e *Epialtus bituberculatus*), obtido por máxima verossimilhança com sequências parciais do gene mitocondrial 16SrRNA. (Números correspondem a valores de *bootstraps*; valores $\leq 50\%$ não apresentados)..... 28
- Figura 7.** Imagens da vista dorsal da carapaça de *Pyromaia tuberculata* de diferentes localidades. (A) Estados Unidos, macho. (B) Japão, macho. (C) México, macho. (D) Brasil, macho. (E) Argentina, macho. (F) Austrália, fêmea..... 31

- Figura 8.** *Pyromaia tuberculata*. Visualização gráfica gerada a partir da relação entre duas variáveis (discriminantes canônicos) para as espécies de Brasil e Argentina estudadas..... 36
- Figura 9.** Análise discriminante gerada para espécimes de diferentes localidades. Grupo 1. Brasil – machos; Grupo 2. Brasil- fêmeas; Grupo 3. Argentina - machos; Grupo 4. Argentina - fêmeas; Grupo 5. México - machos; Grupo 6. Estados Unidos - machos; Grupo 7. Japão - machos; Grupo 8. Austrália - fêmeas..... 39
- Figura 10.** Golfo da Califórnia e Sinaloa. Em cinza escuro, o litoral do Golfo da Califórnia, México. Retirado de Enriquez-Andrade *et al.*, 2005..... 46
- Figura 11.** Estuário Rio de La Plata. Setas 1a e 1b durante diminuição na vazão do Rio. A. Movimento que pode explicar transporte de larvas pelágicas do Brasil para Argentina. B. Penetração da água do mar na costa Uruguaia. Seta 2 indica o movimento horizontal ao longo da costa. Retirado de Luppi *et al.*, 2003..... 50

Lista de Tabelas

Tabela 1. Primers utilizados na amplificação dos genes de interesse por meio da técnica de PCR.....	17
Tabela 2. Espécimes de caranguejos usados nas análises moleculares com respectiva data e local de coleta, número de catálogo de museu e número de acesso do banco de dados genético (Genbank).....	20
Tabela 3. Lista de caracteres morfológicos utilizados durante as análises da espécie <i>Pyromaia tuberculata</i>	21
Tabela 4. Matriz de divergência genética da subunidade do gene COI entre <i>Pyromaia tuberculata</i> e alguns representantes de Majoidea.....	25
Tabela 5. Matriz de divergência genética da subunidade do gene 16S entre <i>Pyromaia tuberculata</i> e alguns representantes de Majoidea.....	27
Tabela 6. Média e desvio padrão dos espécimes analisados de <i>Pyromaia tuberculata</i> de diferentes localidades CC – Comprimento da Carapaça; LC – Largura da Carapaça; CTQ – Comprimento Total da Quela; CIM – Comprimento Ísquio-Mero; CCa – Comprimento do Carpo; CP – Comprimento do Própodo; LP – Largura do Própodo; CD – Comprimento do Dáctilo; CA – Comprimento do Abdômen; LA – Largura do Abdômen.....	33
Tabela 7. Poder de discriminação de cada variável morfométrica e seu respectivo valor de significância entre indivíduos de Brasil e Argentina. CC: Comprimento da carapaça, CTQ: Comprimento total da quela, CIM: Comprimento ísquio-mero, CCa: Comprimento carpo, CP: Comprimento do própodo, CD: Comprimento do dáctilo, LP: Largura do própodo, CA: Comprimento do abdômen, LA: Largura do abdômen (N: 76).....	35
Tabela 8. Valores de significância da análise discriminante dos espécimes de Brasil e Argentina analisados.....	35
Tabela 9. Análise de significância das variáveis canônicas (Roots) pelo teste do χ^2 . Espécimes Brasil e Argentina.....	36
Tabela 10. Poder de discriminação de cada variável morfométrica e seu respectivo valor de significância entre todos os indivíduos mensurados. CC: Comprimento da carapaça, CTQ: Comprimento total da quela, CIM: Comprimento ísquio-mero, CCa: Comprimento carpo,	

CP: Comprimento do própodo, CD: Comprimento do dáctilo, LP: Largura do própodo,
CA: Comprimento do abdômen, LA: Largura do abdômen..... 37

Tabela 11. Valores de significância da análise discriminante dos espécimes de diferentes
localidades analisados..... 38

Tabela 12. Análise de significância das variáveis canônicas (Roots) pelo teste do χ^2 . Para
todos os indivíduos analisados de diferentes localidades..... 38

Lista de Abreviaturas

Caracteres morfométricos

CC - Comprimento da Carapaça

LC - Largura da Carapaça

CTQ - Comprimento Total da Quela

CIM - Comprimento Ísquio-mero

CCa - Comprimento do Carpo

CP - Comprimento do Própodo

LP - Largura do Própodo

CD - Comprimento do Dáctilo

CA - Comprimento do Abdômen (com excessão do télson)

LA - Largura do Abdômen (parte mais larga)

Coleções

CCDB - Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia;

LBSC - Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos;

UNAM - Universidad Autonoma de Mexico;

MZUSP - Museu de Zoologia da USP;

AM – Australian Museum

MNHN – **Muséum national d'Histoire naturelle**

Símbolos

M - Molar

µl - Microlitro

µM - Micromolar

U/ml - Unidade por mililitro

min - Minuto

pb - Pares de base

mm - Milímetro

fig. – Figura

tab. - Tabela

1. Resumo

Introduções biológicas marinhas são um componente significativo da mudança global. O caranguejo marinho *Pyromaia tuberculata* é nativo do nordeste do oceano Pacífico, com distribuição natural da Califórnia, EUA até a Colômbia. A espécie apresenta amplo histórico de introdução no Japão, Coreia, Austrália e Nova Zelândia sendo encontrada também no Brasil e Argentina. A espécie está inserida em uma controvérsia sistemática em que o posicionamento de *Pyromaia* na família Inachoididae, assim como a validade de uma única espécie para *P. tuberculata* são questionados. Além disso, pouco se sabe sobre o processo de invasão e dispersão dessa espécie introduzida na América do Sul, onde sua área de ocorrência é do Rio de Janeiro até Argentina. A presença do Rio de La plata entre Brasil e Argentina poderia atuar como uma barreira biogeográfica para a dispersão e fluxo gênico entre espécimes de *P. tuberculata* localizados em distintas províncias biogeográficas. Com base nos problemas e limitações apresentados, e utilizando dados morfológicos, morfométricos e moleculares (genes mitocondriais 16S e COI), o presente estudo buscou realizar uma revisão taxonômica da espécie *P. tuberculata* com exemplares de quase toda a sua distribuição, exceto uma localidade que não foi possível obter espécimes, além de tentar entender o padrão de introdução e dispersão da espécie no Atlântico Sul. Os resultados moleculares indicaram o posicionamento de *P. tuberculata* próximo a outras espécies da família Inachoididae, bem como uma ausência de variabilidade genética (0%) entre os indivíduos do Brasil, Argentina e Japão indicando uma possível presença de fluxo gênico entre os espécimes, independente da presença de barreiras. Além disso, diferenças nos padrões morfométricos entre os indivíduos do Brasil e Argentina poderiam estar relacionadas às variações latitudinais e disponibilidade de recursos nos diferentes locais.

Palavras-chave: 1. Brachyura 2. Espécie introduzida 3. Morfometria 4. Taxonomia 5. Variabilidade genética

2. Abstract

Marine biological introductions are a significant component of global change. Marine crab *Pyromaia tuberculata* is native to northeastern Pacific Ocean, with natural distribution of California, USA to Colombia. The species has broad historical introduction in Japan, Korea, Australia and New Zealand and it is also found in Brazil and Argentina. The species *Pyromaia* is inserted in a controversy systematic about the positioning of the genus in the family Inchoiidae, as well as the validity of a single species to *P. tuberculata* are questioned. In addition, little is known about the process of invasion and spread of this introduced species in South America, where its range is from Rio de Janeiro to Buenos Aires Argentina. The presence of the La Plata River between Brazil and Argentina could act as a biogeographical barrier to dispersal and gene flow between *P. tuberculata* specimens located in different biogeographic provinces. Based on the presented issues and limitations, and using morphological, morphometric and molecular data (mitochondrial 16S and COI), this study sought to conduct a morphological analyses of the species *P. tuberculata* with samples of almost the entire distribution, except a location that was not possible to obtain specimens, and try to understand the pattern of introduction and spread of the species in the South Atlantic. The molecular results indicated the placement of *P. tuberculata* near other species of the family Inchoiidae, even as a lack of genetic variability (0%) among individuals of Brazil, Argentina and Japan indicating a possible presence of gene flow between species, regardless of the presence of barriers. In addition, differences in morphometric patterns among individuals in Brazil and Argentina could be related to latitudinal variations and availability of resource in different locations.

Key words: 1. Brachyura 2. Introduced specie 3. Morphometry 4. Taxonomy 5. Genetic variability

3. Introdução

3.1 Processo de introdução de espécies

Atualmente uma das principais causas da modificação da biodiversidade global resulta da introdução de espécies exóticas e sua dispersão (Brockerhoff & Mclay, 2011; Loebmann *et al.*, 2010, Vitousek *et al.*, 1997).

O processo de globalização, associado à intensificação do deslocamento humano e de cargas pelo mundo, tem contribuído para a transposição das barreiras ecológicas, resultando no aumento expressivo de ocorrências de introdução de espécies exóticas, que podem causar danos econômicos e ambientais onde se inserem (Davis & Thompson, 2001; Meyerson & Mooney, 2007). O impacto de espécies exóticas sobre espécies nativas, comunidades e ecossistemas tem sido amplamente reconhecido nas últimas décadas (Stachowicz, 1999; Lowe *et al.*, 2000; Mooney & Hobbs, 2000; Grosholz, 2002), desta forma essas espécies são agora vistas como um componente significativo de mudança global, uma vez que não apenas competem por recursos com as espécies nativas, mas alteram as regras fundamentais de existência para todos os organismos da área de ocorrência (Vitousek *et al.*, 1996).

As espécies exóticas podem modificar comunidades naturais, estabelecendo novas relações ecológicas e alterando caminhos evolutivos via competição, hibridização genética e introgressão, predação, facilitação, ou a introdução de novos patógenos (Hollebone & Hay, 2008). O processo de introdução dessas espécies em um novo habitat pode ocorrer uma única vez em determinado local e posteriormente ao sucesso de seu estabelecimento se espalhar, ou ocorrer por múltiplas introduções em uma maior extensão (Sakai *et al.*, 2001).

A dispersão por longas distâncias podem levar as populações colonizadoras a sofrer novas forças seletivas, bióticas e abióticas comparadas à sua distribuição nativa (Barrett, 2015). Entre as espécies introduzidas, aquelas que são bem sucedidas em enfrentar os problemas que o ambiente proporciona podem tornar-se altamente invasivas e apresentar uma rápida expansão (Barrett, 2015).

Os ecossistemas marinhos são mais vulneráveis a introduções de espécies não nativas do que ambientes terrestres, pois sua dispersão em ambientes aquáticos é facilitada (Loebmann *et al.*, 2010). Embora mecanismos naturais de dispersão resultem na introdução de espécies marinhas (Ruiz *et al.*, 1997) a contribuição da ação humana para este processo tem crescido nos últimos séculos e continuam a crescer (Carlton & Geller, 1993; Cohen & Carlton, 1997).

Diversos mecanismos podem levar a transferência de espécies em ambientes aquáticos marinhos como: movimentos de comunidades incrustantes no fundo de navios, água de lastro, introduções acidentais relacionadas à aquicultura, pesca, conexão de vias através de canais (Ruiz *et al.*, 1997, Briski *et al.*, 2013), além de vetores relacionados ao comércio de aquário e a perfuração de plataformas para indústria de petróleo e gás (Bax *et al.*, 2003). Os navios são responsáveis pelo transporte de mais de 80% do comércio mundial, e carregam mais de 12 bilhões de toneladas de água de lastro por ano (Bax *et al.*, 2003), sendo um dos principais vetores de dispersão das espécies invasoras para áreas além do seu território natural (Ruiz *et al.*, 2000).

Os crustáceos Brachyura são considerados importantes invasores marinhos ao redor do mundo (Brockerhoff & Mclay, 2011). Atualmente são reconhecidas 73 espécies exóticas pertencentes às Infraordens Brachyura e Anomura, dentre as quais 48 são bem estabelecidas (Brockerhoff & Mclay, 2011). Três grupos se destacam pelo número elevado de espécies introduzidas em novas localidades: Portunoidea, Grapsoidea e Majoidea (incluindo a espécie alvo deste estudo) (Brockerhoff & Mclay, 2011).

3.2 *Pyromaia tuberculata*: classificação e características gerais

Pyromaia tuberculata (Lockington, 1877) (fig. 1) é uma espécie de caranguejo pertencente à família Inachoididae Dana, 1851 e inserida na superfamília Majoidea Samouelle, 1819, na qual estão incluídas as espécies popularmente conhecidas como caranguejos aranha (Hultgren & Stachowicz, 2008). Entretanto a classificação da família onde se insere *Pyromaia tuberculata* é controversa (Lemaitre *et al.*, 2001; Schejter *et al.*, 2002). Drach & Guinot (1983) elevaram a subfamília Inachoidinae, Dana 1851 ao nível de família, Inachoididae, baseado em 18 caracteres morfológicos apomórficos e incluíram o gênero *Pyromaia*. Contudo, este gênero ainda é, por alguns autores, classificado como da subfamília Inachinae (Fransozo & Negreiros-Fransozo, 1997; Lupi & Spivak, 2003; Lupi *et al.*, 2003) ou apenas até a superfamília Majoidea (Schejter *et al.*, 2002) devido incertezas quanto à essa classificação baseada em caracteres morfológicos.

Atualmente dez gêneros estão incluídos na família Inachoididae, sendo eles: *Aepinus* Rathbun, 1897; *Anasimus* A. Milne-Edwards, 1880; *Arachnopsis* Stimpson, 1871; *Batrachonotus* Stimpson, 1871; *Collodes* Stimpson, 1860; *Euprognatha* Stimpson, 1871;

Inachoides H. Milne Edwards & Lucas, 1842; *Leurocycclus* Rathbun, 1897; *Paradasygygius* Garth, 1958 e *Pyromaia* Stimpson, 1871 (Ng *et al.*, 2008).

O gênero *Pyromaia* compreende cinco espécies: *Pyromaia acanthina* Lemaitre, Campos & Bermúdez, 2001; *Pyromaia arachna* Rathbun, 1924; *Pyromaia cuspidata* Stimpson, 1871; *Pyromaia propinqua* Chace, 1940 e *Pyromaia tuberculata* Lockington, 1877 (Santana, 2008). É um gênero restrito a América, sendo encontrado nos oceanos Atlântico e Pacífico (Hendrickx, 1999), com exceção de *Pyromaia tuberculata* que também pode ser encontrado na Ásia e Oceania (Sakai, 1976; Furota & Furuse, 1988; Ah Yong, 2005; Webber & Wear, 1981).

A classificação taxonômica de *Pyromaia* Stimpson, 1871 ainda apresenta algumas incertezas quanto ao seu posicionamento na família Inachoididae, como já mencionado anteriormente, e também ao nível de espécie. De acordo com Santana (2008), a perda dos tipos de *P. tuberculata*, levou a descrição de outras três espécies posteriormente sinonimizada a ela: *Inachoides brevirostrum* Lockington, 1877; *Inachoides magdalensis* Rathbun, 1893 e *Neorhynchus mexicanus* Rathbun, 1893. Dentre as três, apenas *N. mexicanus* teve sua validade em questionamento. Devido às variações morfológicas observadas, Garth (1960) propôs a separação de *P. tuberculata* em duas subespécies, *P. tuberculata tuberculata* e *P. tuberculata mexicana*. No entanto, com base apenas em espécimes mexicanos, Hendrickx (1999) sugeriu a sinonimização de ambas à *P. tuberculata*. Santana (2008) em seu trabalho de revisão das espécies da família Inachoididae concorda com as sinonímias, baseando-se na alta variação dos caracteres morfológicos da espécie, que não sustentariam a separação.

Em sua área de distribuição natural, *P. tuberculata* geralmente é encontrada sob rochas ou entre organismos incrustantes, entre esponjas e algas marinhas (Brockhoff & McLay, 2011), podendo ocorrer da zona intertidal até em fundos lamacentos de 412 m de profundidade (Hendrickx, 1999). Esses organismos são capazes de tolerar ampla variação de temperatura e são resistentes às condições de quase anóxia (Furota, 1996b). É abundante em baías organicamente poluídas, tais como Baía de Tóquio, no Japão, e Baía de Guanabara, Brasil. A espécie é considerada oportunista, com uma longa história de sucesso em estabelecer populações autossustentáveis em novas regiões distantes (Furota, 1996a; Tavares, 2011).



Figura 1. Fêmea adulta de *Pyromaia tuberculata*. Foto obtida por Buranelli, R. C. 2015.

