

MARIA CATARINA DE ALENCAR

***Acidops cessacii* e *Euryozius sanguineus* (Crustacea:
Brachyura: Acidopsidae, Pseudoziidae): duas
espécies anfi-Atlânticas ou dois complexos de
espécies?**

Acidops cessacii and *Euryozius sanguineus* (Crustacea: Brachyura:
Acidopsidae, Pseudoziidae): two amphi-Atlantic species or two
species complexes?

v. único

SÃO PAULO
2021

MARIA CATARINA DE ALENCAR

***Acidops cessacii* e *Euryozius sanguineus* (Crustacea:
Brachyura: Acidopsidae, Pseudoziidae): duas
espécies anfi-Atlânticas ou dois complexos de
espécies?**

***Acidops cessacii* and *Euryozius sanguineus* (Crustacea:
Brachyura: Acidopsidae, Pseudoziidae): two amphi-Atlantic
species or two species complexes?**

v. único

Versão corrigida

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo em cumprimento parcial aos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Sistemática, Taxonomia Animal e Biodiversidade).

Orientador (a): Prof. Dr. Marcos Tavares

SÃO PAULO

2021

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.

Serviço de Biblioteca e Documentação
Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo

Catálogo na Publicação

Alencar, Maria Catarina de

Acidops cessacii e *Euryozius sanguineus* (Crustacea: Brachyura: Acidopsidae, Pseudoziidae): duas espécies anfi-Atlânticas ou dois complexos de espécies? = *Acidops cessacii* and *Euryozius sanguineus* (Crustacea: Brachyura: Acidopsidae, Pseudoziidae): two amphi-Atlantic species or two species complexes? / Maria Catarina de Alencar, orientador Marcos Domingos Siqueira Tavares. São Paulo, 2021. São Paulo, 2021.

77p.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação do Museu de Zoologia Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Sistemática, Taxonomia Animal e Biodiversidade).

Versão corrigida

Volume único

1. Pseudoziidae. 2. Acidopsidae. 3. Brachyura. I. Tavares, Marcos Domingos Siqueira, orient. II. Título.

CDU 595.384.2

CRB-8 3805

[ALENCAR, Maria Catarina]

Acidops cessacii and *Euryozius sanguineus* (Crustacea: Brachyura: Acidopsidae, Pseudoziidae):
two amphi-Atlantic species or two species complexes?

Acidops cessacii e *Euryozius sanguineus* (Crustacea: Brachyura: Acidopsidae, Pseudoziidae):
duas espécies anfi-Atlânticas ou dois complexos de espécies?

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo em cumprimento parcial aos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Sistemática, Taxonomia Animal e Biodiversidade).

Data de aprovação: ____/____/____

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Decisão: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais dedico esta dissertação, meus orientadores da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de maneira especial aos meus pais, Leonice e Luiz, pois tudo que conquistei até hoje não seria possível sem o apoio incondicional deles que nunca mediram esforços em me ajudar a realizar meus sonhos.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Marcos Domingos Siqueira Tavares não apenas pela oportunidade, incentivo, dedicação e paciência, mas principalmente pelo privilégio da sua orientação, onde foi dividida comigo parte de sua experiência e conhecimento, que foram essenciais em todo o meu trajeto científico durante este período.

A Dra. Fabíola Cristina Ribeiro de Faria, a quem devo minha introdução ao mundo da pesquisa e principalmente da carcinologia, que considero como minha “mãe na ciência”, por seus ensinamentos, incentivo e amizade.

Ao museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e programa de Pós Graduação em Sistemática, Taxonomia Animal e Biodiversidade pela infraestrutura que possibilitou que esta pesquisa ocorresse.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da minha bolsa de mestrado (Processo No. 130122/2019-0) assim como o financiamento da pesquisa pelo projeto de apoio a projetos de pesquisas para a capacitação e formação de recursos humanos em taxonomia (PROTAX).

Aos funcionários do MZUSP da biblioteca, da secretaria acadêmica, da portaria, da limpeza, técnicos dos Laboratórios e professores, a todos, pois é pela eficiência e competência de cada um que o Museu de Zoologia se mantém como uma instituição modelo sendo um dos maiores núcleos de zoologia não só do Brasil, como do mundo.

Em especial gostaria de agradecer ao Alberto e a Vanessa do Laboratório de Microtomografia pelo auxílio desde o preparo dos espécimes até as imagens 3D. A Dione Seripierri da biblioteca pelo imprescindível auxílio na bibliografia. A Dra. Jaqueline Battilana do Laboratório de Biologia Molecular por todo o ensinamento tanto na execução de procedimentos técnicos, como nas obtenções e análises dos resultados de molecular, quanto pela amizade e apoio emocional.

A todos os colegas do laboratório de carcinologia, pela colaboração nesse aprendizado constante que foi o mestrado: Luciane, Daniel e Fábio. Em especial, meu agradecimento a Luciana Martins e Jessica Colavite que foram minhas companheiras e conselheiras, parcerias que quero levar para a vida toda.

Agradeço imensamente à equipe técnica do Laboratório de Carcinologia: Joana Darc e Maria José não só pelo auxílio nesse projeto, mas também a parceria e amizade, por terem feito meus dias mais felizes no laboratório. Em especial, à Joana pelos desabafos, conversas e principalmente risadas.

“Ser biólogo não é um trabalho, é um modo de vida” — Ernst Mayr

RESUMO

O estabelecimento de padrões de distribuição geográfica confiáveis depende, necessariamente, de conhecimento taxonômico sólido. Para tal, o presente estudo investigou por meio de dados morfológicos e moleculares (marcadores COI e 16S) o padrão de distribuição anfi-Atlântico (espécies com ocorrência concomitante nas costas do Atlântico ocidental e oriental, incluindo ou não ilhas oceânicas remotas) de duas espécies de crustáceos decápodes Brachyura: *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878) (Acidopsidae) e *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771) (Pseudoziidae). *Acidops cessacii* ocorre na costa atlântica africana, nas ilhas oceânicas do Atlântico Central (Ascensão e Arquipélago São Pedro e São Paulo) e costa nordeste brasileira. O gênero *Acidops* Stimpson, 1871 (Acidopsidae) contém duas espécies, *Acidops cessacii* e *Acidops fimbriatus* Stimpson, 1871 (espécie tipo do gênero) do Pacífico tropical das Américas, morfológicamente muito semelhantes entre si. Os estudos levados a efeito no presente trabalho confirmaram *A. cessacii* e *A. fimbriatus* como espécies distintas e revelaram que as populações de *A. cessacii* das ilhas oceânicas do Atlântico Central e da costa brasileira são indistinguíveis confirmando, portanto, *A. cessacii* como espécie anfi-Atlântica. Atualmente se tem conhecimento da ocorrência de três espécies de *Euryozius* Miers, 1886 no Atlântico (Pseudoziidae): *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771) com ocorrência em ilhas oceânicas remotas do Atlântico Sul (arquipélago São Pedro São Paulo, Santa Helena); *E. bouvieri* (A. Milne-Edwards, 1869) com ocorrência no centro-leste do Atlântico (Açores, Ilha da Madeira e Cabo Verde) e *E. pagalu* Manning & Holthuis, 1981 (São Tomé e Annobon no Golfo da Guiné). Evidências morfológicas e moleculares obtidas pelo presente estudo mostram que o material de São Pedro e São Paulo e do litoral brasileiro são coespecíficos.

Palavras-chave. Anfi-Atlântico; *Acidops*; *Euryozius*; Morfologia; Molecular.

ABSTRACT

The establishment of reliable geographic distribution patterns necessarily depends on solid taxonomic knowledge. Therefore, the present study investigated through morphological and molecular data (COI and 16S markers) the amphi-Atlantic distribution pattern (species with concomitant occurrence on the Western and Eastern Atlantic coasts, including or not remote oceanic islands) of two species of Brachyura decapod crustaceans: *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878) (Acidopsidae) and *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1767) (Pseudoziidae). *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878) occurs on the African Atlantic coast, on the oceanic islands of the Central Atlantic (Ascensão and Archipelago São Pedro and São Paulo) and on the northeastern Brazilian coast. The genus *Acidops* Stimpson, 1871 (Acidopsidae) contains two species, *Acidops cessacii* and *Acidops fimbriatus* Stimpson, 1871 (type species of the genus) from the tropical Pacific of the Americas that are morphologically very similar to each other. The studies carried out in the present work confirmed *A. cessacii* and *A. fimbriatus* as distinct species and revealed that the populations of *A. cessacii* from the oceanic islands of the Central Atlantic and the Brazilian coast are indistinguishable, thus confirming *A. cessacii* as an amphi-Atlantic species. Three species of *Euryozius* Miers, 1886 are currently known to occur in the Atlantic: *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771) (Pseudoziidae) occurring in remote oceanic islands of the South Atlantic (São Pedro São Paulo archipelago, Santa Helena); *Euryozius bouvieri* (A. Milne-Edwards, 1869) occurring in the east-central Atlantic (Azores, Madeira Island and Cape Verde Islands), and *Euryozius pagalu* Manning & Holthuis, 1981 (São Tomé and Annobon in the Gulf of Guinea). Morphological and molecular evidence obtained in the present study shows that material from São Pedro and São Paulo and the Brazilian coast are conspecific.

Key words. Amphi-Atlantic; *Acidops*; *Euryozius*; Morphology; Molecular

LISTA DE FIGURAS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Figura 1. Principais correntes rasas na região tropical do oceano Atlântico central e sul. SEC, Corrente Sul Equatorial. NEC, Corrente Equatorial Norte, ECC, Contracorrente Equatorial. BC, Corrente Brasileira (baseado em Edwards & Lubbock 1983). 16

Figura 2. A, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), Ascensão, fêmea adulta, LC 17mm;CC 14 mm (USNM 252242). B. *Euryozius sanguineus*, Arquipélago São Pedro e São Paulo, macho adulto, LC 39 mm; CC 24 mm (MZUSP 39338). 17

CAPÍTULO 1

Figura 3. A, *Acidops fimbriatus* (Stimpson, 1871), fêmea, cc 14.9 mm, lc 19.7, Ilhas Clipperton. B, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), fêmea ovígera, cc 7.3 mm, lc 9.7, São Tomé. A, B, segundo Ng & Rahayu (2014). 26

Figura 4. Distribuição geográfica de *Acidops fimbriatus* (Stimpson, 1871) e *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878). 27

Figura 5. A–G, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), macho, cc 16 mm, lc 20.1 mm (MZUSP 39255), Arquipélago São Pedro e São Paulo. A–C, Habitus, vistas dorsal, ventral e frontal, respectivamente. D, E, Quelípodos direito e esquerdo, vista lateral, respectivamente. F, G, Pléon, vista dorsal. 29

Figura 6. A–H, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878). A, B, Antênula e antena direita, respectivamente (USNM 252242). C, Terceiro maxilípede (MZUSP 39269). D, Segundo maxilípede (USNM 252242). E, Primeiro maxilípede (MZUSP 39269). F, Mandíbula direita (MZUSP 39255). G, Maxílula direita (MZUSP 39269). H, Maxila esquerda (USNM 252242)... 30

Figura 7. A, B, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), pênis. A, Jovem (USNM 252242). B, Adulto (MZUSP 39272).Escala: 0.5 mm..... 31

Figura 8. A, B, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), macho (MZUSP 39272). A, B, Primeiro e segundo gonópodes, respectivamente, em microscopia eletrônica de varredura. 32

Figura 9. A, B, Filogenia Molecular mostrando as relações entre *Acidops fimbriatus* (Stimpson, 1871) e *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), clado azul. Análise concatenada dos genes mitocondriais COI e 16S usando maximum likelihood com valores de bootstrap maiores que 50% apresentados. 34

Figura 10. Principais correntes rasas na região tropical do oceano Atlântico central e sul. SEC, Corrente Sul Equatorial. NEC, Corrente Equatorial Norte, ECC, Contracorrente Equatorial. BC, Corrente Brasileira (baseado em Edwards & Lubbock 1983). 36

CAPÍTULO 2

Figura 11. A, B, *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). A, Tomografia computadorizada, fêmea (MOUFPE 12762) LC 10 mm ;CC 06mm, Rio Grande do Norte. B, fêmea, LC 27 mm CC 44 mm (MZUSP 39404). Escala: A. 0.8 mm. 49

Figura 12. Distribuição geográfica das espécies Atlânticas do gênero *Euryozius* Miers, 1886: *Euryozius bouvieri* A. Milne-Edwards, 1869, *E. pagalu* Manning & Holthuis, 1981; *E. sanguineus* (Linnaeus, 1771). 51

Figura 13. *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). A. macho (MZUSP 39338), LC 25 mm, CC 40 mm. B, fêmea, LC 27 mm CC 44 mm (MZUSP 39404). 52