3.3 *Pyromaia tuberculata*: histórico de introdução

Pyromaia tuberculata é espécie nativa do nordeste do Oceano Pacífico, ocorrendo da Baía de San Francisco, Califórnia até a Colômbia (Rathbun, 1925; Garth, 1958), é considerada uma espécie com ampla introdução no oeste do Oceano Pacífico em áreas no Japão, Coréia, Austrália e Nova Zelândia e também no sudoeste do Oceano Atlântico, sendo encontrado no Brasil e Argentina (fig. 2) (Furota, 1996b; Melo *et al.*, 1996; Schejter *et al.*, 2002; Ah Yong, 2005).

O caranguejo *P. tuberculata* teve seu primeiro registro como uma espécie introduzida em 1970, na Baía de Tóquio e distribuiu-se ao longo da costa do Pacífico no Japão, parte oriental do mar da ilha Seto e no mar de Honshu, Japão (Sakai, 1976; Furota & Furuse, 1988). Posteriormente foi registrada em Western, Austrália em 1978, sendo reportado desde o sul (Port Phillip Bay) até o norte (Newcastle, NSW) (Ah Yong, 2005). Na Nova Zelândia também foi reportado pela primeira vez em 1978 em Firth of Thames, Auckland (Webber & Wear, 1981), e posteriormente teve sua dispersão mais ao norte até Whangarei (McLay, 2009).

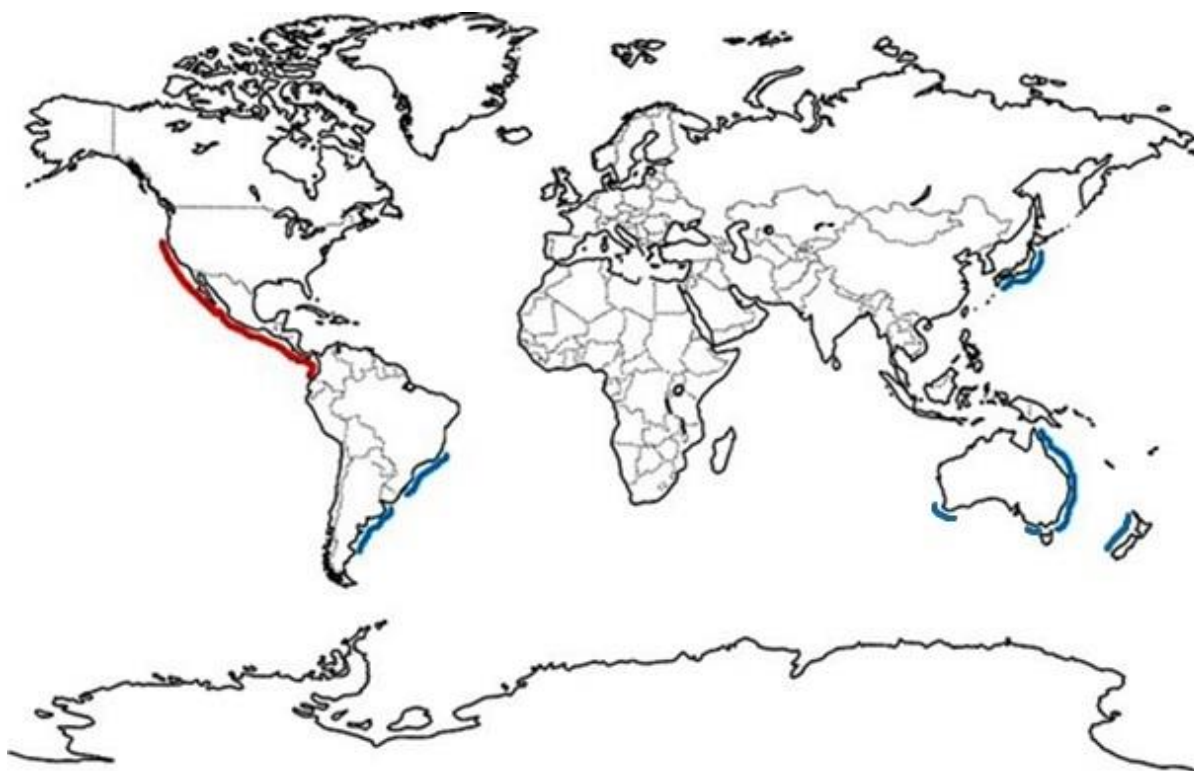


Figura 2. Distribuição geográfica da espécie *Pyromaia tuberculata*. Ocorrência natural da espécie registrada na literatura em vermelho. Ocorrência da espécie considerada introduzida em azul. (Modificado de Brockerhoff & McLay, 2011).

O primeiro registro de *P. tuberculata* no Atlântico Ocidental foi documentado por Melo *et al.* (1989) com base em uma fêmea capturada em 1988 no Paraná (Brasil). Atualmente a espécie está bem estabelecida no Brasil, nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (Tavares & Mendonça, Jr., 1996). Posteriormente foi relatada a presença de larvas e adultos em águas da costa Argentina (Schejter *et al.*, 2002). A ocorrência de *P. tuberculata* em águas argentinas (Província Argentiniana) poderia ter ocorrido por meio de navios de diferentes localidades ou por dispersão larval de espécimes provenientes do Brasil (Província Brasileira) devido à proximidade dessas províncias e o breve desenvolvimento larval da espécie. Entretanto, tem sido reportado que o Rio de La Plata, localizado entre a Argentina e o Uruguai, constitui uma importante barreira biogeográfica para diversos organismos marinhos, incluindo crustáceos decápodes, devido ao grande fluxo de água do estuário para a costa (Spivak, 1997; Schejter *et al.* 2002; Luppi *et al.*, 2003; Laurenzano *et al.*, 2012).

3.4 Marcadores moleculares mitocondriais

Uma análise genética por meio de marcadores moleculares pode fornecer importantes informações sobre a variabilidade das populações (Avise, 1987). Quanto à escolha de um marcador molecular específico deve-se considerar o objeto de estudo, mas também a viabilidade e acessibilidade das técnicas (Britto *et al.*, 2011).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é muito utilizado em estudos filogenéticos populacionais devido ser composto por um único filamento duplo de DNA circular com genes de cópia única. É herdado maternalmente nas espécies, sendo caracterizado pela ausência de recombinação gênica, além da ineficiência nos mecanismos de reparo de mutações, regiões não codificadoras raras ou ausentes. (Moritz *et al.*, 1987; Avise *et al.*, 1987; Schubart *et al.*, 2000b). Apresenta mutações pontuais constituindo a principal fonte de variação, tendo uma taxa de mutação maior do que no genoma nuclear (Schubart, 2009). Além disso, a presença de múltiplas cópias nas células facilita seu isolamento, amplificação e análise (Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Schubart, 2009).

O gene Citocromo Oxidase I (COI) é um gene mitocondrial muito utilizado para reconstruções de relações filogenéticas, diferentemente do gene 16S rDNA é codificante e o resultado da tradução do seu transcrito corresponde a uma proteína localizada na membrana interna das mitocôndrias que participam da cadeia respiratória (Schubart *et al.*, 2000a). Também é muito utilizado em estudos moleculares com crustáceos, pois é encontrada maior variabilidade do que no gene 16S, sendo empregado em análises interespecíficas e intra-específicas (Schubart & Huber, 2006; Pileggi & Mantelatto 2010; Vergamini *et al.*, 2011).

O gene 16S rDNA apresenta tanto regiões variáveis como conservadas podendo ser utilizado para estudo de eventos de especiação antigos e recentes permitindo análises interespecíficas e entre táxons mais abrangentes (Schubart *et al.*, 2000b, Schubart & Huber, 2006; Vergamini *et al.*, 2011). Seu uso em estudos filogenéticos de decápodes se deve também ao fato de que sua porção conservada ter se mostrado um importante marcador específico (Mantelatto *et al.*, 2007).

Considerando estes aspectos ambos os genes têm sido amplamente utilizados em análises moleculares de crustáceos decápodes (Schubart *et al.*, 2000b, Schubart *et al.*, 2001a e 2001b; Schubart & Huber 2006; Hultgren & Stachowicz, 2008; Mantelatto *et al.*, 2007 ; Robles *et al.*, 2007; Rossi & Mantelatto, 2013)

Tendo em vista a existência de um controverso cenário no que se refere à classificação de *Pyromaia tuberculata*, um estudo taxonômico e sistemático envolvendo a espécie juntamente com outros representantes da família Inachoididae, ajudariam a elucidar a classificação e também as relações filogenéticas entre *P. tuberculata* e outras espécies que compõem esta família. Além disso, no Atlântico Sul, apesar dos esforços de pesquisadores para tentar entender os padrões de dispersão, causas e consequências de bioinvasões, os estudos ainda são limitados. Um dos maiores desafios para o conhecimento científico atrelado à gestão dos impactos de espécies marinhas invasoras é o entendimento de seus processos de dispersão natural. Assim uma análise das populações do Brasil e Argentina da espécie introduzida *P. tuberculata*, baseados em dados moleculares e morfológicos, poderiam auxiliar na compreensão da história de introdução dessa espécie no Atlântico Sul, contribuindo com informações sobre processos de invasão em crustáceos e planejamento de estratégias de controle.

4 . Objetivos

Baseado no acúmulo de incerteza da classificação e sistemática de *Pyromaia tuberculata* e a ausência de informações sobre o modo de invasão e dispersão no Atlântico Sul Ocidental, o presente projeto tem como principais objetivos:

4.1 Objetivos gerais

Examinar a história da introdução da espécie na costa atlântica sul do continente americano, e verificar o status taxonômico da espécie *Pyromaia tuberculata*.

4.2 Objetivos específicos

- Investigar a variabilidade e estruturação genética, utilizando marcadores moleculares específicos.
- Avaliar a variabilidade morfológica dos espécimes de *P. tuberculata* ao longo da sua distribuição.

5 . Material e Métodos

5.1 Obtenção dos exemplares

Alguns dos exemplares de *Pyromaia tuberculata* analisados já estavam depositados na Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia (CCDB) do Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC), da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP). Materiais adicionais foram obtidos por empréstimos das seguintes coleções científicas: Muséum national d'histoire naturelle (MNHN), Paris, França; Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cidade do México, México; Australian Museum (AM), Sydney, Austrália; ou coletados e enviados por pesquisadores de diversas instituições como os espécimes de Buenos Aires, Argentina (Dr. Emiliano Ocampo) e da Baía de Tóquio, Japão (Dr. Matasori Tary). Além disso, foi realizada uma visita à coleção carcinológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Os animais coletados e doados foram devidamente identificados, etiquetados, armazenados em frasco com álcool etílico 80% e depositados na Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia (CCDB) do Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo/Brasil.

5.2 Obtenção dos dados moleculares

Todos os procedimentos seguiram protocolos de Mantelatto *et al.* (2009) e Pileggi e Mantelatto (2010) descritos a seguir, com adequação necessária para o material em questão.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído do tecido muscular dos quelípodos de *Pyromaia tuberculata*. O tecido foi colocado em um tubo com tampão de 600 µl de Lysis Buffer e 200 µl de Proteinase K (PK) (500 µg/mL), posteriormente as amostras foram incubadas em banho seco por um período de 24-48 h a 55°C. Após a digestão completa do tecido, proteínas foram separadas pela adição de 200 µl de acetato de amônio (NH₄ OAc 7,5 M) anteriormente à centrifugação de 10 min. O DNA foi precipitado pela adição de Isopropanol resfriado seguido de centrifugação. O resíduo (pellet) resultante da decantação de DNA (após 24 h de descanso a -20°C) foi lavado com 15 µl de ETOH 70%, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. Em seguida o pellet foi liofilizado a 60°C na Centrifuga Vácuo Eppendorf Concentrator 5301[®] por aproximadamente 15 min e ressuspendido em 20 µl

de Milli-Q. A amostra foi incubada em banho seco por 15 min a 65°C e posteriormente armazenada em freezer.

Amplificação de DNA

A região de interesse (fragmentos dos genes mitocondriais 16S e COI) foi amplificada por meio da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando iniciadores (*primers*) específicos (tab. 1). Os produtos de PCR foram obtidos em reação de 25 µl contendo 4-6 µl de Água ultrapura (H₂O Milli-Q), 5 µl de Betaína (5M), 4 µl de DNTPs (10 mM), 3 µl de PCR Buffer (10X), 3 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl de solução BSA 1%, 1 µl de cada *primer* específico (16S 10 µM e COI 20 µM), 0,5 µl *Thermus aquaticus* polimerase (5 U/µl) e uma determinada concentração de DNA.

A amplificação de fragmentos dos genes COI e 16S foram realizadas em um termociclador Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler[®] com os seguintes ciclos termais adequados para cada primer: 16S – 40 ciclos de: desnaturação inicial por 4 min a 95°C; anelamento (45s a 95°C; 45s a 52-56°C e 1 min a 72°C); extensão final por 6 min a 72°C; COI – 40 ciclos de: desnaturação inicial por 4 min a 94°C; anelamento (45s a 94°C; 45s a 42-48°C e 1 min a 72°C); extensão final por 7 min a 72°C; 40 ciclos. As reações foram acompanhadas de um controle negativo com todos os componentes da reação exceto o DNA.

Os resultados obtidos foram observados em eletroforese com gel de agarose 1,5%, utilizando Gel red e Loading como reagentes. O tamanho dos fragmentos obtidos foram comparados com um marcador com fragmentos de tamanho conhecido e fotografados com câmara digital C-7070 Olympus[®] em um transluminator UV M20 UVP[®].

Tabela 1. *Primers* utilizados na amplificação dos genes de interesse por meio da técnica de PCR

Gene	Primer	Sequência	Referência
16S	16SF	5'-CTAAGGTAGCATAATCA-3'	Hultgren & Stachowicz, 2008
	16SR	5'-ATGATCATCCAATTGAT-3'	
COI	COH6	5'-TADACTTCDGGRTGDCCAAARAAYCA-3'	Schubart & Huber, 2006
	COL6b	5'-ACAAATCATAAAGATATYGG-3'	

Purificação e amplificação dos produtos do PCR

A purificação foi realizada por meio do kit SureClean Plus[®]. Foi adicionado o volume de SureClean igual ao volume do produto de PCR, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A amostra foi centrifugada por 15 min, a 14.000 rpm e em seguida o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado ETOH 70%, duas vezes o volume da amostra e homogeneizada a mistura no vórtex. A amostra foi centrifugada por 15 min, a 14.000 rpm e o sobrenadante descartado. Em seguida a amostra foi liofilizada a 60°C na Centrifuga Vácuo Eppendorf Concentrator 5301[®] por aproximadamente 5 min posteriormente ressuscitado em H₂O Mili-Q.

O sequenciamento das amostras foi realizado em um sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer[®] (Applied Biosystems) no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV-UNESP), por meio do kit de reação ABI Big Dye[®] Terminator Mix (Applied Biosystems).

Edição de sequências

Todas as sequências obtidas foram confirmadas pelo sequenciamento de ambas as fitas (senso e anti-senso). A edição e o consenso de ambas as fitas foram realizados utilizando-se o software BioEdit 7.0.5 (Hall, 2005). Todas as fitas obtidas foram comparadas com a base de banco de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Entretanto, não existe qualquer sequência para o gênero *Pyromaia* no banco de dados, assim foi possível observar similaridade nas sequências já depositadas da superfamília Majoidea como *Inachoides laevis* para eliminação de possíveis contaminações. As sequências obtidas de fragmentos dos genes mitocondriais 16S e COI foram previamente editadas e alinhadas no programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), com interface no BioEdit. Posteriormente todas as sequências foram submetidas ao banco de dados genéticos - Genbank (ver números de acessos na tab. 2).

5.2.1 Análises moleculares

Análise de distância genética

No intuito de checar a divergência genética entre as sequências foi construída para cada gene uma matriz de divergência genética no programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) a partir da comparação par a par ou pares do modelo de substituição de distância não corrigida ou *distância p*, método geométrico que analisa a proporção de posições divergentes entre duas sequências para o número de nucleotídeos.

Análise filogenética

No intuito de checar o posicionamento da espécie *Pyromaia tuberculata* no contexto da família Inachoididae, foram realizadas análises filogenéticas por meio do método de Máxima Verossimilhança para os genes mitocondriais COI e 16S.

A escolha dos grupos externos foi feita com base nas relações filogenéticas da família Inachoididae (*Inachoides leavis* Stimpson, 1860, *Collodes gibbosus* (Bell, 1835) e *Aepinus septemspinosus* (A. Milne-Edwards, 1878) e demais membros da superfamília Majoidea (*Ethusa panamensis* Finnegan, 1931, *Ethusa sexdentata* (Stimpson, 1858), *Acanthonyx lunulatus* (Risso, 1816), *Chorinus hero* (Herbst, 1790) e *Epialtus bituberculatus* H. Milne Edwards, 1834), de acordo com os trabalhos de Ng *et al.* 2008; Windsor & Felder (2014). As sequências utilizadas foram retiradas do Genbank (tab. 2).

Máxima verossimilhança (MV)

Esse método busca inferir a árvore evolutiva por meio da busca da árvore que maximiza a probabilidade de observação dos dados, calcula a árvore de maior probabilidade de ocorrência e pode levar em consideração parâmetros como taxa de substituição e substituição de bases a partir de um modelo evolutivo escolhido (Hall, 2011). O modelo evolutivo assumido foi o General Time Reversible (GTR) + Gamma (G) + Proporção Invariante (I), inserido no RAxML 7.2.7 (“Randomized Axelerated Maximum Likelihood”) (Stamatakis, 2006) acessado no portal CIPRES (Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research, www.phylo.org). A consistência interna dos ramos foi avaliada pelo método de “bootstrap” (Felsenstein, 1985) e apenas valores de confiança acima de 50% foram apresentados. A árvore produzida foi visualizada e editada no programa FigTree v1.3.1

(Rambaut, 2009) e posteriormente os nomes dos taxa editados no programa Photoshop Adobe Photoshop CS3.

Tabela 2. Espécimes de caranguejos usados nas análises moleculares com respectiva data e local de coleta, número de catálogo de museu e número de acesso do banco de dados genético (Genbank).

Espécie	Localidade	Tombo em coleção	GenBank	
			16S	COI
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Ubatuba, SP – Brasil	CCDB 4147	KT982258	KT982273
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Ubatuba, SP – Brasil	CCDB 4147	KT982259	KT982272
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Ubatuba, SP - Brasil	CCDB 4147	-	KT982271
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Ubatuba, SP – Brasil	CCDB 4147	-	KT982267
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Buenos Aires - Argentina	CCDB 5457	KT982260	KT982270
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Buenos Aires - Argentina	CCDB 5457	KT982261	KT982269
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Buenos Aires - Argentina	CCDB 5457	-	KT982268
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Buenos Aires - Argentina	CCDB 5457	KT982262	KT982266
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Baia de Tóquio - Japão	CCDB 5900	-	KT982265
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Baia de Tóquio - Japão	CCDB 5900	KT982263	KT982264
Grupos externos				
<i>Inachoides leavis</i>	Panamá	ULLZ 9156	KF453025	KF452945
<i>Collodes gibbosus</i>	Panamá	ULLZ 8229	KF453014	KF452933
<i>Aepinus septemspinosus</i>	Golfo do México	ULLZ 6676	KF452998	KF452918
<i>Ethusa panamensis</i>	Panamá	ULLZ 8226	KF453013	-
<i>Epialtus bituberculatus</i>	Panamá	ULLZ 10757	-	KF452898
<i>Acanthonyx lunulatus</i>	Cabo Verde	ULLZ 11713	KF452983	KF452903
<i>Chorinus heros</i>	Belize	ULLZ 11199	KF452977	ULLZ 11199

5.3 Obtenção dos dados morfológicos

Dados morfológicos

A identificação dos exemplares foi baseada em caracteres morfológicos previamente propostos na literatura (Lockington, 1877; Rathbun, 1925; Melo, 1996) e além das análises morfológicas dos caracteres clássicos sob estereomicroscópio, novos caracteres foram procurados, que pudessem ser informativos em relação à espécie. Foram averiguados os caracteres diagnósticos da espécie *Pyromaia tuberculata* que juntamente com outros caracteres levantados durante esse trabalho foram reunidos e organizados sob a forma de uma lista (tab. 3), que serviu de guia durante a comparação morfológica. As análises morfológicas realizadas no LBSC/FFCLRP/USP foram feitas sob estereomicroscópio MZ6 LEICA®.

Tabela 3. Lista de caracteres morfológicos utilizados durante as análises da espécie *Pyromaia tuberculata*.

Caracteres Morfológicos
Carapaça: presença tubérculos, grânulos e espinhos;
Quelípodo: forma; forma de dentes dos dedos da quela e presença de cerdas e grânulos;
Fronte: formato;
Pernas ambulatórias: forma, presença de cerdas;
Esterno: sulcos e disposição dos grânulos
Abdômen: disposição e grânulos; presença tubérculo no primeiro somito;
Espinhas ou grânulos: número e formato;

Dados morfométricos

Para obtenção dos dados morfométricos, os espécimes foram mensurados com paquímetro digital STARRETT® 727 (0,01 mm) no intuito de observar variação no tamanho corporal desses indivíduos. Mensurou-se o comprimento da carapaça (CC) e largura da carapaça (LC), além do comprimento total da quela (CTQ), comprimentos do ísquio-mero (CIM), comprimento do carpo (CCa), comprimento do dátilo (CD), comprimento do própodo (CP), largura do própodo (LP), comprimento do abdômen (CA) e largura do abdômen (LA) (figs. 3 e 4). Dados obtidos compilados na tab. 6.

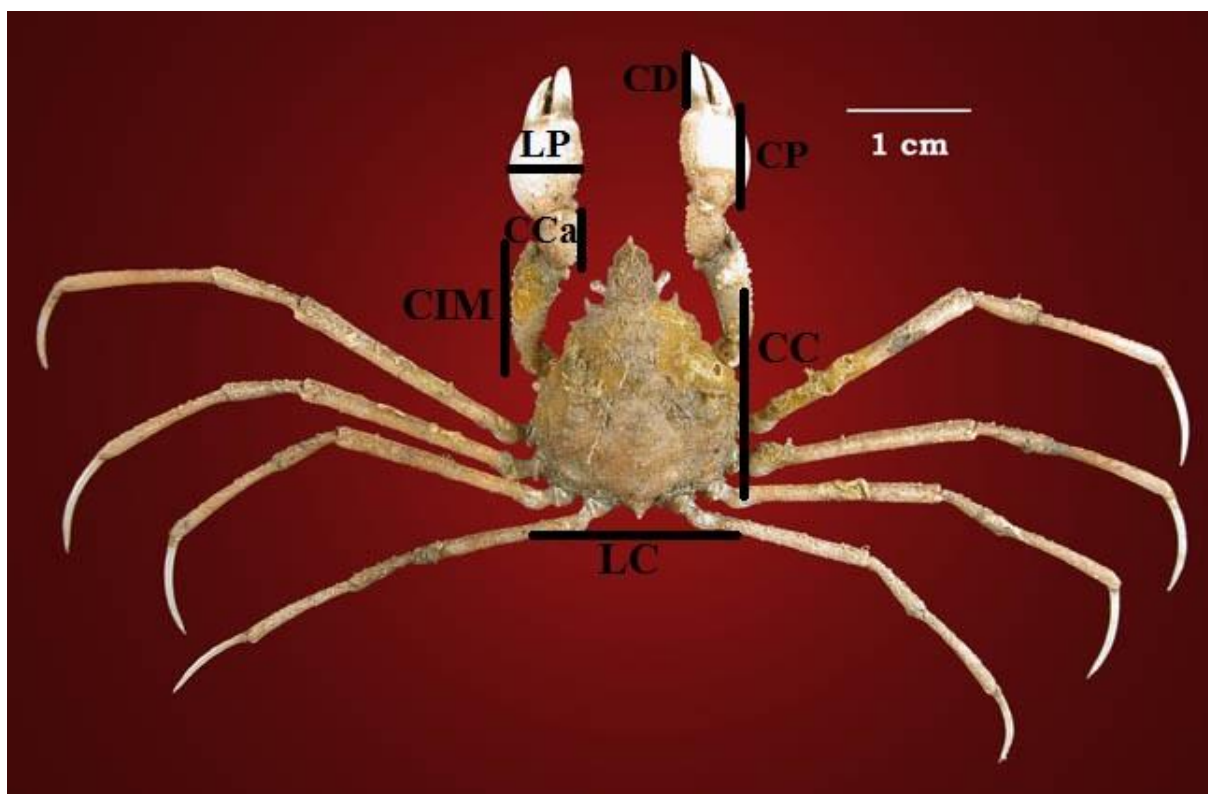


Figura 3. Vista dorsal do caranguejo *Pyromaia tuberculata* e caracteres mensurados. Comprimento da carapaça (CC) e largura da carapaça (LC), comprimentos do ísquio-mero (CIM), comprimento do carpo (CCa), comprimento do dátilo (CD), comprimento do própodo (CP), largura do própodo (LP). Imagem modificada de <http://researcharchive.calacademy.org/research/izg/SFBay2K/Pyromaia.htm>



Figura 4. Vista ventral do caranguejo *Pyromaia tuberculata* e caracteres mensurados. Comprimento do abdômen (CA) e largura do abdômen (LA). Imagem modificada de <http://researcharchive.calacademy.org/research/izg/SFBay2K/Pyromaia.htm>

5.3.1 Análises morfométricas

As 10 variáveis mensuradas foram submetidas a análises morfométricas tradicionais, de discriminância e discriminante canônicos, nos programas SAS (Statistical Analysis System software) e Past3 (Hammer *et al.*, 2001).

A equação alométrica $Y = aX^b$ foi usada para remoção do efeito da variação da largura da carapaça (LC, variável independente) que pode influenciar nos resultados, nas estruturas corporais mensuradas (variáveis dependentes), separadamente (Tzeng, 2004). Todas as características de tamanho foram padronizadas de acordo com:

$$Yi^* = Yi \left[\frac{\bar{X}}{Xi} \right]^b$$

No qual Yi^* é o tamanho padronizado da característica que se deseja; Yi é o tamanho da característica que vai ser padronizada; $\bar{X}$ é a média do comprimento da carapaça da amostra analisada e Xi é o comprimento da carapaça dos indivíduos analisados (Tzeng, 2004).

Posteriormente foi realizada uma Análise Discriminante (AD), para buscar evidências da existência ou não de diferenças morfométricas entre os indivíduos e determinar quais variáveis (estruturas corporais) foram mais relevantes em uma possível separação de grupos em estudo. O poder de discriminação de cada variável foi observado pelo Wilks'lambda associados aos valores estatísticos de F e P (valores de $F < 1$, foram considerados na AD). Valores de Wilks'lambda podem variar de 0 a 1, sendo, 0 = total discriminação e 1 ausência de discriminação. Adicionalmente, foi realizada uma análise de discriminantes canônicos para evidenciar graficamente a separação dos grupos (espécies). As variáveis canônicas ("Roots") foram testadas quanto à sua significância pelo teste do Chi-quadrado.

6. Resultados

6.1 Análises moleculares

Gene Mitochondrial Citocromo Oxidase I (COI)

Foram obtidas 10 sequências de espécimes de *P. tuberculata* provenientes de três localidades distintas, Brasil e Argentina (Atlântico Sul) e Japão (Pacífico). Adicionalmente foram utilizadas sequências de diferentes espécies de Majoidea provenientes de Belize, Cabo Verde, Filipinas, Golfo do México e Panamá, obtidas do Genbank (tab. 2). O alinhamento total das sequências obtidas foi de 570 pares de bases.

Distância genética intraespecífica para a espécie *Pyromaia tuberculata* foi de 0% (e.g. *Pyromaia tuberculata*_Brasil e *Pyromaia tuberculata*_Japão) (tab. 4). A variação intergenérica variou de 15% a 19% entre as espécies da família Inachoididae (e.g. *Pyromaia tuberculata*_Brasil e *Aepinus septemspinus*_Golfo do México) e de 15% a 27% entre as espécies de Majoidea (e.g. *Pyromaia tuberculata*_Brasil e *Ethusa panamensis*_Panamá) (tab. 4).

Tabela 4. Matriz de divergência genética da subunidade do gene COI entre *Pyromaia tuberculata* e alguns representantes de Majoidea.

Espécime	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Brasil	0.000																
2_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Brasil	0.000	0.000															
3_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Brasil	0.000	0.000	0.000														
4_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Brasil	0.000	0.000	0.000	0.000													
5_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Argentina	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
6_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Argentina	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
7_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Argentina	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
8_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Argentina	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
9_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Japão	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
10_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Japão	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
11_ <i>Collodes gibbosus</i> _Panamá	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.000						
12_ <i>Inachoides leavis</i> _Panamá	0.147	0.147	0.147	0.147	0.147	0.147	0.147	0.147	0.147	0.147	0.207	0.000					
13_ <i>Aepinus septemspinus</i> _Golfo do México	0.192	0.192	0.192	0.192	0.192	0.192	0.192	0.192	0.192	0.192	0.195	0.202	0.000				
14_ <i>Acanthonyx lunulatus</i> _Cabo Verde	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.220	0.238	0.235	0.000			
15_ <i>Chorinus heros</i> _Belize	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252	0.231	0.223	0.229	0.204	0.000		
16_ <i>Epiplatys bituberculatus</i> _Panamá	0.233	0.233	0.233	0.233	0.233	0.233	0.233	0.233	0.233	0.233	0.252	0.266	0.252	0.210	0.225	0.000	
17_ <i>Ethusa sexdentata</i> _Panamá	0.243	0.243	0.243	0.243	0.243	0.243	0.243	0.243	0.243	0.243	0.264	0.262	0.271	0.243	0.264	0.258	0.000

Na análise filogenética utilizando o critério de Máxima Verossimilhança (fig. 5) foi observado um clado formado por todos os espécimes de *P. tuberculata*, indicando a monofilia da espécie, com alto valor de *bootstrap* (100%). Além disso, foi observado o posicionamento de *P. tuberculata* como grupo irmão de *Inachoides leavis*, com alto suporte de *bootstrap* (99%). O clado formado por *P. tuberculata* e *I. leavis* ficou posicionado como grupo irmão de *Collodes gibbosus* e *Aepinus septemspinosus* com alto suporte (100%), todos representantes da família Inachoididae. Este último clado foi posicionado como grupo irmão do clado formado por *Ethusa sexdentata*, *Acanthonyx lunatus*, *Chorinus heros* e *Epialtus bituberculatus*, outros representantes de Majoidea.

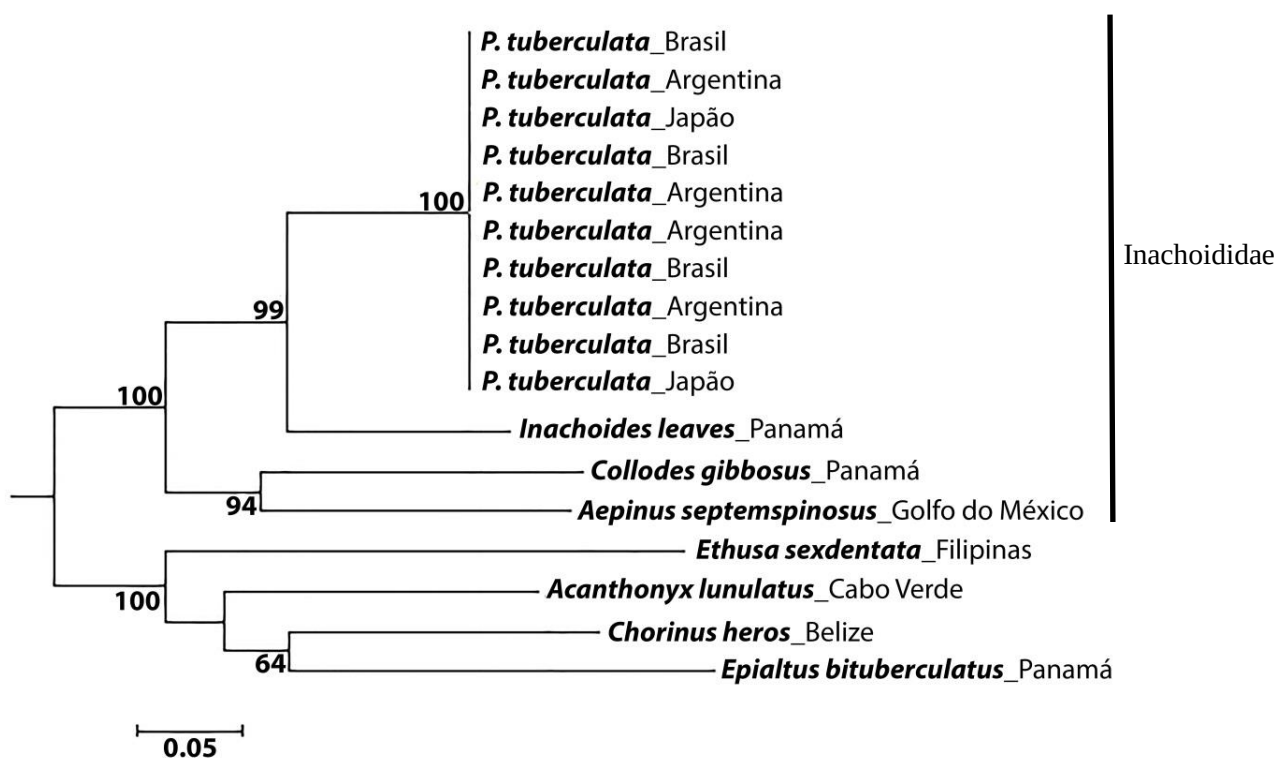


Figura 5. Dendrograma para *Pyromaia tuberculata* e outras espécies da família Inachoididae (*Inachoides leavis*, *Collodes gibbosus* e *Aepinus septemspinosus*) e outros representantes da superfamília Majoidea (*Ethusa sexdentata*, *Acanthonyx lunulatus*, *Chorinus hero* e *Epialtus bituberculatus*), obtido por máxima verossimilhança com sequências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase COI. (Números correspondem a valores de *bootstrap*; valores $\leq 50\%$ não apresentados).