Figura 14. A–H, *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). A, B, C, Antênula, antena direita e terceiro maxilípede, respectivamente (MZUSP 39338). D, Segundo maxilípede (MZUSP 16942) E, Primeiro maxilípede (MZUSP 39340). F, Mandíbula direita (MZUSP 16942). G, H, Maxílula e maxila direitas, respectivamente (MZUSP 39340). 53

Figure 15. *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). A, Pléon macho (MZUSP 39338). B, Pléon fêmea (MZUSP 39404) 54

Figura 16. *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). A, Pênis. B, Primeiro gonópodo. C, segundo gonópodo (MZUSP 39338). Escalas: A, 0.5 mm. B, 1 mm. C, 0.25 mm. 55

Figura 17. A. *Ozius edwardsi* Barrois (1888). B, *Euryozius camachoi* Ng & Liao, 2002, Filipinas. C, *Euryozius pagalu* Manning & Holthuis, 1981, São Tomé. B, C, segundo Ng *et al.* (2008)... 57

Figura 18. A, <i>Euryozius sanguineus</i> (Linnaeus, 1771), Pará, fêmea jovem (MOUFPE 29). B, C. <i>Euryozius pagalu</i> Manning & Holthuis, 1981, macho e fêmea, respectivamente, São Tomé (MZUSP 9629). Escalas: 1 mm.....	58
Figura 19. A, B, Quelípodo direito. A, <i>Euryozius sanguineus</i> (Linnaeus, 1771) Arquipélago São Pedro e São Paulo (MZUSP 39404). B, <i>Euryozius pagalu</i> Manning & Holthuis, 1981, São Tomé, fêmea (MZUSP 9629). Escalas: A. 1mm. B 0.8mm	59
Figura 20. A, B, Filogenia Molecular mostrando as relações entre Pseudoziidae, clado azul e Carpiliidae. Análise concatenada dos genes mitocondriais COI e 16S usando maximum likelihood com valores de bootstrap maiores que 50% apresentados.....	61
Figura 21. Principais correntes rasas na região tropical do oceano Atlântico central e sul. SEC, Corrente Sul Equatorial. NEC, Corrente Equatorial Norte, ECC, Contracorrente Equatorial. BC, Corrente Brasileira (baseado em Edwards & Lubbock 1983).	63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Táxons incluídos nas análises de distância genética e filogenética molecular deste estudo. Abreviações de números de tomo: MZUSP, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; USNM, Museu Nacional dos Estados Unidos, Smithsonian Institution; ULLZ, Coleção Zoológica da Universidade de Louisiana em Lafayette. SPSP = Arquipélago de São Pedro e São Paulo; -, sem informação. 25
- Tabela 2.** Matriz de distância genética usando sequências do gene mitocondrial COI (p-distance). 35
- Tabela 3.** Matriz de distância genética de *Acidops* spp. e *Pilumnus* spp. usando sequências do gene mitocondrial 16S (p-distance). 35

CAPÍTULO 2

- Tabela 4.** Táxons incluídos nas análises de distância genética e filogenética molecular deste estudo. Abreviações de números de tomo: MZUSP, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; USNM, Museu Nacional dos Estados Unidos, Smithsonian Institution; ZRC, Coleção Zoológica de Referência de Lee Kong Museu de História Natural de Chian, SPSP = Arquipélago de São Pedro e São Paulo; -, sem informação. 48
- Tabela 5** Matriz de distâncias genética entre espécies de *Euryozius* e gêneros aliados, usando sequências do gene mitocondrial COI (p-distance). 61
- Tabela 6.** Matriz de distâncias genética entre espécies de *Euryozius* e gêneros aliados, usando sequências do gene mitocondrial 16S (p-distance). 62

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
Objetivos gerais e organização do estudo	17
Referências gerais.....	19
CAPÍTULO 1.....	21
<i>Acidops cessacii</i> (A. Milne-Edwards, 1878) (Crustacea: Brachyura: Acidopsidae) espécie anfi-Atlântica: evidências morfológicas e moleculares.....	22
Resumo.....	22
Introdução	23
Material & Métodos	23
Resultados	26
Considerações finais	37
Referências	38
CAPÍTULO 2.....	43
<i>Euryozius sanguineus</i> (Linnaeus, 1771) (Crustacea: Brachyura: Pseudoziidae) no remoto Arquipélago São Pedro e São Paulo e litoral brasileiro: evidências morfológicas e moleculares.....	44
Resumo.....	44
Introdução	45
Material & Métodos	46
Resultados	49
Considerações finais	63
Referências	65
APÊNDICES.....	69
APÊNDICE A.....	69
APÊNDICE B.....	73

Introdução geral

O acúmulo ao longo de décadas de registros de distribuições geográficas da macrofauna marinha bentônica vem revelando padrões de distribuição extremamente amplos, entre os quais o padrão anfi-Atlântico (espécies com ocorrência concomitante nas costas do Atlântico ocidental e oriental, incluindo ou não ilhas oceânicas remotas).

As suspeitas de que tais padrões decorrem de resolução taxonômica insuficiente (ou mesmo má prática taxonômica) tem apoio em diversos trabalhos nos quais se revela a existência de complexos de espécies, em vez de uma única espécie com ampla distribuição (e.g., Manning & Holthuis, 1981; Knowlton, 1993; Carmona *et al.*, 2011; Perez-Viscasillas *et al.*, 2016). Por outro lado, diversas espécies têm sido validadas como anfi-Atlânticas (e.g., Wirtz, P. 2004; Craig *et al.*, 2006; Nunes, 2011; Almeida *et al.*, 2013; Cunha, *et al.*, 2017).

Qualquer que seja o caso, o estabelecimento de padrões de distribuição geográfica confiáveis e o estudo dos seus processos de formação dependem, necessariamente, de conhecimento taxonômico sólido. Para tal, além de uma boa caracterização morfológica há o uso de fragmentos dos genes mitocondriais subunidade I do citocromo c oxidase I (COI) e rRNA ribossômico 16S (rRNA 16S) que vêm demonstrando sucesso no estudo da filogenia e biogeografia de crustáceos, bem como na distinção entre espécies estreitamente relacionadas (Brandão *et al.*, 2012, e referências lá citadas).

O Giro do Atlântico Sul influencia fortemente a fauna das ilhas oceânicas do Atlântico (Arquipélago de São Pedro e São Paulo, Atol das Rocas, Fernando de Noronha, Trindade, Ascensão, Santa Helena, Tristão da Cunha e Gough) (Melo Filho, 1997) (Figura 1).

Nessas ilhas existem muitas espécies anfi-Atlânticas, possivelmente em razão de rotas de dispersão das espécies, principalmente no Arquipélago de São Pedro e São Paulo, o Atol das Rocas, Fernando de Noronha e os bancos ao largo do Rio Grande do Norte, (Melo Filho, 1997).

No caso das ilhas oceânicas remotas do Atlântico Sul (no presente caso, o arquipélago São Pedro e São Paulo e Ascensão), a insuficiência de conhecimentos taxonômicos contrasta com o imenso interesse que despertam os arquipélagos e ilhas oceânicas devido ao seu grande isolamento geográfico e sua posição geográfica entre as plataformas continentais americana e africana.

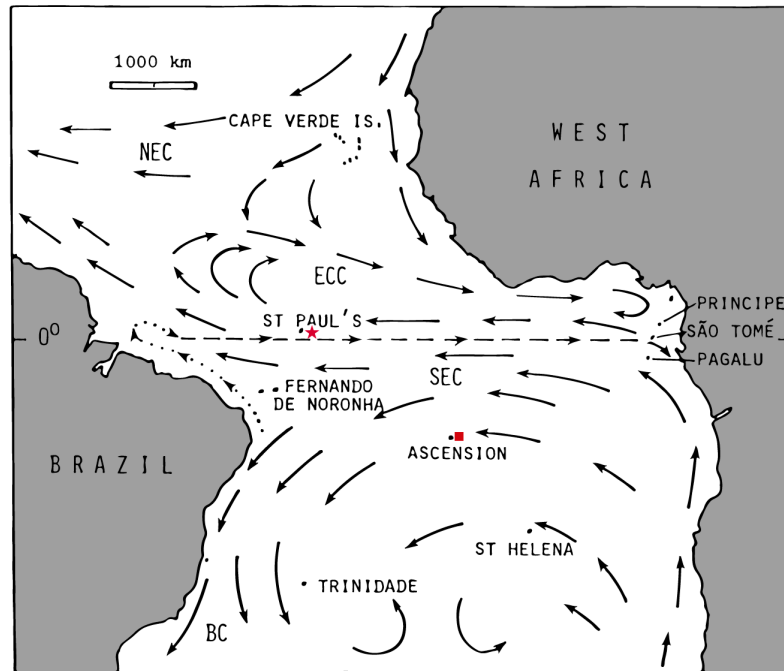


Figura 1. Principais correntes rasas na região tropical do oceano Atlântico central e sul. SEC, Corrente Sul Equatorial. NEC, Corrente Equatorial Norte, ECC, Contracorrente Equatorial. BC, Corrente Brasileira (baseado em Edwards & Lubbock 1983).

Como se forma a fauna marinha costeira em uma ilha oceânica isolada? São Pedro e São Paulo (SPSP), Ascensão (ASC) e Santa Helena (STH) são muito mais jovens (3-7 milhões de anos) do que as plataformas continentais adjacentes (cerca de 130-120 milhões de anos, cf. Termier & Termier, 1979; Windley, 1984), de modo que nas ilhas a fauna litoral atual é composta essencialmente por migrantes (espécies atlânticas americanas, atlânticas africanas, anfi-atlânticas e umas poucas espécies circum-tropicais) e espécies endêmicas (e.g., Anker *et al.*, 2016; Ferreira & Tavares, 2017; Tavares *et al.*, 2017).

Em uma ilha oceânica, a fauna litoral é um mosaico de diferentes padrões de afinidade com outras regiões geográficas (Tavares *et al.*, 2017), mas quanto deste mosaico de relações tem influência do Atlântico ocidental (Américas) e quanto do Atlântico oriental (África)?

Atualmente, o conhecimento inadequado da composição taxonômica em São Pedro e São Paulo (principalmente), Ascensão e Santa Helena é fator impeditivo para o melhor esclarecimento de questões importantes, incluindo:

(i) qual a representatividade das espécies atlânticas americanas, atlânticas africanas e anfi-atlânticas para a composição taxonômica em SPSP, ASC e STH?

(ii) o quanto da composição taxonômica em SPSP, ASC e STH é compartilhada entre o conjunto de ilhas oceânicas do Atlântico Sul (Fernando de Noronha, Atol das Rocas, SPSP, ASC e STH)?

(iii) o quanto de endemismo ocorre em SPSP, ASC e STH e quais os padrões de endemismo quando se considera o conjunto das ilhas oceânicas do Atlântico Sul? (iv) o quanto há de conectividade genética entre as ilhas oceânicas do Atlântico Sul e as margens continentais americana e africana?



Figura 2. A, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), Ascensão, fêmea adulta, LC 17mm; CC 14 mm (USNM 252242). B. *Euryozius sanguineus*, Arquipélago São Pedro e São Paulo, macho adulto, LC 39 mm; CC 24 mm (MZUSP 39338). Escala 5 mm.

Objetivos gerais e organização do estudo

No presente trabalho foram utilizados dados morfológicos e moleculares (marcadores COI e 16S) com o objetivo principal de elaborar a taxonomia e investigar a validade do padrão de distribuição anfi-Atlântico de duas espécies de crustáceos decápodes Brachyura: *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878) (Acidopsidae) (Figura 2A) e *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771) (Pseudoziidae) (Figura 2B).

Por se tratar de casos taxonômicos diferentes, ainda que se assemelhem em termos de padrão geral de distribuição geográfica, o presente estudo foi organizado em dois capítulos no intuito de melhor abordar cada caso.

O primeiro capítulo trata de *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), espécie conhecida da costa atlântica africana, de ilhas oceânicas do Atlântico Central (Ascensão e Arquipélago São Pedro e São Paulo) e de localidades da costa nordeste brasileira e que se inscreve, potencialmente, no padrão anfi-Atlântico de distribuição geográfica.

O segundo capítulo aborda *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771), originalmente descrita da Ilha Ascensão, no Atlântico Central. Posteriormente, duas outras espécies do gênero foram descritas com ocorrência no Atlântico: *Euryozius bouvieri* (A. Milne-Edwards, 1869) (Açores, Madeira e Cabo Verde) e *E. pagalu* Manning & Holthuis, 1981 (Golfo da Guiné). As três espécies foram consideradas sinônimas recíprocas por Coelho Filho e Coelho (1995), com a prioridade para *E. sanguineus*, caso em que *E. sanguineus* se inscreveria no padrão anfi-Atlântico.