Subunidade Ribossomal 16S

Esse gene mostrou-se de difícil amplificação para os espécimes de *P. tuberculata*. Foram geradas seis sequências de indivíduos do Brasil, Argentina (Atlântico Sul) e Japão (Pacífico). Assim como para o gene COI, sequências adicionais de diferentes espécies de Majoidea provenientes de Belize, Cabo Verde, Golfo do México e Panamá, foram obtidas do Genbank e utilizadas nas análises (tab. 2). O alinhamento total das sequências obtidas foi de 420 pares de bases.

A distância genética intraespecífica para a espécie *Pyromaia tuberculata* foi de 0% a 3% (e.g. *Pyromaia tuberculata*_Brasil e *Pyromaia tuberculata*_Japão) (tab. 5). No entanto, a variação intergenérica foi de 6% a 23% entre as espécies da família Inachoididae (e.g. *Pyromaia tuberculata*_Brasil e *Aepinus septemspinosus*_Golfo do México) e de 6% a 35% entre as espécies de Majoidea (e.g. *Pyromaia tuberculata*_Brasil e *Acanthonyx lunatus*_Cabo Verde) (tab. 5).

Tabela 5. Matriz de divergência genética da subunidade do gene 16S entre *Pyromaia tuberculata* e alguns representantes de Majoidea.

Espécime	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Brasil	0.000												
2_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Brasil	0.000	0.000											
3_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Argentina	0.000	0.000	0.000										
4_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Argentina	0.000	0.000	0.000	0.000									
5_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Argentina	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
6_ <i>Pyromaia tuberculata</i> _Japão	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000							
7_ <i>Collodes gibbosus</i> _Panamá	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.134	0.000						
8_ <i>Inachoides leavis</i> _Panamá	0.060	0.060	0.060	0.060	0.060	0.063	0.131	0.000					
9_ <i>Aepinus septemspinosus</i> _Golfo do México	0.229	0.229	0.229	0.229	0.229	0.233	0.144	0.213	0.000				
10_ <i>Acanthonyx lunulatus</i> _Cabo Verde	0.321	0.321	0.321	0.321	0.321	0.326	0.289	0.294	0.359	0.000			
11_ <i>Chorinus heros</i> _Belize	0.270	0.270	0.270	0.270	0.270	0.274	0.263	0.256	0.330	0.214	0.000		
12_ <i>Epialtus bituberculatus</i> _Panamá	0.326	0.326	0.326	0.326	0.326	0.330	0.278	0.305	0.348	0.241	0.258	0.000	
13_ <i>Ethusa panamensis</i> _Panamá	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.353	0.296	0.340	0.316	0.297	0.289	0.290	0.000

Na análise filogenética utilizando o critério de Máxima Verossimilhança (fig. 6) foi recuperada a mesma topologia para o gene COI, onde foi observado um clado formado por todos os espécimes de *P. tuberculata*, indicando a monofilia da espécie, com alto valor de *bootstrap* (100%). Foi observado o posicionamento de *P. tuberculata* como grupo irmão de

Inachoides leavis, com alto suporte de *bootstrap* (100%). O clado formado por *P. tuberculata* e *I. leavis* ficou posicionado como grupo irmão de *Collodes gibbosus* e *Aepinus septemspinosus* com alto valor de suporte (100%), todos representantes da família Inachoididae. Este último clado ficou posicionado como grupo irmão do clado formado por *Ethusa panamensis*, *Acanthonyx lunatus*, *Chorius heros* e *Epialtus bituberculatus*, outros representantes de Majoidea

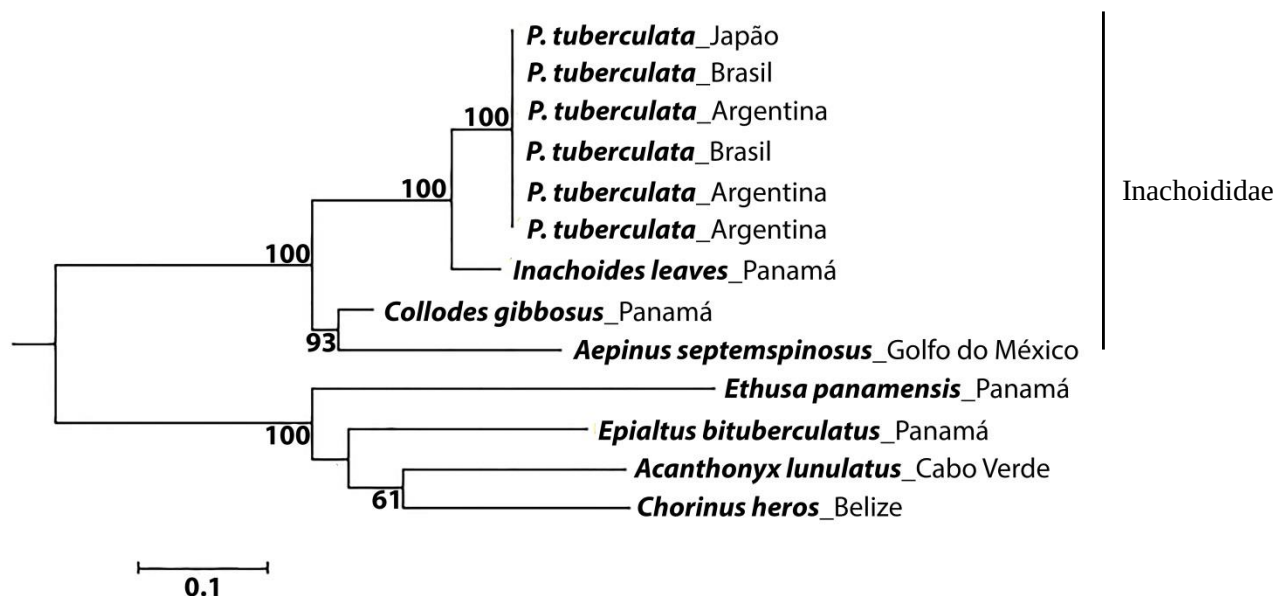


Figura 6. Dendrograma para *Pyromaia tuberculata* e outras espécies da família Inachoididae (*Inachoides leavis*, *Collodes gibbosus* e *Aepinus septemspinosus*) e outros representantes superfamília Majoidea (*Ethusa panamensis*, *Acanthonyx lunulatus*, *Chorius hero* e *Epialtus bituberculatus*), obtido por máxima verossimilhança com sequências parciais do gene mitocondrial 16S rRNA. (Números correspondem a valores de bootstraps; valores $\leq 50\%$ não apresentados).

6.2 Análises morfológicas

Os exemplares analisados estão de acordo com a descrição e variações propostas na literatura (Lockington, 1877; Rathbun, 1925; Melo, 1996). Com exceção aos espécimes do México, não foram observadas diferenças significativas dos caracteres morfológicos utilizados para a comparação dos espécimes de *P. tuberculata* (tab. 1) que distinguíssem os espécimes dos Estados Unidos, Japão, Brasil, Argentina e Austrália (fig. 7 A, B, D, E e F), apesar de *P. tuberculata* apresentar a morfologia externa bastante variável (Hendrickx, 1999; Santana, 2008). Além disso, foi verificado um distinto padrão entre machos e fêmeas, que apresentaram: tamanho da carapaça, dos tubérculos e do rostro menores nas fêmeas, padrão de granulação e tamanho da carapaça e abdômen diferentes, sendo as fêmeas mais granuladas do que os machos e também apresentam região branquial mais inflada, forma dos quelípodos diferentes, sendo que os machos apresentam quela inflada e hiato entre o dedo móvel e fixo, indicando dimorfismo sexual entre os espécimes.

A elevada variação morfológica observada na espécie, de acordo com Santana (2008) motivaram a descrição de 3 espécies, *Inachoides brevirostrum* Lockington, 1877; *Inachoides magdalenensis* Rathbun, 1893 e *Neorhynchus mexicanus* Rathbun, 1893, todas posteriormente sinonimizadas a *Pyromaia tuberculata* (Rathbun, 1925). Devido a grande diferença morfológica observada nos espécimes mexicanos, Garth (1958) propôs a ressuscitação de *Neorhynchus mexicanus* como a subespécie *Pyromaia tuberculata mexicana* Rathbun, 1893. No entanto, Hendrickx (1999) sugeriu que as diferenças morfológicas observadas entre os exemplares analisados do Golfo do México, comparados com espécimes provenientes de Sinaloa, identificados como *Pyromaia tuberculata tuberculata* Garth, 1960, não justificavam a separação em subespécie como sugerido por Garth (1958, 1960) e sinonimizou ambas a *P. tuberculata*.

Os espécimes mexicanos analisados, provenientes do Golfo do México, apresentam formato da carapaça, tamanho do rostro e padrão de granulação da carapaça e quela visivelmente distintos em relação aos demais (fig. 7 C), assim como observado por Santana (2008). O distinto padrão morfológico observado levantou dúvidas sobre a identificação dos espécimes, apesar da classificação proposta por Rathbun (1925) sugerir a ocorrência de três possíveis variações de formas: variação A: dois tubérculos gástricos largos, poucos grânulos, maior parte da carapaça lisa, pernas longas e finas; variação B: um tubérculo gástrico, grânulos grossos cobrindo quase que inteiramente a carapaça e rostro curto e grosso; e variação C ou típico: um tubérculo gástrico largo, grânulos não cobrem totalmente a carapaça,

rosto longo, ou tão longo quanto largo. Desta maneira, os espécimes mexicanos se encaixariam na descrição da variação B. No entanto, os caracteres como rosto muito curto, carapaça não piriforme com a região branquial mais inflada e a palma da quela com poucas cerdas e grânulos mostram ser controversos para diversos autores (Garth, 1960; Hendrickx, 1999; Santana, 2008) sendo necessárias outras análises e mais exemplares, incluindo resultados moleculares, para a correta identificação e confirmação de sua sinonímia com *P. tuberculata*.

No presente trabalho não foi possível obter dados moleculares dos espécimes do México analisados, provavelmente devido ao tipo de conservação deste material. A obtenção de novos exemplares é bastante difícil (M. Hendrickx com. pes.). Portanto, não foi possível, a partir dos dados moleculares, inferir sobre a similaridade genética dos exemplares mexicanos em relação aos do Atlântico Sul ou Japão. No entanto, apenas baseando-se nos dados morfológicos obtidos é possível verificar que os caracteres propostos para *P. tuberculata mexicana* Garth, 1960 ou a variação B de Rathbun (1935) são bastante distintos dos exemplares dos Estados Unidos, Japão, Austrália, Argentina e Brasil, aventando a possibilidade da ressuscitação de *P. tuberculata mexicana*.

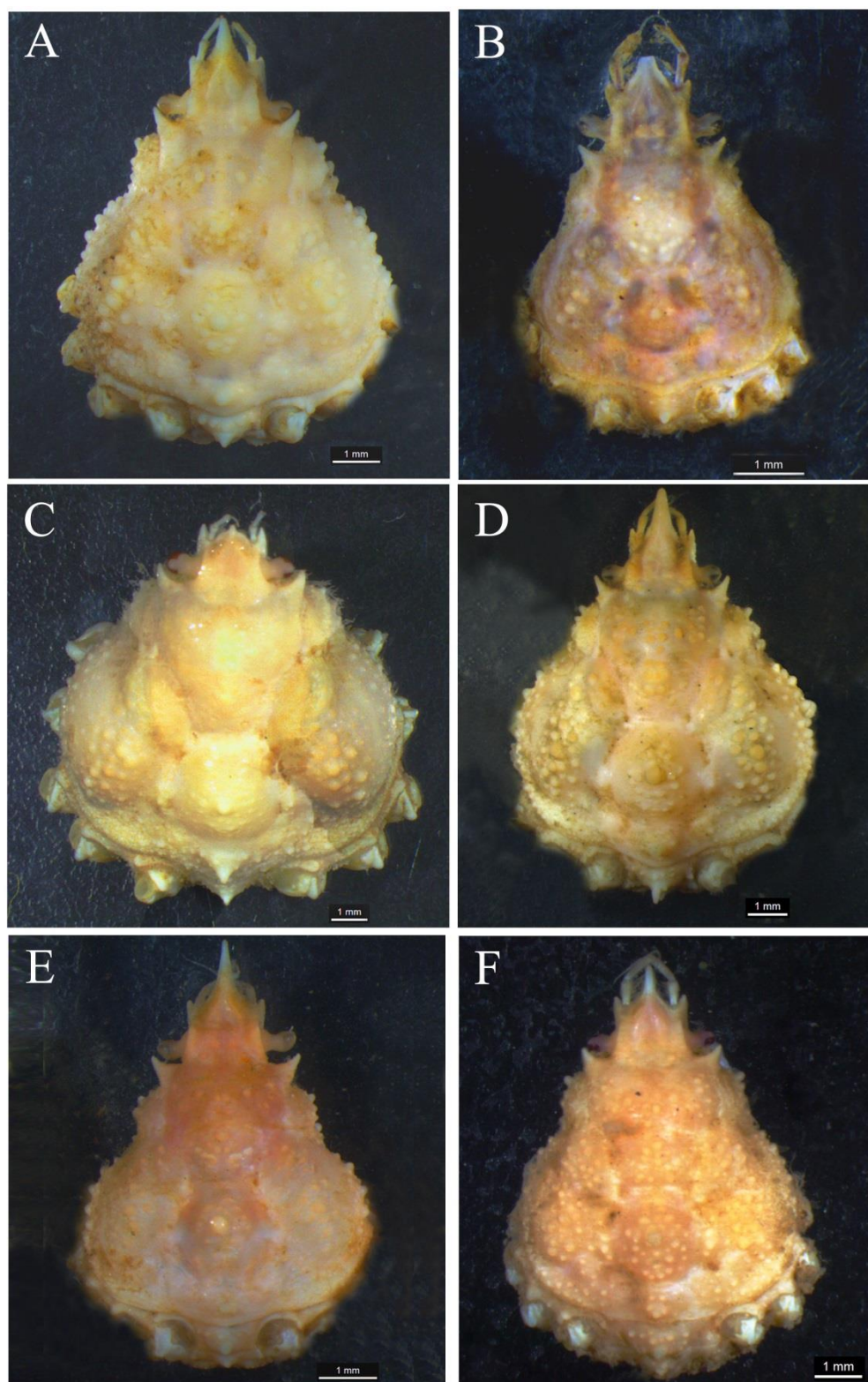


Figura 7. Imagens da vista dorsal da carapaça de *Pyromaia tuberculata* de diferentes localidades. (A) Estados Unidos, macho. (B) Japão, macho. (C) México, macho. (D) Brasil, macho. (E) Argentina, macho. (F) Austrália, fêmea.

6.3 Análises morfométricas tradicional

Para as análises foram utilizados 62 indivíduos do Brasil, 14 indivíduos da Argentina, 2 dos Estados Unidos, 2 do México, 2 do Japão e 2 da Austrália, identificados como *P. tuberculata*. A largura da carapaça variou de 6,09 a 18,12 mm e as médias das medidas obtidas para cada estrutura mensurada nas diferentes localidades encontram-se na tabela 6. Após a verificação da presença de dimorfismo sexual na espécie, fêmeas e machos foram tratados como grupos distintos, Brasil: machos - grupo 1 (43 indivíduos), fêmeas - grupo 2 (19 indivíduos). Argentina: machos - grupo 3 (7 indivíduos), fêmeas - grupo 4 (7 indivíduos). México: machos – grupo 5 (2 indivíduos). Estados Unidos: machos – grupo 6 (2 indivíduos). Japão: machos – grupo 7 (2 indivíduos). Austrália: fêmeas – grupo 8 (2 indivíduos).

Tabela 6. Média e desvio padrão dos espécimes analisados de *Pyromaia tuberculata* de diferentes localidades. CC – Comprimento da Carapaça; LC – Largura da Carapaça; CTQ – Comprimento Total da Quela; CIM – Comprimento Ísquio-Mero; CCa – Comprimento do Carpo; CP – Comprimento do Próopodo; LP – Largura do Próopodo; CD – Comprimento do Dáctilo; CA – Comprimento do Abdômen; LA – Largura do Abdômen.