Referências gerais

- Almeida, A.O.; Terossi, M.; Araújo-Silva, C.L. & Mantelatto, F.L.M. 2013. Description of *Alpheus buckupi* spec. nov., a new amphi-Atlantic snapping shrimp (Caridea: Alpheidae), based on morphological and molecular data. *Zootaxa*, 3652(4), 437–452.
- A. Milne-Edwards. 1878. Description de quelques espèces nouvelles de Crustacés provenant du voyage aux îles du Cap-Vert de MM. Bouvier et de Cessac. *Bull.Soc.philom.Paris ser 7*(2): 225–232.
- Anker, A.; Tavares, M. & Mendonça, J.B. 2016. Alpheid shrimps (Decapoda: Caridea) of the Trindade & Martin Vaz Archipelago, off Brazil, with new records, description of a new species of *Synalpheus* and remarks on zoogeographical patterns in the oceanic islands of the tropical southern Atlantic. *Zootaxa*, 4138(1): 1–58.
- Brandão, M.; Coelho-Filho, P.A. & Tavares, M. 2012. A review of the genus *Speocarcinus* Stimpson, 1859 (Crustacea: Brachyura: Xanthidae), with a key to its species and the description of one new species. *Zootaxa*, 3327, 1–19.
- Carmona, L.; Malaquias, M.A.E.; Gosliner, T.M.; Pola, M. & Cervera, J.L. 2011. Amphi-Atlantic distributions and cryptic species in Sacoglossan sea slugs. *Journal of Molluscan Studies*, 77 (4), 401–412.
- Coelho-Filho, P.A. & Coelho, P.A. 1995. Estudo do Gênero *Euryozius* Miers, 1886 (Crustacea, Decapoda, Brachyura) no Oceano Atlântico. *Trab. Oceanogr. Univ. Fed. PE, Recife*. 23(1): 143-148. DOI: <https://doi.org/10.5914/tropocean.v23i1.2685>
- Cunha, A.M.; Terossi, M.; Mantelatto, F.L. & Almeida, A. O. 2017. Morphological and molecular analyses support the amphi-Atlantic distribution and taxonomic status of the snapping shrimp *Alpheus intrinsecus* Spence Bate, 1888 (Crustacea: Decapoda: Alpheidae). *Zootaxa*, 4303(4), 573. doi:10.11646/zootaxa.4303.4.8
- Craig, M. T.; Bartsch, P.; Wirtz, P.; Heemstra, F. C. 2006. Redescription and validation of *Alphestes afer* as an amphi-Atlantic grouper species (Perciformes: Serranidae). *Cybium*, 30(4), 327-331.
- Edwards, A., & Lubbock, R. 1983. Marine Zoogeography of St Paul's Rocks. *Journal of Biogeography*, 10(1), 65–72. <https://doi.org/10.2307/2844583>
- Ferreira, L.A.A. & Tavares, M. 2017 A new species of *Pachycheles* (Crustacea: Anomura: Porcellanidae), with taxonomic re- marks on two other porcelain crabs from the remote

- oceanic archipelago of Trindade and Martin Vaz, South Atlantic Ocean. *Zootaxa*, 4299 (4), 546–560.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 189–216.
- Linné, Carl von. 1771. *Systema naturae, per regna tria naturae: secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Syst. Nat. ed. 13.
- Manning, R.B. & Holthuis, L.B. (1981) West African Brachyuran Crabs (Crustacea: Decapoda). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 306, 1–379.
- Melo Filho, G.A.S. de. 1997. O gênero *Munida* Leach (Crustacea: Decapoda: Galatheididae) no Atlântico e Mediterrâneo: composição e biogeografia (Doctoral Thesis, Universidade de São Paulo, Brazil).
- Nunes, F.L., Norris, R.D. & Knowlton, N. 2011. Long distance dispersal and connectivity in amphi-Atlantic corals at regional and basin scales. *PLoS ONE*, 6 (7), e22298, 1–12.
- Perez-Viscasillas, J.; Schizas, N. V.; Jassoud, A. 2016. The Atlantic Ocean: an impassable barrier for the common Octopus, *Octopus vulgaris*. *American Geophysical Union, Ocean Sciences Meeting*.
- Tavares, M.; Carvalho, L. & Mendonça Jr. 2017. Towards a review of the decapod Crustacea from the remote oceanic archipelago of Trindade and Martin Vaz, south Atlantic Ocean: new records and notes on ecology and zoogeography. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 57(1): 157–176.
- Termier, H. & Termier, G. (1979) *Histoire de la Terre*. Paris, Press Universitaire de France.
- Windley, B.F. 1984. *The Evolving Continents*. John Wiley & Sons Ltd. 2: 1–399.
- Wirtz, P. 2004. Four amphi-Atlantic shrimps new for São Tomé and Príncipe (eastern central Atlantic). *Arq. Life Mar. Sci.*, 21:83-85.

CAPÍTULO 1

***Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878) (Crustacea: Brachyura: Acidopsidae) espécie anfi-Atlântica: evidências morfológicas e moleculares**

***Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878) (Crustacea: Brachyura: Acidopsidae) espécie anfi-Atlântica: evidências morfológicas e moleculares**

Resumo

Acidops cessacii (A. Milne-Edwards, 1878) espécie conhecida da costa atlântica africana, de ilhas oceânicas do Atlântico Central (Ascensão e Arquipélago São Pedro e São Paulo) e de localidades da costa nordeste brasileira se inscreve, potencialmente, no padrão anfi-Atlântico de distribuição geográfica. *Acidops cessacii* é morfológicamente muito semelhante à *A. fimbriatus* Stimpson, 1871, do Pacífico Leste. Os estudos morfológicos e moleculares (genes mitocondriais COI e 16S) levados a efeito no presente trabalho confirmaram *A. cessacii* e *A. fimbriatus* como espécies distintas e revelaram que as populações de *A. cessacii* das ilhas oceânicas do Atlântico Central e da costa brasileira são indistinguíveis confirmando, portanto, *A. cessacii* como espécie anfi-Atlântica. O presente estudo será ampliado, oportunamente, para incluir a população de *A. cessacii* do Atlântico africano.

Palavras-chave. Taxonomia, Decapoda, Atlântico oriental e ocidental, ilhas oceânicas

Abstract

Acidops cessacii (A. Milne-Edwards, 1878) a species known from the African Atlantic coast, oceanic islands in the Central Atlantic (Ascensão and Archipelago São Pedro and São Paulo) and localities on the northeastern Brazilian coast, show amphi-Atlantic geographic distribution. *Acidops cessacii* is morphologically very similar to *A. fimbriatus* Stimpson, 1871, from the eastern Pacific. The morphological and molecular studies (mitochondrial genes COI and 16S) carried out in the present work confirmed *A. cessacii* and *A. fimbriatus* as distinct species and revealed that populations of *A. cessacii* from the oceanic islands of the Central Atlantic and the Brazilian coast are indistinguishable thus confirming *A. cessacii* as an amphi-Atlantic species. The present study will be expanded in due course to include the population of *A. cessacii* from the African Atlantic.

Key words. Taxonomy, Decapoda, East and West Atlantic, oceanic islands.

Introdução

Há muito se conhecem espécies de *Brachyura* costeiras anfi-Atlânticas, ou seja, com ocorrência concomitante nas costas do Atlântico ocidental e oriental, incluindo ou não a presença em ilhas oceânicas remotas (A. Milne-Edwards 1880; Rathbun 1918; 1930; 1935; 1937; Ekman 1953; Manning & Holthuis 1981; Edwards & Lubbock 1983; Manning & Chace 1990; Melo 1996; Anker *et al.* 2016; Tavares *et al.* 2017).

Em muitos grupos de espécies marinhas bentônicas tornou-se claro que supostos padrões anfi-atlânticos eram resultado de informações taxonômicas insuficientes e que as espécies em questão correspondiam, na realidade, a um complexo de duas ou mais espécies diferentes (Knowlton 1993; Muss *et al.* 2001). Wirtz (2004) coloca em dúvida se populações orientais e ocidentais de espécies anfi-Atlânticas continuam, de fato, a manter fluxo gênico. Não obstante, diversas espécies têm sido validadas como verdadeiramente anfi-Atlânticas (Lessios *et al.* 1999).

O *Brachyura Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), espécie de águas rasas originalmente descrita das ilhas do Cabo Verde (Monod 1956; Manning & Holthuis 1981), posteriormente assinalada de outras localidades da costa africana e da ilha Ascensão (Monod 1956; Manning & Chace 1990), do Arquipélago São Pedro e São Paulo (presente estudo) e de duas localidades na costa nordeste brasileira (Barreto *et al.* 1993; presente estudo) se inscreve no padrão, ainda não testado, de distribuição geográfica anfi-Atlântica. *Acidops cessacii* é morfológicamente muito semelhante a *A. fimbriatus* Stimpson, 1871, do Pacífico Leste.

No presente trabalho, a taxonomia de *A. cessacii* foi investigada a partir de estudos morfológicos e moleculares com vistas a esclarecer o seu status de espécie anfi-Atlântica e acessar o status de *A. cessacii* e *A. fimbriatus* como espécies distintas.

Material & Métodos

Procedimentos: microscopia eletrônica e tomografia computadorizada.

Para a microscopia eletrônica os apêndices dissecados foram desidratados e limpos mecanicamente, posteriormente hidratados em água destilada para remover os traços de impurezas e, em seguida, desidratados em uma série alcoólica (25%, 50%, 75% e 100%). Subsequentemente foram desidratados em ponto crítico e montados em *stubs* metálicos com

fitas dupla-face e banhados a ouro para observação com auxílio de microscópio eletrônico marca LEO 440 do Museu de Zoologia da USP.

As imagens de tomografia foram obtidas com auxílio de um “microfocus X-ray μ CT system (GE phoenix v|tome|x)” a partir dos seguintes parâmetros: detetor 2014×2024 pixels, voltagem 50–60 kV, corrente 85–300 μ A, voxel 2.6–21.1 μ m, e 1000–1500 imagens; imagens X-ray registradas em 1000 ms de exposição por imagem.

Repositórios. Os espécimes estudados provém das coleções do Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo (MZUSP) e do National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington D.C. (USNM).

Formato. Diante da constatação de que *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878) é uma espécie mal conhecida sobre todos os aspectos, buscamos apresentar a sinonímia mais completa possível. A classificação segue, essencialmente Ng *et al.* (2008) e a terminologia Guinot *et al.* (2013) e Davie *et al.* (2015).

Análise molecular. Foram escolhidas para a amplificação as regiões COI (Folmer *et al.*, 1994) e 16S (Palumbi *et al.* 2002). O DNA foi extraído utilizando-se o kit comercial INVITROGEN PureLink Genomic DNA Kit seguindo o protocolo do fabricante adaptado, a partir de tecido muscular dos pereópodos. As amostras selecionadas foram purificadas com EXO-SAP. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências de Brachyura do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), por meio do algoritmo BLAST (Zheng Zhang *et al.*, 2000). As sequências foram editadas e alinhadas com auxílio do programa computacional Geneious 7.1.9 (Kearse *et al.* 2012) (vide ANEXO I para detalhes).

Os cálculos de distância genética foram realizados usando o software MEGA X (Kumar *et al.* 2018). As matrizes de distâncias foram calculadas usando distâncias não corrigidas (p-distance) com base em fragmentos do gene COI e 16S. As matrizes de distâncias foram construídas sem usar um modelo de evolução, uma vez que foi demonstrado que o uso de p-distance evita a sobre-parametrização e não há necessidade de usar medidas de distâncias complexas ao estudar sequências intimamente relacionadas (Nei & Kumar, 2000; Collins *et al.*, 2012). Para ajudar a avaliar as distâncias genéticas interespecíficas, dois histogramas de frequência foram construídos com sequências do gene COI e 16S.

As sequências geradas para este estudo foram combinadas com sequências do GenBank, totalizando 15 sequências dos marcadores genéticos COI e 16S (Tabela 1). O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado separadamente para cada marcador no Geneious 8.0.5 usando o algoritmo de alinhamento MAFFT v7.017 (Kato and Miyata, 2002), os alinhamentos foram inspecionados visualmente quanto a quaisquer desalinhamentos óbvios. Posteriormente as sequências foram concatenadas e o alinhamento exportado para o MEGA X. Foi utilizado Máxima Verossimilhança para inferência filogenética usando RAxML versão 7.2.8 (Stamatakis, 2014). Foram usadas 1000 réplicas de bootstrap. Parâmetros de probabilidade seguiram o modelo Tamura Nei (TN94+G) para *Acidops*, estimados individualmente para os marcadores moleculares no MEGA X.

Tabela 1. Táxons incluídos nas análises de distância genética e filogenética molecular deste estudo. Abreviações de números de tombo: MZUSP, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; USNM, Museu Nacional dos Estados Unidos, Smithsonian Institution; ULLZ, Coleção Zoológica da Universidade de Louisiana em Lafayette. SPSP = Arquipélago de São Pedro e São Paulo; -, sem informação.

Espécies	Localidade	N. De tombo	N. de id. GenBank	
			16S	COI
<i>Acidops</i>				
<i>Acidops cessacii</i>	SPSP	MZUSP 39256	x	x
<i>Acidops cessacii</i>	SPSP	MZUSP 39262	x	x
<i>Acidops cessacii</i>	SPSP	MZUSP 39263	x	x
<i>Acidops cessacii</i>	SPSP	MZUSP 39265	x	x
<i>Acidops cessacii</i>	SPSP	MZUSP 39273	x	x
<i>Acidops cessacii</i>	Ilha de Ascensão	USNM 252242	x	x
Grupo externo				
<i>Acidops fimbriatus</i>	Panama, Pearl Islands	ULLZ 9047	KF683005	KF682730
<i>Pilumnus orbitospinis</i>	Japão	USNM 120711	–	MF504122
<i>Pilumnus floridanus</i>	México	ULLZ 7317	HM637980	MF504122
<i>Pilumnus</i> sp.	–	–	–	HG328361

Resultados

Família **Acidopsidae Števcíć, 2005**

Gênero ***Acidops* Stimpson, 1871**

Epimelus A. Milne-Edwards, 1878: 227 [Espécie tipo: *Epimelus cessacii* A. Milne-Edwards, 1878, por monotipia]

Espécie tipo. *Acidops fimbriatus* Stimpson, 1871 [Localidade tipo: Cabo São Lucas, Baixa Califórnia. Material tipo inexistente]

Espécies inclusas. *Acidops fimbriatus* Stimpson, 1871; *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878) [*Epimelus*]

Observações. O gênero *Acidops* atualmente engloba apenas duas espécies, *A. fimbriatus* (do Pacífico Leste entre Califórnia e México, incluindo as ilhas Clipperton e Galápagos) e *A. cessacii* (cf. infra) (Figura 3 e Figura 4).

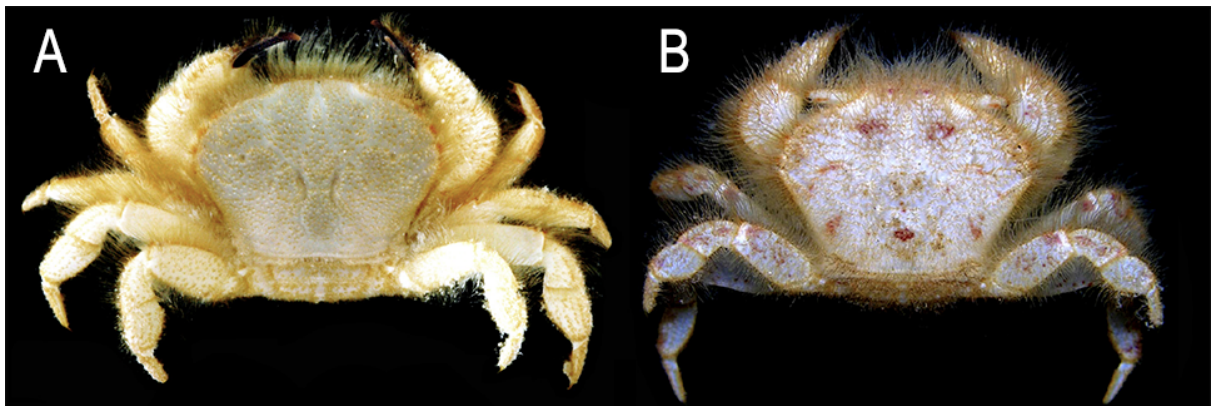


Figura 3. A, *Acidops fimbriatus* (Stimpson, 1871), fêmea, cc 14.9 mm, 19.7, Ilhas Clipperton. B, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), fêmea ovígera, cc 7.3 mm, lc 9.7, São Tomé. A, B, segundo Ng & Rahayu (2014).

Acidops já foi incluso entre os Goneplacidae, Atelecyclidae, Xanthidae e Pilumnidae, antes de ser transferido para uma família própria, Acidopsidae (Tesch 1918; Balss 1921; Garth 1946; 1968; Monod 1956; Manning & Holthuis 1981; Števcíć, 2005).

A. Milne-Edwards (1880), sem conhecer o gênero *Acidops*, considerou *Epimelus* semelhante à *Pilumnus*. Coube a Sourie (1954) a primazia transferir *E. cessacii* para o gênero *Acidops*.

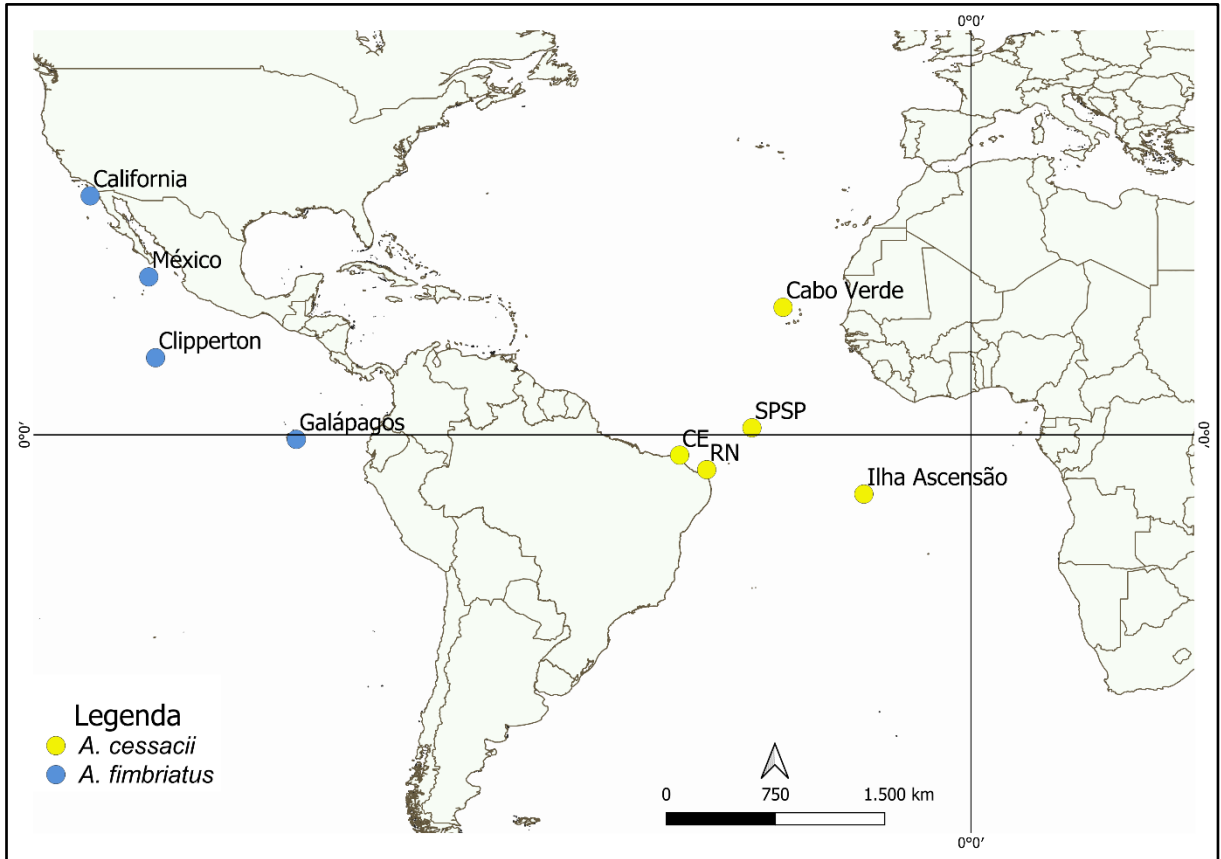


Figura 4. Distribuição geográfica de *Acidops fimbriatus* (Stimpson, 1871) e *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878).

***Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878)**

(Figuras 1B, 3–6)

Epimelus Cessacii A. Milne-Edwards, 1878: 227 [Localidade tipo: Ilha de São Vicente, Cabo Verde. Síntipos no Muséum national d’Histoire naturelle, Paris]

Epimelus Cessaci– A. Milne-Edwards & Bouvier 1900: 76.

Epimelus cessaci– Garth 1968: 314.

Acidops cessaci– Sourie 1954: 112; Monod 1956: 359; Forest & Guinot 1966: 88; Barreto *et al.* 1993: 273.

Acidops cessacii– Guinot & Ribeiro 1962: 64; Ribeiro 1964: 13; Manning & Holthuis, 1981: 165; Türkay 1982: 121; Manning & Chace, 1990: 52; Melo 1996: 418; Guinot *et al.* 2013: 39; Ng & Rahayu, 2014: 4.

Material examinado. Atlântico ocidental: Rio Grande do Norte: 1 fêmea juvenil (MZUSP 24762), RV “Almirante Saldanha, estação 1682, 4°41'00.0"S, 35°24'05.0"W, 17.x.1967. Atlântico Central: Arquipélago São Pedro e São Paulo: 1 macho (MZUSP 39255), 1 fêmea (MZUSP 39257), 1 fêmea (MZUSP 39259), 1 fêmea (MZUSP 39261), 1 fêmea (MZUSP 39260), 1 fêmea (MZUSP 39262), 1 fêmea (MZUSP 39263), 1 macho (MZUSP 39265), 1 fêmea (MZUSP 39266), 1 macho (MZUSP 39267), 1 macho juvenil (MZUSP 39258), 1 macho (MZUSP 39256), Enseada, W. Santana *et al.* coll., 29.x.2007 a 10.xi.2007, 3–18 m. 1 macho (MZUSP 39264), 1 macho (MZUSP 39268), 1 macho (MZUSP 39271), 1 fêmea (MZUSP 39275), 1 fêmea (MZUSP 39296), 1 fêmea (MZUSP 39273), 1 fêmea (MZUSP 39269), 1 fêmea (MZUSP 39270), 1 fêmea (MZUSP 39272), 1 fêmea (MZUSP 39274), *ibidem*, 18.ii.2009 a 5.iii.2009. Ilha Ascensão: 2 machos, 1 fêmea (USNM 252242), North East Bay, cerca de 7°54'41"S 14°20'31"W, R.B. Manning 19.v.1971, praia e poças de maré em ponto rochoso.

Tamanho dos maiores exemplares: macho, cc 16 mm, lc 20.1 mm; fêmea, cc 18 mm, lc 28.5 mm.

Distribuição geográfica. Atlântico Central: Arquipélago São Pedro e São Paulo e Ilha Ascensão (Manning & Chace, 1990, presente estudo). Esse é o primeiro registro de *Acidops cessacii* para o Arquipélago São Pedro e São Paulo. Atlântico oriental: Cabo Verde, Senegal, ilhas do Golfo da Guiné (A. Milne-Edwards, 1878; Monod 1956; Manning & Holthuis 1981). Ocasionalmente na costa do Atlântico ocidental: Ceará e Rio Grande do Norte (Barreto *et al.* 1993; presente trabalho, cf material examinado). Melo (1996) refere-se, possivelmente por engano, à ocorrência desta espécie no Maranhão (Figura 4).

Habitat. Fundos arenosos e de algas calcárias, sob rochas, do entremarés até profundidades de 66 metros. Em São Pedro e São Paulo *A. cessacii* foi encontrada sob rochas em fundos arenosos (Manning & Chace, 1990; Manning & Holthuis 1981).

Descrição. Carapaça acentuadamente mais convexa longitudinalmente do que transversalmente. Superfície dorsal regular e granulada; grânulos grosseiros, providos de cerdas curtas, vários grânulos justapostos transversalmente. Margens fontorbital e anterolateral providas de cerdas longas formando franja espessa. Margem frontal projetada anteriormente, convexa, bilobada, sinus bem marcado extendendo-se posteriormente como sulco raso, lobos finamente crenulados. Margem anterolateral recortada por quatro dentes fortemente granulados, exorbital maior, quarto dente menor que os demais. Regiões dorsais da carapaça delimitadas por sulcos profundos; superfície lateral lisa, inerme. Órbitas profundas, transversalmente alongadas, margens orbitais granuladas, franjadas por cerdas longas. Pedúnculo ocular longo, acentuadamente achatado dorsoventralmente, margem anterior com franja de longas cerdas (Figura 3B, Figura 5A–C).