Espécie	Localidade – Sexo	CC (mm) ($\bar{X} \pm dp$)	LC (mm) ($\bar{X} \pm dp$)	CTQ (mm) ($\bar{X} \pm dp$)	CIM (mm) ($\bar{X} \pm dp$)	CCa (mm) ($\bar{X} \pm dp$)	CP (mm) ($\bar{X} \pm dp$)	LP (mm) ($\bar{X} \pm dp$)	CD (mm) ($\bar{X} \pm dp$)	CA (mm) ($\bar{X} \pm dp$)	LA (mm) ($\bar{X} \pm dp$)
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Brasil – machos (43)	12,07±2,26	11,29±2,29	21,83±5,33	8,80±2,12	3,12±0,79	5,37±1,39	4,53±1,26	3,76±1,25	5,09±1,1	3,99±1,33
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Brasil – fêmeas (19)	11,33±1,71	10±1,52	14,49±2,23	6,27±1,05	2,11±0,44	3,15±0,43	2,95±0,57	1,51±0,38	7,2±1,16	8,89±1,33
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Argentina – machos (7)	10,13±0,99	9,23±0,76	17,93±1,18	7,37±0,75	2,59±0,18	4,61±0,61	3,44±0,28	3,14±0,65	6,12±0,64	8,05±1,07
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Argentina – fêmeas (7)	8,12±0,62	6,99±0,61	10,07±1,68	4,12±0,93	1,42±0,33	2,37±0,18	2,15±0,43	1,04±0,11	4,78±0,39	6,18±0,54
<i>Pyromaia tuberculata</i>	México – machos (2)	16,73 ±2,70	16,42±2,4	31,56±5,93	11,405±1,85	4,98±1,21	8,11±1,37	7,065±1,49	6,3±1,23	7±1,17	4,44±1,73
<i>Pyromaia tuberculata</i>	EUA – machos (2)	11,14±1,98	11,745±1,9	21,365±3,57	7,41±1,4	3,795±0,58	4,83±0,33	5,33±1,24	3,365±0,81	5,645±1,81	4,42±1,92
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Japão – machos (2)	7,985±0,48	6,8±1,15	13,245±0,26	5,285±1,16	1,885±0,23	3,235±0,34	2,84±0,15	1,73±0,16	3,62±0,26	2,775±0,14
<i>Pyromaia tuberculata</i>	Austrália – fêmeas (2)	13,03±1	11,915±0,23	16,755±0,74	6,38±0,42	2,43±0,15	3,945±0,09	4±0,25	1,87±0	8,42±0,21	10,15±0,63

Após a remoção do efeito da largura da carapaça sobre as análises, a partir da aplicação da equação alométrica proposta por Tzeng (2004), como já exposto foi realizada uma análise discriminante utilizando-se de uma técnica multivariada exploratória para mostrar quais variáveis mensuradas são significativas na separação dos grupos.

Primeiramente realizamos as análises com indivíduos do Brasil e da Argentina (N: 76). Foi observado que praticamente todas as variáveis, exceto o comprimento do própodo e a largura do abdômen, mostraram ser significativas na separação dos grupos e apresentaram poder de discriminância entre os espécimes destes grupos (tab. 7). Testes complementares foram realizados *a posteriori*. A análise de discriminante demonstrou diferenças estatísticas significativas entre os grupos ($p < 0,05$) (tab. 8). A análise de discriminantes canônicas apresentou duas variáveis (Roots) como significativas ($p < 0,05$) (tab. 9) e pode ser melhor visualizada na figura 8.

Posteriormente as mesmas análises foram realizadas com os valores obtidos com espécimes de todas as localidades estudadas. O poder de discriminância de todas as variáveis mostrou ser significativo para a separação entre os grupos (tab.10). Assim como para os espécimes de Brasil e Argentina a análise de discriminante demonstrou diferenças estatísticas significativas entre todos os grupos ($p < 0,05$) (tab. 11). Porém, a análise de discriminantes canônicos gerou 6 variáveis (Roots) e não foi possível construir o gráfico de discriminantes canônicos no programa Statistica possivelmente devido ao N amostral baixo.

Por isso, um gráfico de discriminante foi construído no programa Bioestat 5.0. A partir das funções discriminantes de Fisher $Y1: 0.3729 X1 + 0.4877 X2 - 0.0954 X3 + 0.4390 X4 + 0.2970 X5 - 0.1675 X6 + 0.2921 X7 + 0.1300 X8 - 0.4480 X9 - 0.0450 X10$ e $Y2: 0.3381 X1 - 0.2325 X2 + 0.0336 X3 + 0.7726 X4 - 0.4339 X5 + 0.0078 X6 - 0.1672 X7 - 0.0863 X8 + 0.0020 X9 - 0.0993 X10$. Observou-se uma tendência de separação entre machos e fêmeas das diferentes localidades e entre espécimes do Brasil e das demais localidades. Além de uma tendência de separação dos espécimes dos Estados Unidos e México dos demais (fig. 9), no entanto, sem evidências de separação correlatas a distribuição geográfica dos espécimes.

Tabela 7. Poder de discriminação de cada variável morfométrica e seu respectivo valor de significância entre indivíduos de Brasil e Argentina. CC: Comprimento da Carapaça, CTQ: Comprimento Total da Quela, CIM: Comprimento Ísquio-mero, CCa: Comprimento Carpo, CP: Comprimento do Própodo, CD: Comprimento do Dáctilo, LP: Largura do Própodo, CA: Comprimento do Abdômen, LA: Largura do Abdômen (N: 76).

	Wilks' Lambda	Valor F	Valor p
LC	0.000196	7.18452	0.000324*
CC	0.000235	12.69982	0.000001*
CTQ	0.000166	2.93009	0.040465*
CIM	0.000514	52.36953	0.000000*
Cca	0.000226	11.50471	0.000004*
CP	0.000164	2.59609	0.060325
CD	0.000179	4.81555	0.004449*
LP	0.000167	3.04189	0.035415*
CA	0.000208	8.86787	0.000056*
LA	0.000163	2.46612	0.070488

*diferenças estatísticas significativas

Tabela 8. Valores de significância da análise discriminante dos espécimes de Brasil e Argentina analisados.

	Brasil machos	Brasil fêmeas	Argentina machos	Argentina fêmeas
Brasil machos		0.00	0.000000	0.000000
Brasil fêmeas	0.00		0.000000	0.000000
Argentina machos	0.00	0.00		0.000000
Argentina fêmeas	0.00	0.00	0.000000	

Tabela 9. Análise de significância das variáveis canônicas (Roots) pelo teste do χ^2 . Espécimes Brasil e Argentina.

	Roots removidos	Autovalores	R canônico	Wilks' Lambda	X ²	P
0	78.04717	0.993655	0.000145	592.0229	30	0.00
1	19.25633	0.975004	0.011492	299.2299	18	0.00*
2	3.29585	0.875909	0.232783	97.6626	8	0.00*

*diferenças estatísticas significativas

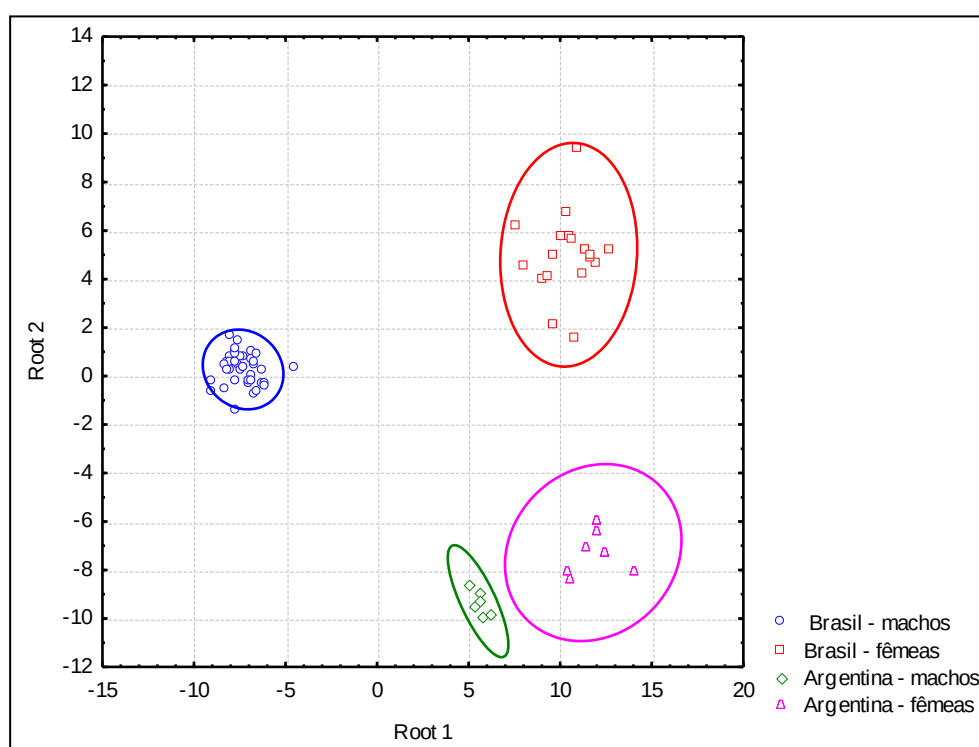


Figura 8. *Pyromaia tuberculata*. Visualização gráfica gerada a partir da relação entre duas variáveis (discriminantes canônicos) para as espécies de Brasil e Argentina estudadas.

Tabela 10. Poder de discriminação de cada variável morfométrica e seu respectivo valor de significância entre todos os indivíduos mensurados. CC: Comprimento da Carapaça, CTQ: Comprimento Total da Quela, CIM: Comprimento Ísquio-mero, CCa: Comprimento Carpo, CP: Comprimento do Própodo, CD: Comprimento do Dáctilo, LP: Largura do Própodo, CA: Comprimento do Abdômen, LA: Largura do Abdômen.

	Wilks' Lambda	Valor F	Valor p
LC	0.000010	9.05624	0.000000*
CC	0.000013	15.11946	0.000000*
CTQ	0.000009	8.08434	0.000000*
CIM	0.000034	55.35381	0.000000*
Cca	0.000016	21.79746	0.000000*
CP	0.000006	2.94037	0.009642*
CD	0.000007	3.59436	0.002449*
LP	0.000007	3.96655	0.001131*
CA	0.000008	5.42052	0.000061*
LA	0.000023	34.69114	0.000000*

*diferenças estatísticas significativas

Tabela 11. Valores de significância da análise discriminante dos espécimes de diferentes localidades analisados.

	Brasil machos	Brasil fêmeas	Argentina machos	Argentina fêmeas	México machos	EUA machos	Japão machos	Austrália fêmeas
Brasil machos		0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Brasil fêmeas	0.000000		0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Argentina machos	0.000000	0.000000		0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Argentina fêmeas	0.000000	0.000000	0.000000		0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
México machos	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000		0.000000	0.000000	0.000000
EUA machos	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000		0.000000	0.000000
Japão machos	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000		0.000000
Austrália fêmeas	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	

Tabela 12. Análise de significância das variáveis canônicas (Roots) pelo teste do χ^2 . Para todos os indivíduos analisados de diferentes localidades.

	Roots removidos	Autovalores	R canônico	Wilks' Lambda	X²	P
0	73.14585	0.993234	0.000005	891.8763	70	0.000000
1	25.28853	0.980796	0.000367	577.5358	54	0.000000
2	5.78028	0.923317	0.009635	338.8891	40	0.000000
3	5.45478	0.919280	0.065330	199.1657	28	0.000000
4	1.19060	0.737228	0.421694	63.0338	18	0.000001
5	0.07567	0.265226	0.923763	5.7888	10	0.832680
6	0.00638	0.079610	0.993662	0.4641	4	0.976897

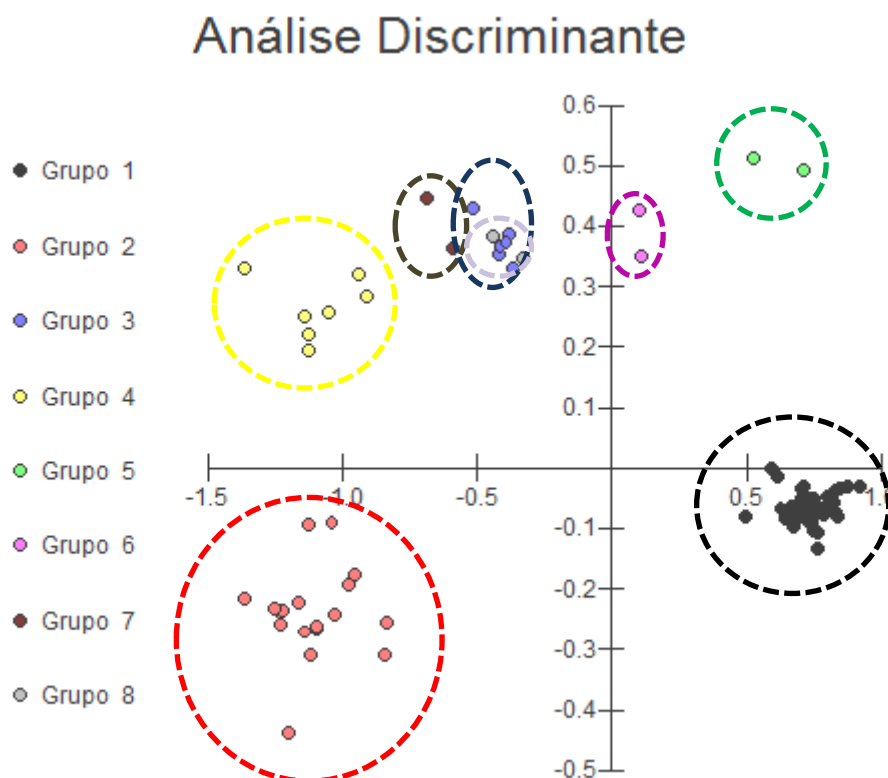


Figura 9. Análise discriminante gerada para espécimes de diferentes localidades. Grupo 1. Brasil – machos; Grupo 2. Brasil- fêmeas; Grupo 3. Argentina - machos; Grupo 4. Argentina - fêmeas; Grupo 5. México - machos; Grupo 6. Estados Unidos - machos; Grupo 7. Japão - machos; Grupo 8. Austrália - fêmeas.

Sistemática

Superfamília Majoidea (Samouelle, 1819)

Família Inachoididae (Dana, 1851)

Gênero *Pyromaia* (Stimpson, 1871)

***Pyromaia tuberculata* (Lockington, 1877)**

Inachus tuberculatus. —Lockington, 1877a: 30.

Inachus tuberculatus.—Lockington, 1877b: 64.

Microrhynchus (Inachus) tuberculatus.—Lockington, 1877c: 64.

Inachoides brevirostrum.—Lockington, 1877c: 75.

Inachoides magdalenensis.—Rathbun, 1893: 228.

Neorhynchus mexicanus.—Rathbun, 1893: 233.

Dasygyius tuberculatus.—Rathbun, 1898a: 570.—Holmes, 1900: 27.—Weymouth, 1910: 27, pl. 3, fig. 8; Hilton, 1916: 71, fig. 13.

Inachoides magdalenensis.—Rathbun, 1898a: 571.—Nininger, 1918: 39, figs. 11-12.

Inachoides tuberculatus.—Schmitt, 1921: 199.

Pyromaia tuberculata.—Rathbun, 1925: 133, pl. 40, fig. 3, pl. 218, figs. 1-4.—Crane, 1937: 56.—Garth, 1948: 23; 1958: 85; 1960: 111.—Sakai, 1976: 169.—Webber & Wear, 1981: 332.—Morgan, 1990: 316-317.—Hendrickx, 1993: 9.—Moran & Dittel, 1993: 613.—Hendrickx, 1994: 74.—Jensen, 1995: 25.—Furota, 1996a: 71-76; 1996b: 77-91.—Tavares & Mendonça Jr., 1996: 153.—Fransozo & Negreiros-Fransozo, 1997: 304.—Hendrickx *et al.*, 1997: 80; 1999: 75, fig. 42.—Boschi, 2000: 123.—Lemaitre *et al.*, 2001: 770-771.—Marcano & Bolaños, 2001: 75.—Davie, 2002: 300.—Schejter *et al.*, 2002: 605-610.—Luppi & Spivak, 2003: 201-214.—Poore, 2004: 366.—Tavares & Mendonça Jr., 2004: 66.—Braga *et al.*, 2005: 28.—McLaughlin *et al.*, 2005: 251, 311.—Ng *et al.*, 2008: 115.—Santana, 2008: 202.—Sliwa *et al.*, 2009: 427.—Bertini *et al.*, 2010: 280.—Wells *et al.*, 2010: 12.—Ahyong & Wilkens *et al.*, 2011: 423.—Doi *et al.*, 2011.—Tavares, 2011: 257.—Tavares & Mendonça Jr., 2011: 50.—Sant'Anna *et al.*, 2012: 11.—Komai & Furoda, 2013: 245.—Faria *et al.*, 2014: 5.—Leignel *et al.*, 2014: 9130.—Tudge *et al.*, 2014: 14;

Pyromaia tuberculata tuberculata. —Garth, 1960: 115.—Garth & Abbott, 1980: 596.

Pyromaia tuberculata mexicana. — Garth, 1958: 85, pl. E, fig. 7, pl. 6, fig. 1-2; 1960: 112.—Sandoval, 1995: 195.

Localidade-tipo: Estados Unidos, Califórnia, San Diego Bay.