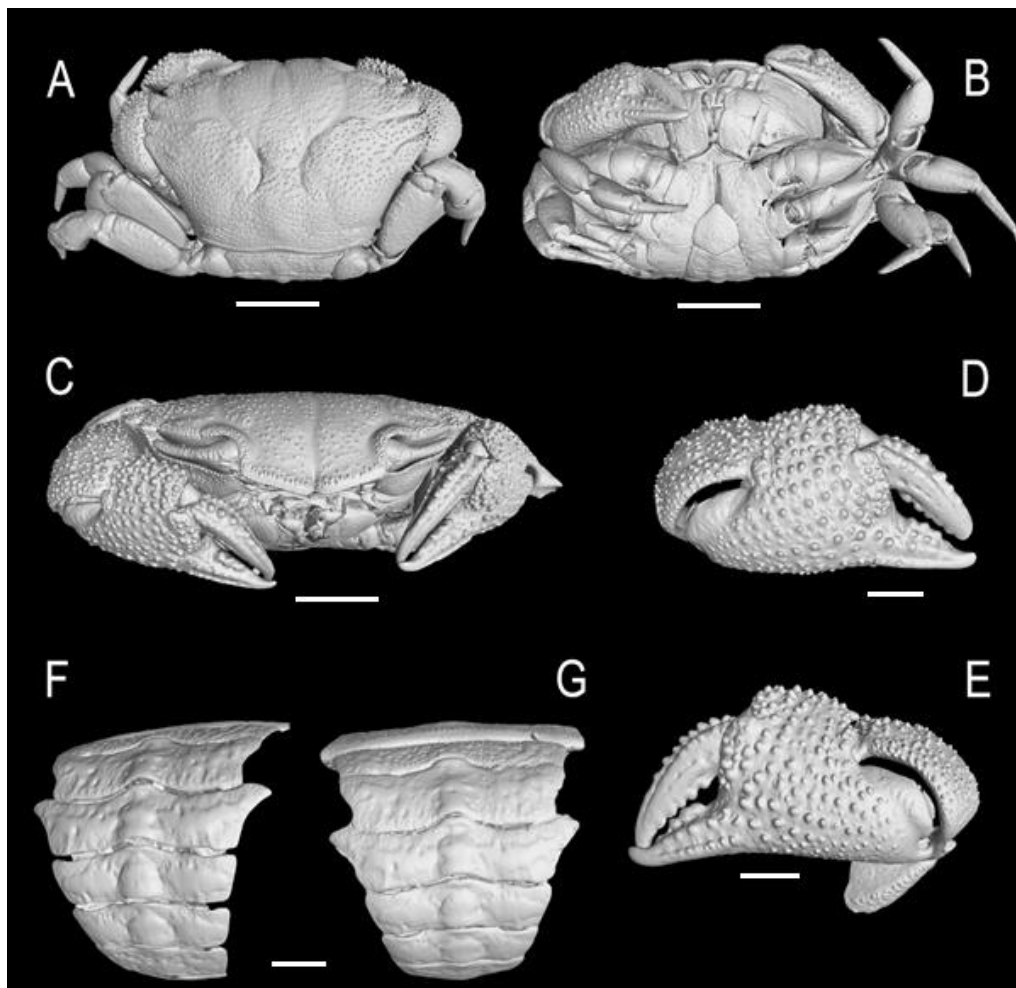


Figura 5. A–G, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), macho, cc 16 mm, lc 20.1 mm (MZUSP 39255), Arquipélago São Pedro e São Paulo. A–C, Habitus, vistas dorsal, ventral e frontal, respectivamente. D, E, Quelípodos direito e esquerdo, vista lateral, respectivamente. F, G, Pléon, vista dorsal. Escalas: A–C 5 mm; D–E 1 mm.

Córnea bastante reduzida. Articulo antenal 2+3 imóvel; artículos 4, 5 móveis; flagelo curto. Primeiro artículo antenular pouco móvel, artículos 2, 3 curtos (Figura 6A).

Terceiro maxilípede com diversos tufos de cerdas longas. Isquiopodito subretangular, sulcado longitudinalmente na face exposta; sulco débil, continuando-se longitudinalmente sobre o meropodito subquadrado até proximo a articulação do palpo. Palpo tri-articulado, afilado-se progressivamente distalmente. Exopodito longo, alcançando próximo à margem distal do meropodito; flagelo longo. Maxilípedes 2, 1, com exopoditos e flagelos bem desenvolvidos. Maxílula, maxila, comofigurado. Mandíbula com palpo bi-articulado (Figura 6).

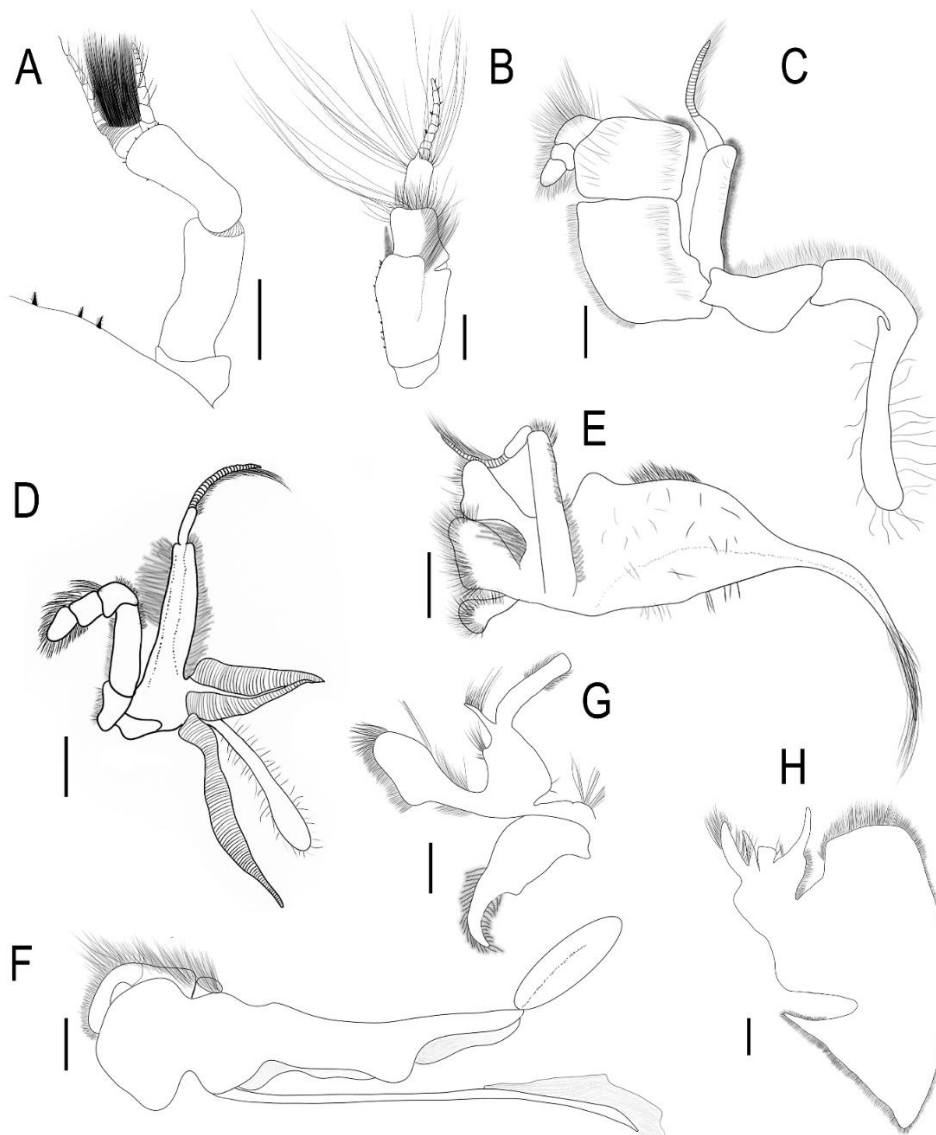


Figura 6. A–H, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878). A, B, Antênula e antena direita, respectivamente (USNM 252242). C, Terceiro maxilípede (MZUSP 39269). D, Segundo maxilípede (USNM 252242). E, Primeiro maxilípede (MZUSP 39269). F, Mandíbula direita (MZUSP 39255). G, Maxílula direita (MZUSP 39269). H, Maxila esquerda (USNM 252242). Escala 1 mm.

Quelípodos homoquelos, homodontes (Figura 5 D, E). Meropodito liso, inerme, provido de cerdas longas. Carpopodito, protopodito densamente providos de cerdas longas e curtas. Carpo acentuadamente inflado; própodo com cerdas curtas, esparsas na face mesial. Superfície dorsal do dedo móvel sulcada longitudinalmente, fortemente tuberculada, uma fileira longitudinal de cerdas longas; faces mesial e ventral lisas, inermes. Dedo fixo sulcado lateralmente, sulco provido de cerdas. Dedos deixando hiato ao longo de quase toda extensão, extremidades cruzadas; faces cortantes com dentes fortes.

Pereópodes 2 a 5 semelhantes entre si, relativamente curtos, achatados lateralmente, densamente cerdosos, cerdas longas, franjadas; dátilo densamente provido de cerdas extremamente curtas (Figura 3B, Figura 5A, B).

Esterno torácico essencialmente liso, inerme, providos de tufo esparsos de cerdas longas (Figura 5B). Pléon de 6 pleonitos e telson, face externa provida de tufo esparsos de cerdas longas; terceiro pleonito fortemente expandido lateralmente, afilando-se distalmente, recobrimdo o pênis (Figura 5F, G). Gonóporo coxal; papila peniana larga, afilando-se abruptamente distalmente (Figura 6). Telson subtriangular. Sistema botão-pressão presente, funcional.

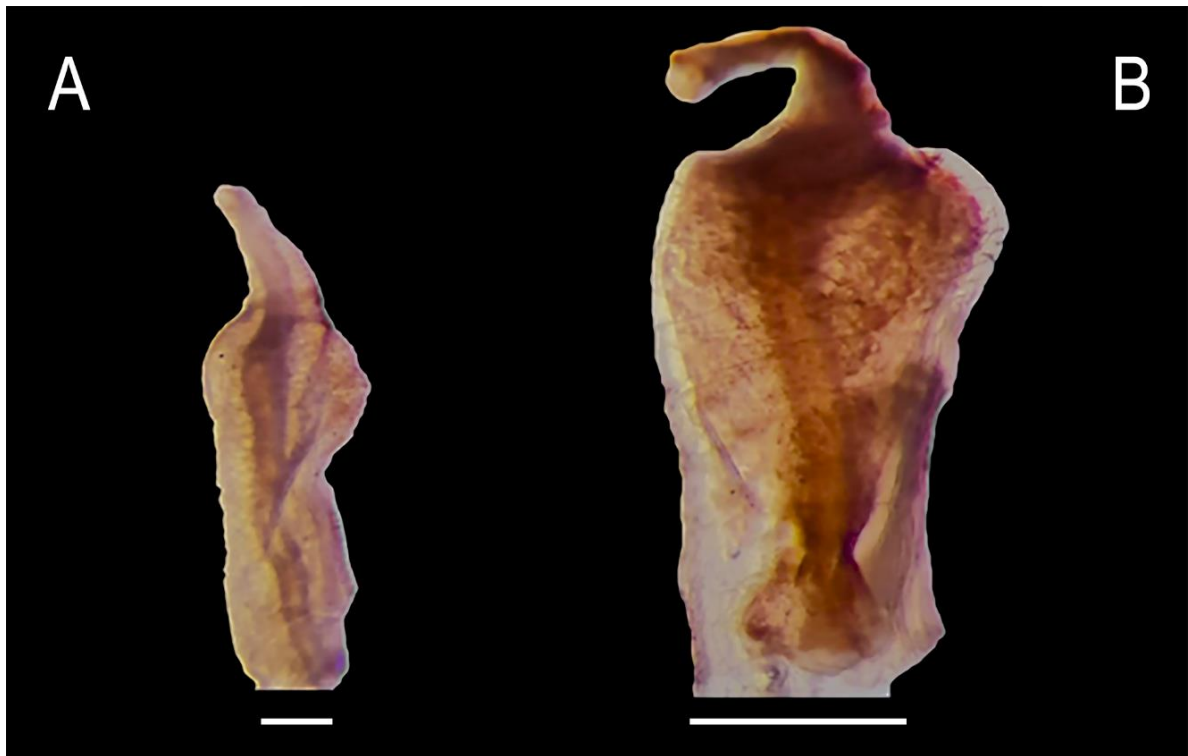


Figura 7. A, B, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), pênis. A, Jovem (USNM 252242). B, Adulto (MZUSP 39272). Escala: 0.5 mm.

Primeiro gonópodo tubular, ligeiramente recurvado lateralmente, com extremidade aproximadamente truncada, provido de minúsculo apêndice córneo cônico, subterminal. Segundo gonópodo filiforme, aproximadamente tão longo quanto o primeiro gonópodo (Figura 8).



Figura 8. A, B, *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), macho (MZUSP 39272). A, B, Primeiro e segundo gonópodes, respectivamente, em microscopia eletrônica de varredura. Escala 200 μm e 30 μm .

Fêmea e macho semelhantes. Vulvas grandes, próximas ao eixo do esterno torácico, recobertas por opérculo calcificado. Fêmeas jovens e adultas com pleonito 3 expandido lateralmente, semelhante aos machos (Figura 5F, G). Telson cordiforme.

Observações. *Acidops cessacii* e *A. fimbriatus* são morfologicamente similares. Ng & Rahayu (2014) encontraram diferenças no artícolo basal da antênula (maior e mais largo em *A. fimbriatus*) e no ângulo antero externo do mero do terceiro maxilípede (mais arredondado e angular em *A. fimbriatus*). As duas espécies também diferem na coloração: amarelo-

amarronzada em *A. fimbriatus*, amarelo-claro com manchas marrons em *A. cessacii* (viz. Ng & Rahayu 2014: fig. 40A, B, respectivamente).

Ng & Rahayu (2014) opinaram que *A. fimbriatus* e *A. cessacii* diferem adicionalmente em relação à proporção da frente, comparativamente bem mais protraída em *A. fimbriatus*. Entretanto, a protração da frente varia em espécimes de *A. cessacii* oriundos da mesma localidade (Arquipélago São Pedro e São Paulo), sendo essa característica, portanto, inapropriada para distinguir *A. fimbriatus* de *A. cessacii*. A depender do ângulo em que o esterno torácico é visto, as suturas 4/5 darão a impressão de seguir trajetória retilínea e formar um ângulo no ponto de encontro com a linha esternal mediana em *A. fimbriatus*, ou serem as suturas 4/5 arqueadas e não formarem um ângulo no ponto de encontro com a linha esternal mediana em *A. cessacii* (Ng & Rahayu 2014: Fig. 3A, B, respectivamente). Em *A. cessacii*, os sulcos da superfície dorsal da carapaça podem ser menos acentuados em alguns indivíduos e a densidade e desenvolvimento das cerdas sobre a carapaça também variam. Barreto *et al.* (1993) mencionaram que os dedos dos quelípodos deixam um pequeno hiato no terço proximal quando fechados. Essa característica varia com o tamanho dos indivíduos, sendo que nos maiores os dedos deixam um hiato ao longo de todo o comprimento (Figura 5 D, E).

Acidops fimbriatus é encontrada na costa pacífica das Américas, da Califórnia ao México, incluindo as ilhas Clipperton e Galápagos (Garth 1946; Hendrickx 1995; Poupin *et al.* 2009), enquanto *A. cessacii* é uma espécie atlântica (Monod 1956; Manning & Chace 1990; Barreto *et al.* 1993; presente estudo). A espécie do Pacífico foi encontrada associada a fundos rochosos, de coral e de areia em profundidades de até 70 metros (Garth 1946).

O estudo morfológico comparativo entre os espécimes oriundos de Ascensão, São Pedro e São Paulo e do litoral brasileiro não revelou diferenças morfológicas que pudessem sugerir a existência de mais de uma espécie nessas áreas. Se por um lado não foi possível, no momento, obter material comparativo proveniente do Atlântico oriental, por outro, a comparação com as descrições e informações existentes na literatura a partir de material africano leva a crer que *A. cessacii* constitui uma única espécie.

Análise filogenética. Os genes mitocondriais COI e 16S foram amplificados e sequenciados para exemplares de *Acidops cessacii* oriundos da ilha Ascensão e Arquipélago São Pedro e São Paulo (vide Anexo I). Não foi possível, no momento, obter material de *A. cessacii* do Atlântico

oriental para sequenciamento. As sequências para *A. fimbriatus* foram obtidas junto ao GenBank (Tabela 1)

A divergência genética interespecífica entre *A. fimbriatus* e *A. cessacii* foi de 0,2 (COI) a 0.3 (16S) ou seja, 1% para COI sugerindo que ambas são de fato espécies distintas (Tabela 1 e 2).

Os resultados moleculares também concordam com os resultados morfológicos ao não apontarem divergência genética intraespecífica entre espécimes de *A. cessacii* provenientes de São Pedro e São Paulo e ilha Ascensão (Figura 9).

Mesmo diante da necessidade de se obter mais dados sobre a população do Atlântico oriental, esses resultados, ainda que preliminares, sustentam a interpretação de ser *A. cessacii* uma espécie verdadeiramente anfi-Atlântica.

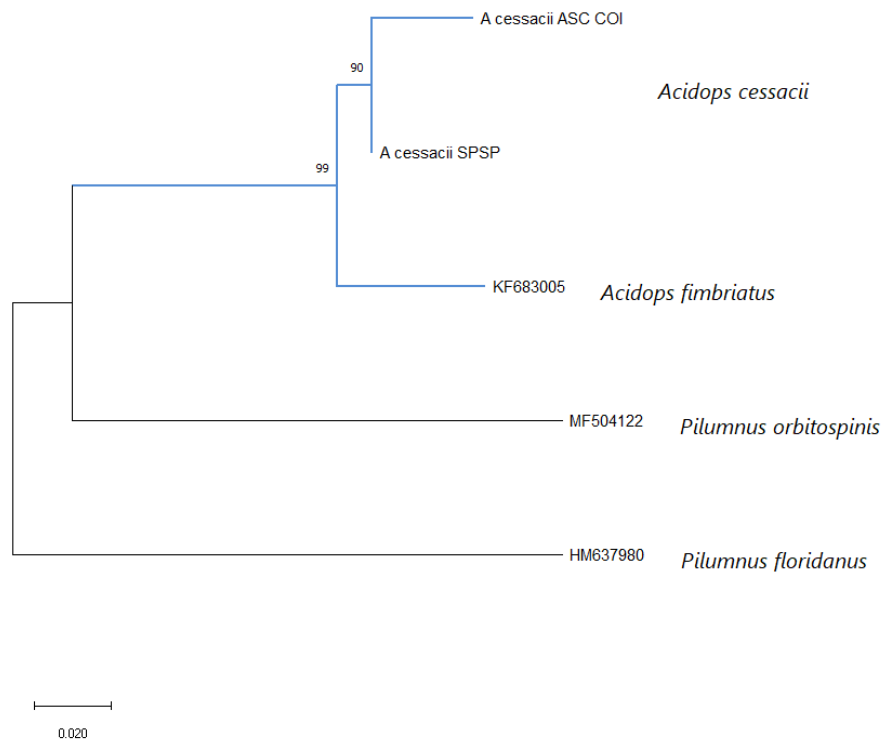


Figura 9. A, B, Filogenia Molecular mostrando as relações entre *Acidops fimbriatus* (Stimpson, 1871) e *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878), clado azul. Análise concatenada dos genes mitocondriais COI e 16S usando maximum likelihood com valores de bootstrap maiores que 50% apresentados.

Tabela 2. Matriz de distância genética usando sequências do gene mitocondrial COI (p-distance).

	<i>A. cessacii</i> ASC	<i>A. cessacii</i> SPSP	<i>A. fimbriatus</i>	<i>Pilumnus</i> sp.	<i>P. orbitospinis</i>	<i>P. floridanus</i>
<i>Acidops cessacii</i> ASC						
<i>A. cessacii</i> SPSP	0,03					
<i>Acidops fimbriatus</i>	0,07	0,05				
<i>Pilumnus</i> sp.	0,18	0,16	0,16			
<i>Pilumnus orbitospinis</i>	0,17	0,15	0,17	0,17		
<i>Pilumnus floridanus</i>	0,19	0,17	0,17	0,17	0,18	

Tabela 3. Matriz de distância genética de *Acidops* spp. e *Pilumnus* spp. usando sequências do gene mitocondrial 16S (p-distance).

	<i>A. cessacii</i> 2 SPSP	<i>A. cessacii</i> 3 SPSP	<i>A. cessacii</i> SPSP	<i>A.</i> <i>fimbriatus</i>	<i>P.</i> <i>floridanus</i>	<i>P.</i> <i>pannosus</i>
<i>A. cessacii</i> 2 SPSP						
<i>A. cessacii</i> 3 SPSP	0,02					
<i>A. cessacii</i> SPSP	0,02	0,00				
<i>Acidops fimbriatus</i>	0,06	0,04	0,04			
<i>Pilumnus</i> <i>floridanus</i>	0,17	0,15	0,15	0,17		
<i>Pilumnus pannosus</i>	0,15	0,13	0,13	0,14	0,05	

Comentários zoogeográficos. Há na literatura muitos casos documentados de organismos marinhos de águas costeiras com padrão anfi-Atlântico de distribuição geográfica (A. Milne-Edwards 1880; Rathbun 1918; 1930; 1935; 1937; Ekman 1953; Manning & Holthuis 1981; Edwards & Lubbock 1983; Wirtz *et al.* 1988; Manning & Chace 1990; Melo 1996; Anker *et al.* 2016; Tavares *et al.* 2017).

Excetuando-se os casos em que os supostos padrões anfi-Atlânticos são, na verdade, o resultado artificial de conhecimento taxonômico insuficiente (espécies diferentes confundidas entre si ou ainda não reconhecidas como espécies diferentes), resta saber qual conjunto de fatores contribuem para explicar a existência de ocorrência concomitante de espécies de águas costeiras nas costas do Atlântico ocidental e oriental, incluindo ou não a presença em ilhas oceânicas remotas.

A presença do padrão anfi-Atlântico em espécies tropicais e subtropicais, mais frequente em direção ao equador proporcionalmente às águas temperadas, sugere a influência da corrente transatlântica sul equatorial e da contracorrente equatorial na

formação do padrão anfi-Atlântico, transportando larvas de leste para oeste e vice versa, respectivamente.

De fato, a dominância do fluxo da corrente transatlântica Sul Equatorial (Colling 2001), traz águas tropicais quentes da costa atlântica africana facilitando, portanto, a migração de espécies do Atlântico oriental para as costas Americanas. Acontece, porém, que quando a convergência intertropical se move (posição média situada ao redor de 5°N, cf Arbuszewski *et al.* 2013), os ventos de leste para oeste (Trade Winds) normalmente persistentes enfraquecem propiciando que a contracorrente (oeste-leste) arraste águas superficiais de oeste para leste, consequentemente facilitando o transporte de larvas de oeste para leste (Scheltema 1971; Edwards & Lubbock 1983) (Figura 10).

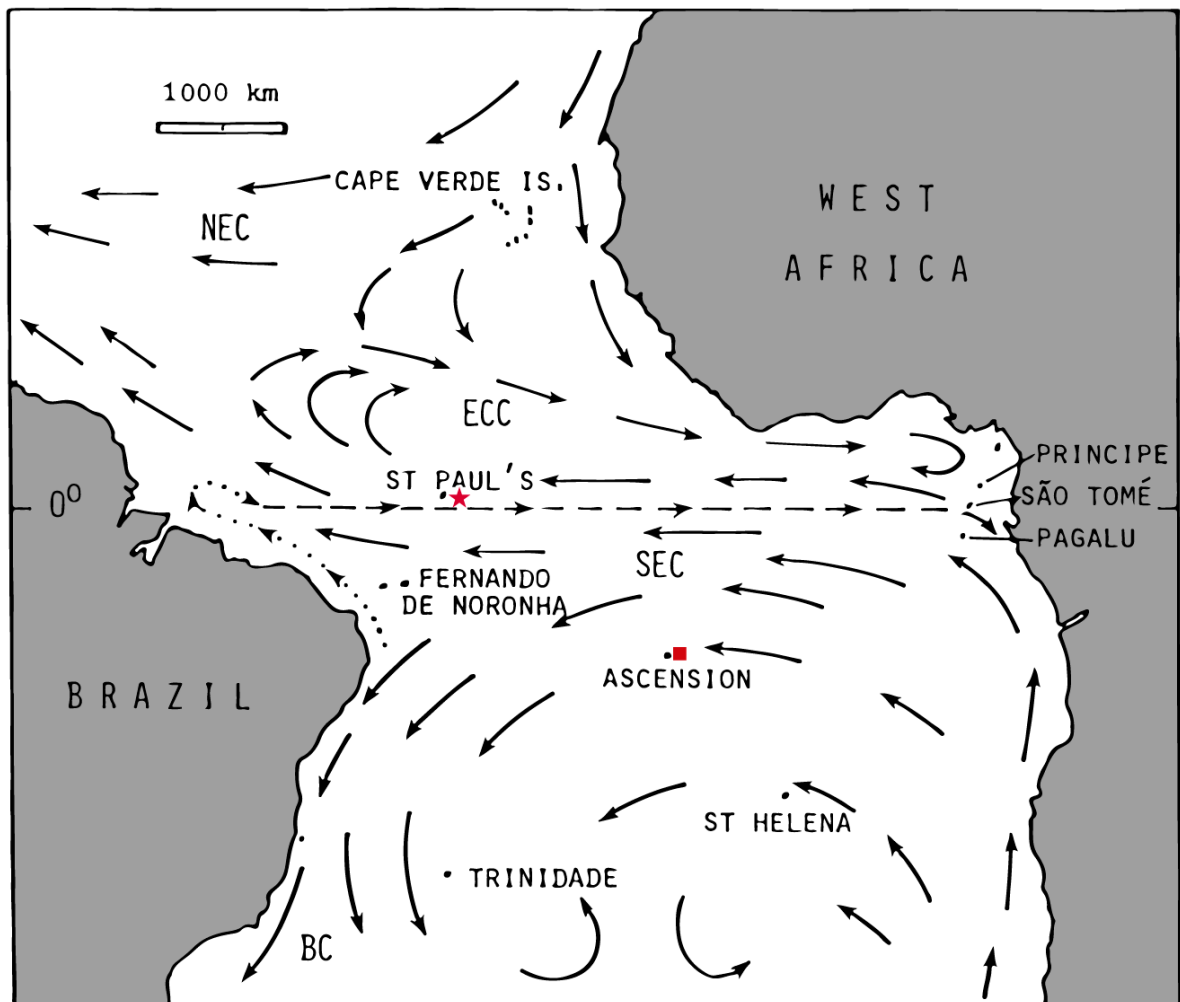


Figura 10. Principais correntes rasas na região tropical do oceano Atlântico central e sul. SEC, Corrente Sul Equatorial. NEC, Corrente Equatorial Norte, ECC, Contracorrente Equatorial. BC, Corrente Brasileira (baseado em Edwards & Lubbock 1983).