Material examinado: Japão: Tóquio CCDB 5900 (2 ♂). Austrália: Newcastle AM. 67179 (2 ♀). Estados Unidos: Califórnia MNHN 2014-10180 (2 ♂, 1 ♀). México: 2♂. Brasil: Ubatuba CCDB 4148 (7 ♂, 5 ♀); CCDB 4147 (30 ♂, 8 ♀); CCDB 5550 (1 ♂, 2 ♀); CCDB 3956 (1 ♂,

1 ♀); MZUSP 12147 (1 ♀); MZUSP 12148 (1 ♀); MZUSP 32352 (1 ♂). Cananéia CCDB 5266 (1 ♂, 1 ♀). Paraná MZUSP 9521 (1 ♀); MZUSP 11051 (1 ♂). Argentina: Mar del Plata CCDB 0872 (1 ♂, 3 ♀). Buenos Aires CCDB 5457 (7 ♂, 4 ♀).

Diagnose da espécie: carapaça piriforme, flancos granulados e tuberculados. Um grande tubérculo, às vezes espiniforme, nas regiões mesogástrica, cardíaca e intestinal. Primeiro somito abdominal com tubérculo curto e espiniforme. Rostro simples. Um tubérculo sobre a face supra-orbital da carapaça. Esterno torácico granulado. Quelípodos fortes com a palma inflada, esparsamente granulada. Fêmea menor do que o macho, mais granulada, tubérculos medianos menores, rostro mais curto, abdome irregularmente granulado, quelípodos mais delgados, palma do quelípodo apenas ligeiramente inflada, com dedos sem hiato (Melo, 1996).

Distribuição: Pacífico - Leste da Califórnia, Golfo da Califórnia até a Colômbia; Introduzido em: Indo Pacífico: Japão, Austrália, Nova Zelândia; Atlântico Sul: Argentina e Brasil (Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul).

7. Discussão

7.1 Dados moleculares

Com base nos exemplares do Brasil, Argentina e Japão amplificados, tanto os valores de divergência genética como os dendrogramas obtidos apontam para a monofilia da espécie *Pyromaia tuberculata*. Resultados que corroboram os dados morfológicos. Ao fazer as comparações, observa-se que não houve nenhum rearranjo nas sequências (inversões, transposições, supressões, adições) sendo estas iguais para todas as localidades, tanto para o fragmento para o gene Citocromo Oxidase I, mesmo este sendo mais variável, quanto para o fragmento de 16S, o que poderia ter se esperado por este ser mais conservado (Schubart *et al.*, 2000a; Vergamini *et al.*, 2011). Este perfil pode estar relacionado ao tempo de divergência da espécie e sua recente introdução nessas localidades (Sakai, 1976; Webber & Wear, 1981; Melo *et al.*, 1989; Schejter *et al.* 2002). A grande conservação das sequências destes genes pode ser indicativo de fluxo gênico entre as populações, ou de um acúmulo baixo de mutações em razão do curto espaço de tempo de separação dos espécimes.

A divergência genética para ambos os genes analisados foi nula (0%) entre todas as localidades indicando uma falta de variabilidade genética entre estas. Em alguns grupos de crustáceos decápodes já foi relatada uma ampla distribuição de espécies sem diferenciação genética considerável (Mantelatto *et al.*, 2011), que pode ocorrer devido escassez de barreiras que impeçam o fluxo gênico, além de aquisição lenta de divergências genéticas (Liu *et al.*, 2009).

O gene COI apresenta uma grande variação entre grupos de crustáceos, de 0 a 2,5% intraespecíficas e 4,9 a 23,6% interespecíficas (Costa *et al.*, 2007). Os valores obtidos pelas análises de divergência genética de 0% para variação intraespecífica e de 15-20% nas relações entre espécies da família Inachoididae estão dentro dos limites propostos. Além disso, o clado formado para os espécimes de *P. tuberculata* reforçam a monofilia da espécie. O grupo irmão formado pela espécie *Inachoides laevis* e este como grupo irmão do clado formado por *Collodes gibbosus* e *Aepinus septemspinus* também apontam o posicionamento da espécie *P. tuberculata* na família Inachoididae Dana 1851.

O gene 16S apresentou resultados semelhantes ao gene COI, com divergência genética nula e variações intraespecífica para a espécie de 0 a 3%. A variação intergenérica variou de 6% a 23% entre as espécies da família Inachoididae. O clado com alto suporte da espécie *P. tuberculata* e com o grupo irmão *Inachoides laevis* e deste com as outras espécies da família

Inachoididae utilizados também reforça a monofilia da espécie e suportam seu posicionamento na família Inachoididae.

Os clados corroboram a classificação de Drach & Guinot (1983) de que a espécie *Pyromaia tuberculata*, e o gênero *Pyromaia* estão inseridos na família Inachoididae e na superfamília Majoidea. Hipótese também sustentada por Santana (2008) com base em dados morfológicos

7.2 Dados morfológicos

Os espécimes de *Pyromaia tuberculata* apresentaram variações (fig. 7) nos caracteres morfológicos já descritos como clássicos e diagnósticos na literatura para tal espécie (Lockington, 1877; Rathbun, 1925; Melo, 1996). Foi observado que o padrão de granulação na face dorsal da carapaça, a presença de um tubérculo proeminente na porção gástrica e o tamanho do espinho ao redor da órbita ocular são variáveis; entretanto não mostraram ser significativos para uma possível separação por localidades entre os espécimes analisados mostrando que a morfologia não se alterou significativamente ao longo de seu processo de introdução em novos locais e seu estabelecimento. Tais características também foram observadas por Schejter *et al.* (2002) em espécimes do Brasil e da Argentina, no qual os autores relatam que os caracteres morfológicos analisados corroboravam com o já descrito pela literatura.

Os espécimes encontrados na costa do México apresentaram características morfológicas visivelmente diferentes (fig. 7 C), como a carapaça mais inflada e arredondada, o padrão de granulação da carapaça e quelípodos diferenciados e o rostro nitidamente mais curto. Este padrão se distinguiu dos demais indivíduos analisados, mesmo quando observada variação do tamanho da carapaça e no tamanho do rostro nos outros espécimes analisados e na literatura correspondente (Rathbun, 1925).

Garth (1958) restabeleceu a espécie *Neorhynchus mexicanus* anteriormente descrita por Rathbun (1893) e que havia permanecido na sinonímia à *P. tuberculata* por décadas, como *P. tuberculata mexicana*, baseando-se nessas diferenças morfológicas e, também pela relação entre o comprimento da carapaça e do rostro (Garth, 1958). Schejter *et al.* (2002) analisou o tamanho do rostro relacionando-o ao comprimento da carapaça, assim como Garth (1958), de espécimes do Brasil e da Argentina confirmando o tamanho do rostro longo desses exemplares. No entanto, Hendrickx (1990b; 1999) voltou a incluir *P. tuberculata mexicana* na

sinonímia de *P. tuberculata* após uma extensa análise de espécimes coletados no Golfo Califórnia, México e comparados a outros coletados no estado de Sinaloa, México (fig. 10). Durante suas observações Hendrickx não comparou os espécimes encontrados no México com de outras localidades onde *P. tuberculata* é reportada, como Estados Unidos por exemplo.

O Golfo da Califórnia (fig. 10) é uma das regiões marinhas mais estudadas do México onde são relatadas condições ambientais que permitem o processo de isolamento e especiação para sua biota, sendo uma importante área de endemismo para diversas espécies (Espinoza-Avalos, 1993; Enriquez-Andrade *et al.*, 2005). Esse isolamento pode ocorrer devido uma importante área de ressurgência pelo encontro das correntes marinhas do Peru e da Califórnia (Enriquez-Andrade *et al.*, 2005). Assim, com base na dinâmica das correntes e endemismo da região, e a variação morfológica dos exemplares analisados e reportados na literatura, os espécimes de *P. tuberculata* analisados por Hendrickx (1990b; 1999) poderiam não corresponder a *P. tuberculata* corroborando a separação dos espécimes por Garth (1958). Desta maneira, análises moleculares poderiam esclarecer mais precisamente e manter a sinonímia de *P. tuberculata mexicana* ou atestar que se trata de outra espécie.

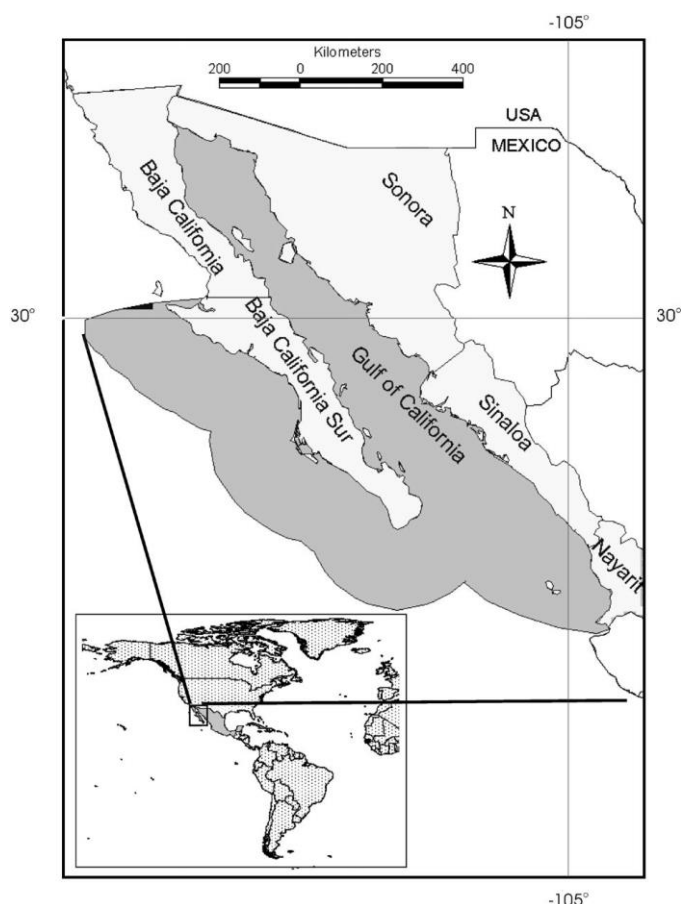


Figura 10. Golfo da Califórnia e Sinaloa. Em cinza escuro, o litoral do Golfo da Califórnia, México. Retirado de Enriquez-Andrade *et al.*, 2005.

Análises morfométricas envolvendo diversas estruturas de *P. tuberculata* ainda não foram feitas, estando disponível na literatura apenas comparações no comprimento e na largura da carapaça e do rostro (Garth, 1958; Schejter *et al.*, 2002). Entretanto o comprimento do rostro não foi uma estrutura mensurada durante o presente estudo, pois este pode estar quebrado (como pode ser observado na figura 4 B) ou desgastado tornando a análise inexata e apresentando resultados que não demonstrem padrões fidedignos.

Como já exposto anteriormente, o enfoque maior ocorreu na comparação entre espécimes do Brasil e da Argentina, pela maior disponibilidade de exemplares. Os dados quando submetidos à análise discriminante mostraram que o comprimento do própodo e a largura do abdômen não são significativos em separar os grupos (tab. 7), e que todos os grupos diferem entre si (tab. 8), o que pode ser melhor visualizado na figura 8, construída a

partir da análise de discriminantes canônicos, e constituindo um indicativo da existência de diferenças no padrão de crescimento dessas duas localidades.

Essa diferença no tamanho e na dimensão corporal pode estar relacionada à variação latitudinal encontrada nas províncias biogeográficas Argentiniana e Brasileira. Estudos a respeito do tamanho de espécies em gradientes ambientais como a variação latitudinal têm sido relatados para diferentes grupos marinhos como moluscos, equinodermos (Roy & Martien, 2001; Verdelhos *et al.*, 2011) e até mesmo crustáceos decápodes, por exemplo, o caranguejo *Armases rubripes* Rathbun, 1897 (Luppi *et al.*, 2003).

Muitas hipóteses buscam fazer relações entre latitude e tamanho corporal sendo que a principal é a “Regra de Bergmann” que afirma que o tamanho corporal aumentaria em locais mais frios, ou seja, em maiores latitudes (Blackburn & Gaston, 1996). Entretanto existem contestações a respeito da generalidade desse padrão (Blackburn & Gaston, 1996; Roy & Martien, 2001; Verdelhos *et al.*, 2011). O tamanho de espécies pode se correlacionar com muitas características fisiológicas e ecológicas de um indivíduo (Roy & Martien, 2001). Os espécimes aqui analisados não seguem o padrão proposto na Regra de Bergmann, pois em geral os espécimes da Argentina apresentaram tamanho corporal menor do que os do Brasil, podendo estar relacionada a mudanças latitudinais ou na disponibilidade de energia (Hipótese de espécies em termos energéticos), que indica menores tamanhos do corpo em altas latitudes devido à disponibilidade de energia reduzida em relação a regiões equatoriais (Roy & Martien, 2001), além de variáveis ambientais, temperatura, sazonalidade, precipitação, etc (Verdelhos *et al.*, 2011).

A análise discriminante com valores das estruturas mensuradas de todos os indivíduos de diferentes localidades mostra não haver aproximação de espécimes do Atlântico, Brasil (grupos 1 e 2) e Argentina (grupos 3 e 4). Mesmo dentro do Brasil os machos e fêmeas se distanciaram e não apresentam correlação. Observou-se uma aproximação dos grupos da Argentina (3 e 4) com os espécimes da Japão e Austrália (grupos 7 e 8). As espécies da América na costa do Pacífico, México e Estados Unidos, também apresentaram uma aproximação (grupos 5 e 6). Ao contrário da comparação entre Brasil e Argentina todas as variáveis mensuradas tiveram diferenças significativas (tab. 10). As diferenças entre os grupos também foram significativas (tab. 11). Entretanto a análise de discriminante canônica apresentou seis “roots” com valores não significativos $p > 0.05$, possivelmente devido o baixo N amostral (tab. 12). Assim com base nos dados morfométricos e um baixo N amostral não

foi possível inferir sobre a separação dos espécimes por diferentes localidades. Sendo necessário um maior aporte de material analisado.

Distribuição

Em sua distribuição natural *Pyromaia tuberculata* pode ter seus limites no Leste da Califórnia e na Colômbia determinados por áreas de ressurgência encontradas, além da influência de correntes marítimas. A Baía de Monterrey está localizada na costa central da Califórnia onde o evento de ressurgência de água fria rica em nutrientes ocorre (Rosenvelt *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1997) e a corrente da Califórnia é associada a baixa temperatura, salinidade e o oxigênio altamente dissolvido nessa região (Rosenvelt *et al.*, 1994). Além disso, a presença da zona de ressurgência no Pacífico Sul localizada na costa do Peru, é determinada pela corrente fria do Peru que se move ao longo da costa do Chile e traz águas geladas da Antártica causando efeito de resfriamento. Os ventos alísios soprando para leste e a mudança no sinal da força de Coriolis no equador produz uma forte divergência no transporte de superfície (Toggweiler & Dixon, 1991). À medida que as correntes de superfície se dividem, tendem a arrastar água para cima, vindas das camadas mais profundas. Enquanto a água de superfície se move para longe dos continentes é substituída por água fria que sobe de áreas mais profundas (Heinze & Wefer, 1992; Nixon & Thomas, 2001). Assim, determinando as duas áreas de ressurgência no Pacífico Oriental que podem atuar como barreiras e limitar a distribuição das espécies marinhas.

Apesar da delimitação que diferentes barreiras exercem sobre as espécies marinhas, o sucesso de uma espécie introduzida é resultado de muitos fatores, desde como sobreviver ao transporte, como se estabelecer, até a reprodução sob novas condições bióticas e abióticas (Carlton 1996; Ruiz *et al.*, 2000). Também dependerá de sua aptidão genética, ao biofísico da área em que se introduziu em comparação com a área de ocorrência natural além do nível de predação e competição que irá encontrar (Hutchings *et al.*, 2002). Os caranguejos braquiúros apresentam características que parecem facilitar introduções marinhas, sendo a maioria dos que conseguem se estabelecer encontrados nas zonas intertidal ou sub-marés rasas, capazes de tolerar uma ampla gama de temperaturas e salinidades, além de serem comuns e abundantes em sua área nativa tendo uma maior chance de serem transportados por navios. (Brockhoff & McLay, 2011).

O caranguejo *Pyromaia tuberculata* pode ser visto como uma espécie bem estabelecida em locais que não de sua distribuição natural, entretanto pouco se sabe a respeito dos prejuízos para a comunidade em que este se inseriu (Brockhoff & McLay, 2011). Possivelmente se estabeleceu no Japão após ser carregado em navios de transporte naval pós-segunda guerra mundial, da Califórnia para Yokohama (Brockhoff & McLay, 2011). Muitos outros relatos apontam o aparecimento de espécies em novos locais na costa do pacífico durante ou após a Segunda Guerra Mundial (Carlton, 1996), corroborando com essa hipótese. E sua dispersão para Austrália e Nova Zelândia possivelmente se deu por meio de navios provindos do Japão ou dos Estados Unidos (Ahyong, 2005; Webber & Wear, 1981). Assim como o Brasil que pode ter tido uma introdução por água de lastro ou entre organismos incrustantes carregados por navios provindos dessas diferentes localidades (Tavares, 2011).