As ilhas oceânicas do Atlântico Sul (Arquipélago São Pedro e São Paulo e Ascensão) abrigam algumas espécies anfi-Atlânticas entre as quais *Acidops cessacii* (Holthuis *et al.* 1980; Manning & Chace 1990; presente estudo). Algumas espécies insulares de Brachyura presentes em São Pedro e São Paulo e Ascensão ocasionalmente podem ser encontradas no litoral brasileiro, é o caso de *Grapsus grapsus* (Linnaeus, 1758), registrada no Ceará por Fausto Filho (1966); *A. cessacii* encontrada no Ceará e Rio Grande do Norte (Barreto *et al.* 1993; Melo 1993; presente estudo) e *Euryozius sanguineus* (Linnaeus 1771) (vide capítulo 2 da presente dissertação). É de se supor que a ocorrência ocasional de *A. cessacii* na costa brasileira (possivelmente de outras espécies também) tenha relação com eventos persistentes de prevalência da corrente Sul Equatorial que facilitam o transporte de larvas de leste para oeste.

Considerações finais

O gênero *Acidops* (Acidopsidae) contém duas espécies, *Acidops fimbriatus* Stimpson, 1871 (espécie tipo do gênero) do Pacífico tropical das Américas e *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878) com ocorrência na costa atlântica africana, nas ilhas oceânicas do Atlântico Central (Ascensão e Arquipélago São Pedro e São Paulo) e em localidades da costa nordeste brasileira. *Acidops fimbriatus* e *Acidops cessacii* são morfologicamente semelhantes entre si, todavia os estudos morfológicos e moleculares (genes mitocondriais COI e 16S) realizados no presente trabalho confirmaram *A. cessacii* e *A. fimbriatus* como espécies distintas.

O padrão de distribuição anfi-Atlântico de *Acidops cessacii* (A. Milne-Edwards, 1878) foi confirmado pela análise das populações das ilhas oceânicas do Atlântico Central e da costa brasileira que se mostraram indistinguíveis, tanto nas observações morfológicas como nas análises moleculares. O presente estudo será ampliado, oportunamente, para incluir a população de *A. cessacii* do Atlântico africano.

Referências

- Anker, A.; Tavares, M. & Mendonça, J.B. 2016. Alpheid shrimps (Decapoda: Caridea) of the Trindade & Martin Vaz Archipelago, off Brazil, with new records, description of a new species of *Synalpheus* and remarks on zoogeographical patterns in the oceanic islands of the tropical southern Atlantic. *Zootaxa*, 4138(1), 1–58.
- Arbuszewski, J.A., deMenocal, P.B., Cléroux, C., Bradtmiller, L. & Mix, A. 2013. Meridional shifts of the Atlantic intertropical convergence zone since the Last Glacial Maximum. *Nature Geoscience*, 6, 959–962.
- Balss, H. 1921. Crustacea VI: Decapoda Anomura (Paguridea) und Brachyura (Dromiacea bis Brachygnatha). In: Michaelsen, E., *Beitrage zur Kenntnis der Meeres-fauna-Westafrikas*, III, lief 2. Hamburg, p. 37-68, figs. 1-7.
- Barreto, A.V., Coelho, PA. & Melo, G.A.S. de 1993. Ocorrência de *Acidops cessaci* (A. Milne Edwards, 1878. (Crustacea, Decpoda, Brachyura) no Brasil. *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco*, 22, 271–279 [1991]
- Colling, A. 2001. Ocean circulation. 2nd Edition. Butterworth-Heinemann, Oxford, 286 pp.
- Collins, R. A., Boykin, L. M., Cruickshank, R. H., & Armstrong, K. F. (2012). Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(3), 457-465.
- Davie, P.J.F., Guinot, D. & Ng, P.K.L. 2015. Systematics and classification of Brachyura. In: Castro, P., Davie, P.J.F., Guinot, D., Schram, F.R. & von Vaupel Klein, J.C. (Eds.), *Treatise on zoology – anatomy, taxonomy, biology, Decapoda: Brachyura* Vol. 9C-II. Part 2. Brill, Leiden, pp. 1049–1130.
- Edwards, A. & Lubbock, R. 1983. Marine zoogeography of St Paul's Rocks. *Journal of Biogeography*, 10, 65–72.
- Ekman, S. (1953) *Zoogeography of the Sea*. London, Sidgwick & Jackson, 417p.
- Fausto-Filho, J. 1966. Primeira contribuição ao inventário dos crustáceos Decápodos marinhos do nordeste brasileiro. *Arquivos da Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará*. 6 (1), 31–37.

- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Forest, J. & Guinot, D. 1966. Crustaces Decapodes: Brachyours. In Campagne de la Calypso dans le golfe de Guinee et aux iles Principe, Sao Tome et Annobon (1956), 16. *Annales de l'Institut Oceanographique* (Monaco), 44, 23–124.
- Garth, J.S. 1946. Littoral Brachyuran Fauna of the Galapagos Archipelago. *Allan Hancock Pacific Expeditions*, 5, 341–601.
- Garth, J.S. 1968. *Globopilumnus xantusii* (Stimpson), n. comb., a Stridulating Crab from the West Coast of Tropical America, with Remarks on Discontinuous Distribution of Some West American and West African Genera of Brachyrhynchous Crabs. *Crustaceana*, 15(3), 312–318.
- Guinot, D. & Ribeiro, A. 1962. Sur une collection de Crustaces Brachyours des Îles du Cap-Vert et de l'Angola. *Memórias da Junta de Investigações do Ultramar*, segunda série, 40, 8–89, figs. 1–19.
- Guinot, D., Tavares, M. & Castro, P. 2013. Significance of the sexual openings and supplementary structures on the phylogeny of brachyuran crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura), with new nomina for higher-ranked podotreme taxa. *Zootaxa*, 3665(1), 1–414.
- Hendrickx, M.E. 1995. Checklist of brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda) from the eastern tropical Pacific. *Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique*, 65, 125–150.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059-3066.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649.

- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 189–216.
- Lessios, H.A., Kessing, B.D., Robertson, D.R. & Paulay, G. 1999. Phylogeography of the pantropical sea urchin *Eucidaris* in relation to land barriers and ocean currents. *Evolution*, 53, 806–817.
- Milne-Edwards, A. 1878. Description de quelques nouvelles espèces nouvelles de Crustacés provenant du voyage aux îles du Cap-Vert de MM. Bouvier et de Cessac. *Bulletin de la Société Philomathique de Paris*, 2 (4), 225.
- Milne-Edwards, A. 1880. Études préliminaires sur les crustacés. In Reports on the Results of Dredging, under the Supervision of Alexander Agassiz, in the Gulf of Mexico, and in the Caribbean Sea, 1877, '78, '79, by the United States Coast Survey Steamer "Blake," Lieut.-Commander C D . Sigsbee, U.S.N., and Commander J. R. Bartlett, U.S.N., Command- ing, VIII. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology, Harvard*, 8 (1), 1–68.
- Milne-Edwards, A. & Bouvier, E.-L. 1990. Crustacés Décapodes. Première partie. Brachyures et Anomures. In: *Expéditions scientifiques du Travailleur et du Talisman pendant les années 1880–1883*. Masson et Cie, ed., Paris, 396 p., 32 pls.
- Manning, R.B. & Holthuis, L.B. 1981. West African Brachyuran Crabs (Crustacea: Decapoda). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 306, 1–379.
- Manning, R.B. & Chace, F.A. Jr. 1990. Decapod and stomatopod Crustacea from Ascension Island, South Atlantic Ocean. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 503, 1–91.
- Melo, G.A.S. 1996. *Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do Litoral Brasileiro*. Editora, Plêiade, São Paulo, 604 pp.
- Monod, T. 1956. Hippidea et Brachyura ouest-africains. *Mémoires de l'Institut français d'Afrique Noire*, 45, 1–674.
- Muss, A., Robertson, R., Wirtz, P., Bowen, B. & Stepien, C.A. 2001. Phylogeography of the genus *Ophioblennius*: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution*, 55, 561–572.
- Nei, M., & Kumar, S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford university press.
- Ng P.K.L., Davie P.J.F. & Guinot D. 2008. *Systema Brachyurorum*: Part 1. An Annotated checklist of extant Brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 17, 1–286.
- Ng P.K.L. & Rahayu, D. 2014. Revision of the family Acidopsidae Števcíć, 2005, and the systematic position of *Typhlocarcinodes* Alcock, 1900, *Caecopilumnus* Borradaile, 1902,

- and *Raoulia* Ng, 1987, with descriptions of two new genera and five new species (Crustacea: Brachyura: Goneplacoidea). *Zootaxa*, 3773(1), 1–63.
- Poupin, J., Bouchard, J.-M., Albenga, L., Cleva, R., Hermoso-Salazar, M. & Solís-Weiss, V. 2009. Les Crustacés Décapodes et Stomatopodes, inventaire, écologie et zoogéographie. In: Charpy, L. (Ed.), *Clipperton, Environnement et Biodiversité d'un Microcosme Océanique*. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, Patrimoines naturels, 68, pp. 1–420.
- Rathbun, M.J. 1918. The grapsoid crabs of America. *Bulletin of the United States National Museum*, 97, 1–461.
- Rathbun, M.J. 1925. The spider crabs of America. *Bulletin of the United States National Museum*, 129, 1–613.
- Rathbun M. J. 1930. The Cancroid Crabs of America of the Families Euryalidae, Portunidae, Atelecyclidae, Cancridae and Xanthidae. *Bulletin of the United States National Museum Bulletin*, 152, 1– 609.
- Rathbun M.J. 1937. The oxystomatous and allied crabs of America. *United States National Museum Bulletin*, 166, 1–278.
- Ribeiro, A. 1964. Crustáceos Decápodos Braquiuros do Arquipélago de Cabo Verde. Notas Mimeografadas do Centro de Biologia Piscatória de Lisboa, 1-27 [Colecao do Centro de Biologia Piscatória].
- Scheltema, R.S. 1971. The dispersal of the larvae of shoal-water benthic invertebrate species over long distances by ocean currents. In: Crisp, P.J. (Ed.). *Fourth European Marine Biology Symposium*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Sourie, R. 1954. Contribution a l'étude écologique des côtes rocheuses du Senegal. *Memoires de l'Institut Francais d'Afrique Noire*, 38, 1–342, figs. 1-46.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Števičić, Z. 2005. The reclassification of Brachyuran Crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Fauna Croatica*, 14 (1), 1–159.
- Stimpson, W. 1871b. Notes on North American Crustacea in the Museum of the Smithsonian Institution, No. III. *Annals of the Lyceum of Natural History of New York*, 10(4–5), 92–136.
- Tavares, M., Carvalho, L. & Mendonça, J.B. de 2017. Towards a review of the decapod Crustacea from the remote oceanic Archipelago of Trindade and Martin Vaz, South

- Atlantic Ocean: new records and notes on ecology and zoogeography. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 57(14), 157–176.
- Tesch, J.J. 1918. Decapoda Brachyura II. Goneplacidae and Pinnotheridae. *Siboga Expeditie Monographie*, 39c1: 149–295, pls. 7–18.
- Türkay, M. 1982. Marine Crustacea Decapoda Vonden Kapverdeschen Inseln mit Bemerkungen Zur zoogeographie des Gebietes. *Sonderdruck aus CFS Courier*, 52, 91–129.
- Wirtz, P. 2004. Four amphi-Atlantic shrimps new for São Tomé and Príncipe (Eastern Central Atlantic). *Life and Marine Science*, 21(A), 83–85.
- Wirtz, P., Müller, B. & Nahke, P. 1988. The Caribbean shrimp *Tuleariocaris neglecta* Chace 1969 found in association with *Diadema antillarum* at Madeira, and two new records of decapod crustaceans from the Cape Verde Islands. *Courier Forschungs Institut Senckenberg*, 105, 169–171.
- Zheng Zhang; Scott Schwartz; Lukas Wagner & Webb Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J Comput Biol*, 7(1-2):203-14.