A dispersão de indivíduos para a Argentina pode ter ocorrido em águas de lastro de navios provenientes do Pacífico bem como por dispersão natural de espécimes do Brasil (Schejter *et al.*, 2002). Estes, entretanto teriam que conseguir atravessar a Barreira do Rio de la Plata localizada entre o Uruguai e a Argentina (34°–36° 20'S, 55°–58°30'W) que apresenta um grande fluxo de água do estuário para a costa do mar (Laurenzano *et al.*, 2012) (fig. 11). Como visto anteriormente para diversos grupos, a distribuição de anthozoa, moluscos e mesmo crustáceos decápodes é limitada por esta barreira como para a espécie *Armases rubripes* (Boschi, 2000; Spivak, 1997) que tem como limite de sua distribuição a costa nordeste do Rio de La Plata.

Com base nos resultados obtidos, com ausência de variabilidade genética e morfológica, a espécie *Pyromaia tuberculata* pode ter se dispersado de águas brasileiras para águas argentinas e ter conseguido passar por essa barreira na forma larval, como observado para outras espécies que não apresentam descontinuidade na sua distribuição ao longo da costa Atlântica da América do Sul, como por exemplo os decápodes *Arenaeus clibanarius* (Lamarck, 1818) (Luppi *et al.*, 2003) e *Uca uruguayensis* (Nobili, 1901) (Laurenzano *et al.*, 2012). O que pode sugerir que a barreira do Rio de La Plata poderia ser aberta durante curtos períodos ou ainda uma hipótese de que esta seria uma barreira intermitente determinada pela influência do rio na plataforma continental podendo explicar a distribuição dessas espécies (Luppi *et al.*, 2003). Entretanto, como não houve divergência genética entre os espécimes analisados sua introdução também pode ter ocorrido por meio de navios provenientes de outras localidades, como o Japão.

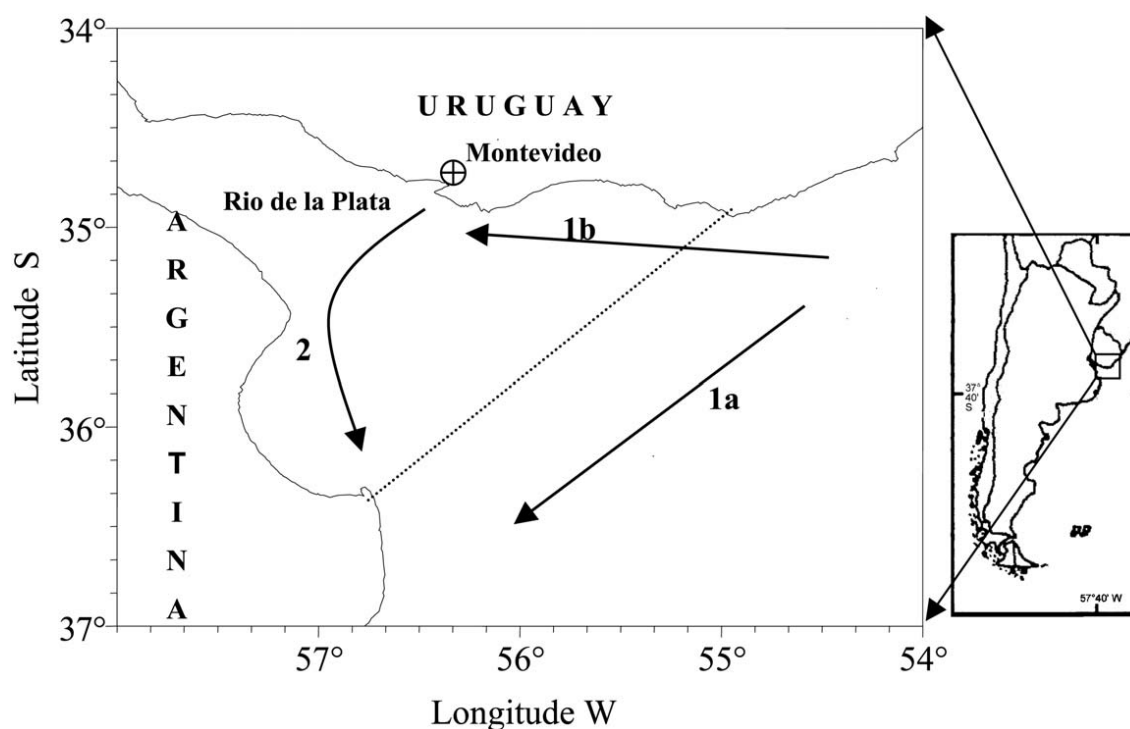


Figura 11. Estuário Rio de La Plata. Setas 1a e 1b demonstram o movimento da água durante diminuição na vazão do Rio. A. Movimento que pode explicar transporte de larvas pelágicas do Brasil para Argentina. B. Penetração da água do mar na costa Uruguia. Seta 2 indica o movimento ao longo da costa. Retirado de Luppi *et al.*, 2003.

O desenvolvimento larval da maioria das espécies de Majoidea geralmente apresenta 3 estágios, duas zoea e uma megalopa (Furota, 1996a) em contraste com a grande maioria dos Brachyura (Hultgren & Stachowicz, 2008). A duração do desenvolvimento larval completo observado para *Pyromaia tuberculata* à temperatura média de 20°C variou de 14-18 dias (Furota, 1996a; Fransozo & Negreiros-Fransozo, 1997; Lupi & Spivak, 2003), considerado um período curto de desenvolvimento para espécies de decápodes (Hultgren & Stachowicz, 2008).

Esse curto período de duração de desenvolvimento larval é um problema para explicar a habilidade de dispersão da espécie principalmente em água de lastro para localidades muito distantes como observado para a atual distribuição de *Pyromaia tuberculata*.

Sendo assim, esta possivelmente foi transportada para longas distâncias como adultos entre organismos incrustantes e entre Brasil e Argentina na forma larval através da movimentação de água costeira tendo sucesso em atravessar a barreira biogeográfica do Rio de La Plata.

8. Conclusões

A igualdade nas sequências parciais dos genes COI e 16S, indicam uma baixa divergência genética entre os espécimes de *Pyromaia tuberculata* e uma possível introdução recente destes.

Os resultados da análise filogenética corrobora a classificação de Drach & Guinot (1983) posicionando *P. tuberculata* dentro da família Inachoididae, que era ainda controversa baseada apenas em análises morfológicas.

Além disso, a espécie está bem suportada na superfamília Majoidea.

Os espécimes originários do México (Golfo da Califórnia) que são classificados como *P. tuberculata* ainda precisam de uma investigação mais profunda, principalmente por análises moleculares, pois as análises morfológicas e a revisão literária demonstram que é provável a separação destes dos demais espécimes analisados (Estados Unidos, Japão, Austrália, Brasil e Argentina).

Foi constatada alta variabilidade morfológica e ausência de variabilidade genética entre os indivíduos das duas províncias biogeográficas (Brasileira e Argentiniana), resultados que indicam que apesar do Rio de La Plata ser uma barreira geográfica para várias espécies, pode estar ocorrendo dispersão e fluxo gênico entre espécimes do Brasil e Argentina.

9. Referências

- Ahyong, S. T. 2005. Range extension of two invasive crab species in eastern Australia: *Carcinus maenas* (Linneaus) and *Pyromaia tuberculata* (Lockington). **Marine Pollution Bulletin**, 50: 460–462.
- Ahyong, S. T. & Wilkens, S. L. 2011. Aliens in the Antipodes: non-indigenous marine crustaceans of New Zealand and Australia. 451–485pp. In: **In the Wrong Place - Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts**. Galil, B.; Clark, P. F. & Carlton, J. T. (eds). German, Frankfurt, Springer Science.
- Awise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 489–522.
- Barrett, S. C. H. 2015. Foundations of invasion genetics: the Baker and Stebbins legacy. **Molecular Ecology**, 24: 1927–1941.
- Bax, N.; Williamson, A.; Agüero, M.; Gonzalez, E.; Geeves, W. 2003. Marine invasive alien species: a threat to global biodiversity. **Marine Policy**, 27: 313–323.
- Bertini, G.; Fransozo, A.; Negreiros-Fransozo, M. L. 2010. Brachyuran soft-bottom assemblage from marine shallow waters in the southeastern Brazilian littoral. **Marine Biodiversity**, 40(4): 277–291.
- Blackburn, T. M. & Gaston, K. J. 1996. Spatial patterns in the body sizes of bird species in the New World. **Oikos**, 77: 436–446.
- Boschi, E. E. 2000. Biodiversity of marine decapod brachyurans of the Americas. **Journal of Crustacean Biology**, 20: 337–342.
- Braga, A. A.; Fransozo, A.; Bertini, G.; Fumis, P. B. 2005. Composition and abundance of the crabs (Decapoda, Brachyura) off Ubatuba and Caraguatatuba, northern coast of São Paulo, Brazil. **Biota Neotropica**, 5(2): 1–34.
- Briski, E.; Allinger, L. E.; Balcer, M.; Cangelosi, A.; Fanberg, L.; Markee, T. P.; Mays, N.; Pollkinghorne, C. N.; Prihoda, K. R.; Reavie, E. D.; Regan, D. H.; Reid, D. M.; Saillard, H. J.; Schwerdt, T.; Schaefer, H.; TenEyck, M.; Wiley, C. J.; Bailey, S. A. 2013. Multidimensional approach to invasive species prevention. **Environmental Science & Technology**, 47: 1216–1221.

- Britto, F. B.; Mendes, D. S. F.; Ogawa, M.; Cintra, I. H. A.; Diniz, F. M. 2011. Single primer-based DNA amplification as a suitable and low-cost tool for assessing genetic diversity in mangrove crabs. **Genetics and Molecular Research**, 10(4): 4084–4092.
- Brockerhoff, A. M. & McLay, C. L. 2011. Human-Mediated Spread of Alien Crabs. 27–106pp. *In: In the Wrong Place* - Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts. Galil, B.; Clark, P. F. & Carlton, J. T. (eds). German, Frankfurt, Springer Science.
- Carlton, J. T. & Geller, J. B. 1993. Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms. **Science**, 261:78–82.
- Carlton, J. T. 1996. Patterns, process, and prediction in marine invasion ecology. **Biological Conservation**, 78: 97–106.
- Cohen, A. N. & Carlton, J. T. 1997. Transoceanic transport mechanisms: introduction of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, to California. **Pacific Science**, 51: 1–11.
- Costa, F. O.; Dewaard, J. R.; Boutillier, J.; Ratnasingham, S.; Dooh, R. T.; Hajibabaei, M. & Hebert, D. N. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 64(2): 272–295.
- Crane, J. 1937. The Templeton Crocker Expedition. III. Brachygnathous crabs from the Gulf of California and the west coast of Lower California. **Zoologica**, 22: 47–78.
- Dana, J. 1851. On the classification of the Maioid Crustacea or Oxyrhyncha. **American Journal of Science and Arts**, 11(2): 425–434.
- Davie, P. J. F. 2002. Crustacea: Malacostraca: Eucaria (part 2). Decapoda – Anomura, Brachyura. 1–641pp. *In: Wells, A. & Houston, W. W. K. (eds). Zoological Catalogue of Australia*. Austrália, Melbourne. CSRI Publishing.
- Davis, M. A. & Thompson, K. 2001. Invasion Terminology: Should ecologists define their terms differently than others? No, not if we want to be of any help! **Bulletin of the Ecological Society of America**, 82: 206.
- Drach, P. & Guinot, D. 1983. Les Inachoididae Dana, famille de Majoidea caractérisée par des connexions morphologiques d'un type nouveau entre carapace, pleurites, sternites et pléon (Crustacea Decapoda). Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences. Série 3. **Sciences de la vie**, 297(1): 37–42.

- Doi, W.; Watanabe, S.; Carlton, J. T. 2011. Alien marine crustaceans of Japan: a preliminary assessment. 419–449pp. *In: In the Wrong Place*-Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts. Netherlands. Springer.
- Enríquez-Andrade, R.; Anaya-Reyna, G.; Barrera-Guevara, J. C.; Carvajal-Moreno, M. A.; Martínez-Delgado, M. E.; Vaca-Rodríguez, J.; Valdés-Casillas, C. 2005. An analysis of critical areas for biodiversity conservation in the Gulf of California region. **Ocean & Coastal Management**, 48(1): 31–50.
- Espinoza-Avalos, J. 1993. Macroalgas marinas del Golfo de California. pp. 328-357. *In: Salazar-Vallejo, S. I. & González, N. E. (eds) Biodiversidad marina y costera de México*. México. CONABIO-CIQRO.
- Farias, N. E.; Obenat, S.; Goya, A. B. 2015. Outbreak of a neurotoxic side-gilled sea slug (Pleurobranchaea sp.) in Argentinian coasts. **New Zealand Journal of Zoology**, 42(1): 51–56.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39: 783–791.
- Fransozo, A. & Negreiros-Fransozo, M. L. 1997. Larval stages of *Pyromaia tuberculata* (Lockington, 1877) (Decapoda, Majidae, Inachinae) reared in the laboratory. **Crustaceana**, 70(3): 304–323.
- Furota, T. 1996a. Life cycle studies on the introduced spider crab *Pyromaia tuberculata* (Lockington) (Brachyura: Majidae). I. Egg and larval stages. **Journal of Crustacean Biology**, 16: 71–76.
- Furota, T. 1996b. Life cycle studies on the introduced spider crab *Pyromaia tuberculata* (Lockington) (Brachyura: Majidae).II. Crab stage and reproduction. **Journal of Crustacean Biology**, 16(1): 77–91.
- Furota, T. & Furuse, K. 1988. Distribution of the introduced spider crab, *Pyromaia tuberculata*, along the coast of Japan. **Benthos Research**, 33: 75–78.
- Garth, J. S. 1948. The Brachyura of the “Askoy” Expedition with remarks on carcinological collecting in the Panama Bight. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 92(1): 1–66.
- Garth, J. S. 1958. Brachyura of the Pacific coast of America. Oxyrhyncha. **Allan Hancock Pacific Expedition**, 21(1-2): 1–854.

- Garth, J. S. 1960. Distribution and affinities of the brachyuran Crustacea. **Systematic Zoology**, 9: 105–123.
- Graham, W. M. & Largier, J. L. 1997. Upwelling shadows as nearshore retention sites: the example of northern Monterey Bay. **Continental Shelf Research**, 17(5): 509–532.
- Grosholz, E. 2002. Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. **Trends in Ecology & Evolution**, 17(1): 22–27.
- Guinot, D. & Richer de Forges, B. 1997. Affinités entre les Hymenosomatidae MacLeay, 1838 et les Inachoididae Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Brachyura). **Zoosystema**, 19(2–3): 453–502.
- Hall, T. 2005. BioEdit v.7.0.5. Biological sequence alignment editor for windows. Ibis Therapeutics a division of Isis pharmaceuticals <http://www.mbio.nesu.edu/bioefit.html>.
- Hall, B. G. 2011. Phylogenetic trees made easy: A how-to manual. 4rd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachussets, USA, 233p.
- Hammer, Ø.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.html.
- Heinze, P. M. & Wefer, G. 1992. The history of coastal upwelling off Peru (11° S, ODP Leg 112, Site 680B) over the past 650 000 years. **Geological Society, London, Special Publications**, 64(1): 451–462.
- Hendrickx, M. E. 1990. The stomatopod and decapod crustaceans collected during the GUAYTEC II Cruise in the Central Gulf of California, Mexico, with the description of a new species of *Plesionika* Bate (Caridea: Pandalidae). **Revista de Biología Tropical**, 38: 35–53.
- Hendrickx, M. E. 1993. Crustáceos decápodos bentónicos del sur de Sinaloa, México. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Série Zoologia*, 64(1): 1–16.
- Hendrickx, M. E.; Pérez, M. C. E.; Barragán, J. S.; Ubach, M. N. M. 1997. Tercer catálogo de la colección de referencia de invertebrados estación Mazatlán. CONABIO, ICML-UNAM. México. 90p.

- Hendrickx, M. E. 1999. Los cangrejos braquiuros (Crustacea: Brachyura: Majoidea y Parthenopoidea) del Pacífico mexicano. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México. 274p.
- Hollebone, A. L. & Hay, M. E. 2008 An invasive crab alters interaction webs in a marine community. **Biological Invasions**, 10: 347–358.
- Holmes, S. J. 1900. Synopsis of the California stalk-eyed Crustacea. **Occasional Papers of the California Academy of Sciences**, 7: 1-262.
- Hultgren, K. M. & Stachowicz, J. J. 2008. Molecular phylogeny of the brachyuran crab superfamily Majoidea indicates close congruence with trees based on larval morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 48: 986–996.
- Hutchings, P. A.; Hilliard, R. W.; Coles, S. L. 2002. Species introductions and potential for marine pest invasions into tropical marine communities, with special references to the Indo-Pacific. **Pacific Science**, 56: 223–233.
- Jensen, G. C. 1995. Pacific Coast crabs and shrimps. Monterey, California. Sea Challengers. 87p.
- Komai, T. & Furota, T. 2013. A new introduced crab in the western North Pacific: *Acantholobulus pacificus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Panopeidae), collected from Tokyo Bay, Japan. **Marine Biodiversity Records**, 6: e96.
- Laurenzano, C.; Farias, N. E.; Schubart, C. D. 2012. Mitochondrial genetic structure of two populations of *Uca uruguayensis* fails to reveal an impact of the Rio de la Plata on gene flow. **Nauplius**, 20: 15–25.
- Leignel, V.; Stillman, J. H.; Baringou, S.; Thabet, R.; Metais, I. 2014. Overview on the European green crab *Carcinus spp.* (Portunidae, Decapoda), one of the most famous marine invaders and ecotoxicological models. **Environmental Science and Pollution Research**, 21(15): 9129–9144.
- Lemaitre, R.; Campos, N. H.; Bermúdez, A. 2001. A new species of *Pyromaia* from the caribbean sea, with a redescription of *P. propinqua* Chace, 1940 (Decapoda: Brachyura: Majoidea: Inachoididae). **Journal of Crustacean Biology**, 21: 760–773.

- Liu, Y.; Liu, R.; Ye, L.; Liang, J.; Xuan, F.; Xu, Q. 2009. Genetic differentiation between populations of swimming crab *Portunus trituberculatus* along the coastal waters of the East China Sea. **Hydrobiologia**, 618(1): 125–137.
- Lockington, W. N. 1877a. Remarks on the Crustacea of the Pacific Coast, with descriptions of some new species. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, 7: 28-36.
- Lockington, W. N. 1877b. Check list of the decapod and tetradeapod Crustacea of the West Coast of North America. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, 7: 63-64.
- Lockington, W. N. 1877c. Remarks on the Crustacea of the Pacific Coast of North America, including a Catalogue of the Species in the Museum of the California Academy of Sciences, San Francisco. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, 7:63-78.
- Loebmann, D.; Mai, A. C. G.; Lee, J. T. 2010. The invasion of five alien species in the Delta do Parnaíba environmental protection area, Northeastern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, 58: 909–923.
- Lowe, S.; Browne, M.; Boudjelas, S.; De Poorter, M. 2000. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN). **Aliens**, 12: 1–12.
- Luppi, T. A. & Spivak, E. D. 2003. Postembryonic development of *Pyromaia tuberculata* (Lockington, 1977): a review of larval and postlarval morphology. **ScientiaMarina**, 67(2): 201–214.
- Luppi, T. A.; Spivak, E. D.; Bas, C. C. 2003. The effects of temperature and salinity on larval development of *Armases rubripes* Rathbun, 1897 (Brachyura, Grapsoidea, Sesarmidae), and the southern limit of its geographical distribution. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 58(3): 575–585.
- Mantelatto, F. L. & Garcia, R. B. 2001. Biological aspects of the nonindigenous portunid crab *Charybdis hellerii* in the Western tropical South Atlantic. **Bulletin of Marine Science**, 68(3): 469–477.

- Mantelatto, F. L.; Robles, R.; Felder, D. L. 2007. Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus *Portunus* (Crustacea, Brachyura, Portunidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 150(1): 211–220.
- Mantelatto, F. L.; Pardo, L. M.; Pileggi, L. G.; Felder, D. L. 2009. Taxonomic reexamination of the hermit crab species *Pagurus forceps* and *Pagurus comptus* (Decapoda: Paguridae) by molecular analysis. **Zootaxa**, 2133: 20–32.
- Mantelatto, F. L.; Pileggi, L. G.; Miranda, I.; Wehrtmann, I. S. 2011. Does *Petrolisthes armatus* (Anomura, Porcellanidae) form a species complex or are we dealing with just one widely distributed species? **Zoological Studies**. 50(3): 372–384.
- Marcano, J. & Bolaños, J. 2001. Cangrejos májidos (Decapoda: Brachyura: Majidae) de las aguas someras marinas venezolanas. **Boletín del Instituto Oceanográfico**, 40(1-2): 71–82.
- McLay, C. L. 2009. New records of crabs (Decapoda: Brachyura) from the New Zealand region, including a new species of *Rochinia* A. Milne-Edwards, 1875 (Majidae), and a revision of the genus *Dromia* Weber, 1795 (Dromiidae). **Zootaxa**, 2111: 1–66, 29 figs.
- McLaughlin, P. A.; Camp, D. K.; Angel, M.; Bousfield, E. L.; Brunel, P.; Brusca, R. C.; Cadien, D.; Cohen, A. C.; Conlan, K.; Eldredge, L. G.; Felder, D. L.; Goy, J.W.; Haney, T. A.; Hann, B.; Heard, R. W.; Hendrycks, E. A.; Hobbs III, H. H.; Holsinger, J.; Kensley, B.; Laubitz, D. R.; Lecroy, S. E.; Lemaitre, R.; Maddocks, R. F.; Martin, J. W.; Mikkelsen, P.; Nelson, E.; Newman, W. A.; Overstreet, R. M.; Poly, W. J.; Price, W. W.; Reid, J. W.; Robertson, A.; Rogers, D. C.; Ross, A.; Schotte, M.; Schram, F. R.; Shih, C.-T.; Watling, L.; Wilson G. D. F.; Turgeon, D. D. 2005. Common and scientific names of aquatic invertebrates from the United States and Canada: Crustaceans. **American Fisheries Society (Special Publication)**, 31: 1–545.
- Melo, G. A. S.; Veloso, V. G.; Oliveira, M. C. 1989. A fauna de Brachyura (Crustacea: Decapoda) do litoral do Estado do Paraná. Lista Preliminar. **Nerítica** 4(1/2): 1–31.
- Melo, G. A. S. 1996. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Plêiade, São Paulo, 604p.
- Meyerson, L. A. & H. A. Mooney. 2007. Invasive alien species in an era of globalization. **Frontiers in Ecology and the Environment**, 4(5): 199–208.

- Mooney, H. A. & Hobbs, R. J. 2000. *Invasive Species in a Changing World*. Island Press, Washington, DC- Covelo California, USA, 457p.
- Moran, D. A. & Dittel, A. I. 1993. Anomuran and brachyuran crabs of Costa Rica: annotated list of species. **Revista de Biologia Tropical**, 41(3): 599–617.
- Morgan, G. J. 1990. An introduced eastern pacific majid crab from Cockburn Sound, southwestern Australia. **Crustaceana**, 58(3): 316–317.
- Moritz, C.; Dowling, T. E.; Brown, W. M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual review of ecology and systematics**, 18: 269–292.
- Ng, P. K. L.; Guinot, D.; Davie, P. J. F. 2008. Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. **The Raffles Bulletin of Zoology, Supplement**, 17: 1–286.
- Nixon, S. & Thomas, A. 2001. On the size of the Peru upwelling ecosystem. **Deep Sea Research** Part I: Oceanographic Research Papers, 48(11): 2521–2528.
- Pileggi, L. G. & Mantelatto, F. L. 2010. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. **Invertebrate Systematics**, 24(2): 194–208.
- Poore, G. C. B. 2004. *Marine decapods Crustacea of southern Australia: a guide to identification*. Australia. **CSRIO Publishing**. 574 p.
- Rambaut, A. 2009. FigTree v1.3.1. (<http://tree.bio.ed.ac.uk>). Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Rathbun, M. J. 1893. Descriptions of new species of American fresh-water crabs. **Proceedings of the United States National Museum**, 16(959): 649–661.
- Rathbun, M. J. 1898a. The Brachyura collected by the U. S. Fish Comission Steamer “Albatross” on the voyage from Norfolk, Virginia, to San Francisco, California, 1887-1888. **Proceedings of United States National Museum**, 21(1162): 567-616, pls 40-45.
- Rathbun, M. J. 1925. The spider crabs of America. **Bulletin of the United States National Museum**, 129: 1–613.

- Robles, R.; Schubart, C. D.; Conde, J. E.; Carmona-Suárez, C.; Alvarez, F.; Villalobos, J. L.; Felder, D. L. 2007. Molecular phylogeny of the American Callinectes Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae), based on two partial mitochondrial genes. **Marine Biology**, 150(6): 1265–1274.
- Rosenfeld, L. K.; Schwing, F. B.; Garfield, N.; Tracy, D. E. 1994. Bifurcated flow from an upwelling center: a cold water source for Monterey Bay. **Continental Shelf Research**, 14(9): 931–964.
- Rossi, N. & Mantelatto, F. L. 2013. Molecular analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) supports the existence of a single species throughout its distribution. **PloS one**, 8(1): e54698.
- Roy, K. & Martien, K. K. 2001. Latitudinal distribution of body size in north-eastern Pacific marine bivalves. **Journal of Biogeography**, 28: 485–493.
- Ruiz, G. M.; Carlton, J. T.; Grosholz, E. D.; Hines, A. H. 1997. Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent, and consequences. **American Zoologist**, 37: 621–32.
- Ruiz, G. M.; Fofonoff, P. W.; Carlton, J. T.; Wonham, M. J.; Hines, A. H. 2000. Invasion of coastal marine communities in North America: apparent patterns, processes, and biases. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 31: 481–531.
- Santana, W. R. A 2008. Revisão taxonômica e relações filogenéticas em Inachoididae Dana, 1851 (Crustacea, Brachyura, Majoidea). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Sant’Anna, B. S.; Watanabe, T. T.; Turra, A.; Zara, F. J. 2012. First record of the non-indigenous portunid crab *Charybdis variegata* from the western Atlantic coast. **BioInvasions Records**, 1(1): 11–16.
- Sakai, T. 1976. Crabs of Japan and Adjacent Seas, Volume 1: Kodansha Ltd.
- Sakai, A. K.; Allendorf, F. W.; Holt, J. S.; Lodge, D. M.; Molofsky, J.; With, K. A., Baughman, S.; Cabin, R. J.; Cohen, J. E.; Ellstrand, N. C.; Mccauley, D. E.; O’neil, P.; Parker, I. M.; Thompson, J. N.; S. G. Weller. 2001. The population biology of invasive species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 32: 305–332.
- Samouelle, G. 1819. The entomologist's useful compendium, or an introduction to the knowledge of British Insects. London. 496 p.

- Schejter, L.; Spivak, E.; Luppi, T. 2002. Presence of *Pyromaia tuberculata* (Lockington, 1877) adults and larvae in the Argentine continental shelf (Crustacea: Decapoda: Majoidea). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, 115(3): 605–610.
- Schubart, C. D. 2009. Mitochondrial DNA and decapod phylogenies: the importance of pseudogenes and primer optimization. **Decapod Crustacean Phylogenetics**, 18: 47–65.
- Schubart, C. D.; Cuesta, J. A.; R. Diesel, and D. L. Felder. 2000a. Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of nonmarine lineages within the American grapsoid crabs (Crustacea: Brachyura).—**Molecular Phylogenetics and Evolution** 15: 179–190.
- Schubart, C. D.; Neigel, J. E.; Felder, D. L. 2000b. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. **Crustacean Issues**, 12(2): 817–830.
- Schubart, C. D.; Cuesta, J. A.; Rodriguez, A. 2001a. Molecular phylogeny of the crab genus *Brachynotus* (Brachyura: Varunidae) based on the 16S rRNA. **Hydrobiologia**, 449: 41–46.
- Schubart, C. D.; Conde, J. E.; Carmona-Suarez, C., Robles, R.; Felder, D. L. 2001b. Lack of divergence between 16S mtDNA sequences of the swimming crabs *Callinectes bocourti* and *C. maracaiboensis* (Brachyura: Portunidae) from Venezuela. **Fishery Bulletin-National Oceanic and Atmospheric Administration**, 99(3): 475–48.
- Schubart, C. D. & Huber M. G. J. (2006). Genetic comparisons of german populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Astacidae). **Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture**, 380/381: 1019–1028.
- Schmitt, W. 1921. The marine decapod Crustacea of California with special reference to the decapod Crustacea collected by the United States Bureau of Fisheries Steamer “Albatross” in connection with the biological survey of San Francisco Bay during the years 1912-1913. **University of California Publications in Zoology**, 23: 1-470. 50 pl.
- Sliwa, C.; Migus, S.; McEnulty, F.; Hayes, K. R. 2009. Marine bioinvasions in Australia. 425–437pp. In: **Biological Invasions in Marine Ecosystems**. German. Berlin. Heidelberg. Springer.
- Spivak, E. 1997. Los crustáceos decápodos del Atlántico sudoccidental (25°-55°S): distribución y ciclos de vida. **Investigaciones Marinas**, 25: 69–91.

- Stachowicz, J. J.; Whitlatch, R. B.; Osman, R. W. 1999. Species diversity and invasion resistance in a marine ecosystem. **Science**, 286(5444): 1577–1579.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, 22: 2688–2690.
- Stimpson, W. 1871. Preliminary report on the Crustacea dredged in the Gulf Stream in the Straits of Florida, by L. F. Pourtales, Assist. U.S. Coast Survey. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoölogy at Harvard College** 2: 109–160.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28: 2731–2739.
- Tavares, M. 2011. Alien Decapod Crustaceans in the Southwestern Atlantic Ocean. 251-267pp. In: **In the Wrong Place** -Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts. Galil, B.; Clark, P. F. & Carlton, J. T. (eds). German, Frankfurt, Springer Science.
- Tavares, M. & Mendonça Jr, J. B. 1996. *Charybdis hellerii* (A. Milne Edwards, 1867) (Brachyura: Portunidae), eighth nonindigenous marine decapod recorded from Brazil. **Crustacean Research**, 25: 151–157.
- Tavares, M. & Mendonça Jr., J. B. 2004. Introdução de crustáceos decápodes exóticos no Brasil: uma roleta ecológica, 59–76pp. In: Silva, J. S. V. & Souza, R. C. C. L. (eds.). **Água de lastro e bioinvasão**. Rio de Janeiro, Editora Interciência.
- Tavares, M., & Mendonca Jr, J. B. 2011. The occurrence of the Indo-Pacific swimming crab *Scylla serrata* (Forskål, 1775) in the Southwestern Atlantic (Crustacea: Brachyura: Portunidae). **Aquatic Invasions**, 6(1): 49–51.
- Terada, M. 1983. Preliminary notes on the zoeae of brachyuran Crustacea from the Sea of Enshunada. **Shizuoka Pref.-Zoological Magazine**, 92(1): 10–13.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. 1994. Clustal W, improving position the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific, gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**, 22(22): 4673–4680.

- Toggweiler, J. R.; Dixon, K.; Broecker, W. S. 1991. The Peru upwelling and the ventilation of the South Pacific thermocline. **Journal of Geophysical Research**, 96 (20): 467–20.
- Tudge, C. C.; Scheltinga, D. M.; Jamieson, B. G.; Guinot, D.; Richer de Forges, B. 2014. Comparative ultrastructure of the spermatozoa of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. **Acta Zoologica**, 95(1): 1–20.
- Tzeng, T. D. 2004. Stock identification of sword prawn *Parapenaeopsis hardwickii* in the East China Sea and Taiwan Strait inferred by morphometric variation. **Fisheries Science**, 70(5): 758–764.
- Verdelhos, T.; Cardoso, P. G.; Dolbeth, M.; Pardal, M. A. 2011. Latitudinal gradients in *Scrobicularia plana* reproduction patterns, population dynamics, growth, and secondary production. **Marine Ecology Progress Series**, 442: 271–283.
- Vergamini, F. G.; Pileggi, L. G.; Mantelatto, F. L. 2011. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, 80(1): 67–83.
- Vitousek, P. M.; D'antonio, C. M.; Loope, L. L. & Westbrooks, R. 1996. Biological invasions as global environmental change. **American Scientist**, 84: 218–28.
- Vitousek, P. M.; D'Antonio, C. M., Loope, L. L.; M. Rejmanek, M.; Westerbrooks, R. 1997. Introduced species: a significant component of human-caused global change. **New Zealand Journal of Ecology**, 21(1):1–16.
- Webber, W. R. & Wear, R. G. 1981. Life history studies on New Zealand Brachyura. 5A. Larvae of the family Majidae. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, 15: 331–383.
- Wells, F. E.; McDonald, J. I.; Travers, M. J. 2010. Absence of the European shore crab, *Carcinus maenas*, from the Fremantle marine area, Western Australia. **Records of the Western Australian Museum**, 25: 378–381.
- Weymouth, F. W. 1910. Synopsis of the true crabs (Brachyura) of Monterey Bay California. California, Stanford University. 64 p.
- Windsor, A. M. & Felder D. L. 2014. Molecular phylogenetics and taxonomic reanalysis of the family Mithracidae MacLeay, 1838 (Decapoda: Brachyura: Majoidea). **Invertebrate Systematics**, 28(2): 124–144.