CAPÍTULO 2

***Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771) (Crustacea: Brachyura: Pseudoziidae)
no remoto Arquipélago São Pedro e São Paulo e litoral brasileiro: evidências
morfológicas e moleculares**

***Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771) (Crustacea: Brachyura: Pseudoziidae) no remoto Arquipélago São Pedro e São Paulo e litoral brasileiro: evidências morfológicas e moleculares**

Resumo

Euryozius sanguineus (Linnaeus, 1771) foi originalmente descrita da Ilha Ascensão, no Atlântico Central. Posteriormente, duas outras espécies foram descritas: *Euryozius bouvieri* (A. Milne-Edwards, 1869) (Açores, Madeira e Cabo Verde) e *E. pagalu* Manning & Holthuis, 1981 (Golfo da Guiné). Barreto (1991) considerou que o material de *Euryozius* proveniente do litoral brasileiro pertence a *E. bouvieri*, então considerada como espécie de distribuição anfi-Atlântica. Coelho Filho & Coelho (1995) sinonimizaram *E. bouvieri* e *E. pagalu* à *E. sanguineus*. Melo (1996) considerou *E. sanguineus* como espécie anfi-Atlântica. Evidências morfológicas e moleculares (genes mitocondriais COI e 16S) obtidas pelo presente estudo mostram que o material de São Pedro e São Paulo e do litoral brasileiro são coespecíficos. Material de Ascensão e Santa Helena serão incorporados a esse estudo oportunamente. Sequências de genes mitocondriais COI e 16S de *E. bouvieri* e *E. pagalu* no Atlântico oriental não foram amplificadas com sucesso.

Palavras-chave. Taxonomia, Decapoda, Atlântico oriental e ocidental, ilhas oceânicas

Abstract

Euryozius sanguineus (Linnaeus, 1771) was originally described from Ascension Island in the Central Atlantic. Later, two other species were described: *Euryozius bouvieri* (A. Milne-Edwards, 1869) (Azores, Madeira and Cape Verde) and *E. pagalu* Manning & Holthuis, 1981 (Gulf of Guinea). Barreto (1991) considered that the *Euryozius* material from the Brazilian coast belongs to *E. bouvieri*, then considered the species of amphi-Atlantic distribution. Coelho Filho & Coelho (1995) synonymized *E. bouvieri* and *E. pagalu* with *E. sanguineus*. Melo (1996) considered *E. sanguineus* as an amphi-Atlantic species. Morphological and molecular evidence (mitochondrial genes COI and 16S) obtained in the present study show that material from São Pedro and São Paulo and from the Brazilian coast are conspecific. Ascension and St. Helena material will be incorporated into this study in due course. COI and 16S mitochondrial gene sequences from *E. bouvieri* and *E. pagalu* in the eastern Atlantic were not successfully amplified.

Key words. Taxonomy, Decapoda, East and West Atlantic, oceanic islands.

Introdução

Cancer sanguineus Linnaeus, 1771 (atualmente *Euryozius sanguineus*) foi originalmente descrita da Ilha Ascensão (Manning & Holthuis 1981: 128). Após 1806, entretanto, o nome *Cancer sanguineus* Linnaeus desapareceu da literatura (vide Manning & Chace 1990 para sinonímia entre 1771 e 1806).

Miers (1881), descreveu *Pseudozius mellissii* das ilhas Ascensão e Santa Helena. Em seguida, Miers (1886: 142, 143) referiu-se ao material de Ascensão e Santa Helena sob o nome de *Pseudozius bouvieri mellissii*, mas mencionou a possibilidade de ser esse taxon idêntico à *Pseudozius bouvieri* (A. Milne Edwards, 1869) (localidade tipo: São Vicente, Cabo Verde): “*Pseudozius bouvieri* (A. Milne Edwards, 1869) = *Pseudozius mellissii*, Miers, var. (?). Cape Vert Islands, St Helena, Ascension Islands.”

Guinot (1967a: 264, nota de roda-pé) mostrou que *Pseudozius bouvieri* pertence na realidade ao gênero *Euryozius* Miers, 1886. Subsequentemente, o nome *E. bouvieri* foi largamente utilizado pelos autores durante décadas e a espécie tida como de ampla distribuição: Ascensão, Santa Helena, Açores, Madeira, Cabo Verde e Golfo da Guiné. Barreto *et al.* (1993) mencionaram a presença de *E. bouvieri* na costa brasileira (Pará, Maranhão e Ceará).

Todavia, Manning & Holthuis (1981) consideraram que a disparidade de tamanho entre indivíduos atribuídos à *E. bouvieri* provenientes de localidades distantes entre si era sugestiva da existência de um complexo de espécies e decidiram investigar a possibilidade de que espécies diferentes ocorriam em localidades diferentes. A partir do material disponível (Ascensão, Madeira, Cabo Verde e Annobon no Golfo da Guiné), Manning & Holthuis (1981) concluíram pela existência de três espécies de *Euryozius* no Atlântico: *E. sanguineus* (Linnaeus) de Ascensão e Santa Helena (Manning & Holthuis não mencionaram o Arquipélago de São Pedro e São Paulo); *E. bouvieri* (A. Milne-Edwards), de Madeira, Açores e Cabo Verde; e *E. pagalu* Manning & Holthuis, 1981, restrita ao Golfo da Guiné.

Holthuis (1980), a partir dos resultados ainda no prelo obtidos por Manning & Holthuis, só efetivamente publicados em 1981, resgatou o nome de Linnaeus (sob *E. sanguineus*) ao mencionar a espécie para o Arquipélago São Pedro e São Paulo com base em uma fêmea jovem. Holthuis (1980), opinou que embora jovem, o exemplar de São Pedro e São Paulo assemelha-se ao material de Ascensão e Santa Helena.

Coelho Filho & Coelho (1995) examinaram material do litoral brasileiro (exceto do Arquipélago de São Pedro e São Paulo) e de São Tomé (Golfo da Guiné), concluíram, sem verdadeiramente aprofundar a questão da existência de fato de três espécies de *Euryozius* no Atlântico, não ser "...possível separar o material brasileiro e as 3 espécies descritas [sic], levando assim à conclusão de que haveria apenas uma espécie, com distribuição anfi-Atlântica...", qual seja, *E. sanguineus* (Linnaeus, 1771).

No presente trabalho, ainda que preliminarmente, nós revisitamos o problema da diversidade específica de *Euryozius* no Atlântico a partir de abordagem morfológica e molecular. A presente ocasião serviu, igualmente, para comparar molecularmente os gêneros *Euryozius* e *Pseudozius* Dana, 1851, de cuja sinonímia *Euryozius* foi retirado por Guinot (1968c).

Material & Métodos

Procedimentos: microscopia eletrônica e tomografia computadorizada.

Para a microscopia eletrônica os apêndices dissecados foram desidratados limpos mecanicamente, posteriormente hidratados em água destilada para remover os traços de impurezas e, em seguida, desidratados em uma série alcoólica (25%, 50%, 75% e 100%). Subsequentemente foram desidratados em ponto crítico e montados em *stubs* metálicos com fitas dupla-face e banhados a ouro para observação com auxílio de microscópio eletrônico marca LEO 440 do Museu de Zoologia da USP.

As imagens de tomografia foram obtidas com auxílio de um "microfocus X-ray μ CT system (GE phoenix v|tome|x)" a partir dos seguintes parâmetros: detector 2014×2024 pixels, voltagem 50–60 kV, corrente 85–300 μ A, voxel 2.6–21.1 μ m, e 1000–1500 imagens; imagens X-ray registradas em 1000 ms de exposição por imagem.

Repositórios. Os espécimes estudados provêm das coleções do Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo (MZUSP), Museu Oceanográfico da Universidade Federal de Pernambuco (MOUFPE) e do National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington D.C. (USNM).

Formato. A classificação segue, essencialmente Ng *et al.* (2008) e a terminologia Guinot *et al.* (2013) e Davie *et al.* (2015).

Análise molecular. Foram escolhidas para a amplificação as regiões COI (Folmer *et al.*, 1994) e 16S (Palumbi *et al.* 2002). O DNA foi extraído utilizando-se o kit comercial INVITROGEN PureLink Genomic DNA Kit seguindo o protocolo do fabricante adaptado, a partir de tecido muscular dos pereopodos. As amostras selecionadas foram purificadas com EXO-SAP. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências de Brachyura do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), por meio do algoritmo BLAST (Zheng Zhang *et al.*, 2000). As sequências foram editadas e alinhadas com auxílio do programa computacional Geneious 7.1.9 (Kearse *et al.* 2012) (vide ANEXO I para detalhes).

Os cálculos de distância genética foram realizados usando o software MEGA X (Kumar *et al.* 2018). As matrizes de distâncias foram calculadas usando distâncias não corrigidas (p-distance) com base em fragmentos do gene COI e 16S. As matrizes de distâncias foram construídas sem usar um modelo de evolução, uma vez que foi demonstrado que o uso de p-distance evita a sobre-parametrização e não há necessidade de usar medidas de distâncias complexas ao estudar sequências intimamente relacionadas (Nei & Kumar, 2000; Collins *et al.*, 2012). Para ajudar a avaliar as distâncias genéticas interespecíficas, dois histogramas de frequência foram construídos com sequências do gene COI e 16S.

As sequências geradas para este estudo foram combinadas com sequências do GenBank, totalizando 15 sequências dos marcadores genéticos COI e 16S. O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado separadamente para cada marcador no Geneious 8.0.5 usando o algoritmo de alinhamento MAFFT v7.017 (Kato & Miyata, 2002), os alinhamentos foram inspecionados visualmente quanto a quaisquer desalinhamentos óbvios. Posteriormente as sequências foram concatenadas e o alinhamento exportado para o MEGA X. Foi utilizado Máxima Verossimilhança para inferência filogenética usando RAxML versão 7.2.8 (Stamatakis, 2014). Foram usadas 1000 réplicas de bootstrap. Parâmetros de probabilidade seguiram o modelo General Time Reversible (GTR G+I), estimados individualmente para os marcadores moleculares no MEGA X.

Tabela 4. Táxons incluídos nas análises de distância genética e filogenética molecular deste estudo. Abreviações de números de tombo: MZUSP, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; USNM, Museu Nacional dos Estados Unidos, Smithsonian Institution; ZRC, Coleção Zoológica de Referência de Lee Kong Museu de História Natural de Chian, SPSP = Arquipélago de São Pedro e São Paulo; -, sem informação.

Espécies	Localidade	N. De tombo	N. de id. GenBank	
			16S	COI
<i>Euryozius</i>				
<i>E. sanguineus</i>	SPSP	MZUSP 16942	x	x
<i>E. sanguineus</i>	SPSP	MZUSP 39338	x	x
<i>E. sanguineus</i>	SPSP	MZUSP 39339	x	x
<i>E. sanguineus</i>	SPSP	MZUSP 39340	x	x
<i>E. sanguineus</i>	SPSP	MZUSP 16942	x	x
<i>E. sanguineus</i>	Canopus Bank	MZUSP 39341	x	x
<i>E. camachoi</i>	Filipinas	ZRC 2008.1478	HM637970	HM638040
Grupo externo				
<i>Pseudozius caystrus</i>	Guam	ZRC 2000.0727	HM637984.1	HM638059
<i>Carpilius maculatus</i>	Off Havaí		AF501729	HM638026
<i>C. maculatus</i>	–	–	NC049030*	NC049030*
<i>C. convexus</i>	–	–	-	MT780873
<i>C. convexus</i>	Kaneohe, Havaí, USA	–	-	MW278155
<i>Atergatis floridus</i>	–	–	-	DQ889081
<i>A. floridus</i>	–	ZRC 2009.0373	HM798422	HM750949

* genoma mitocondrial

Resultados

Família **Pseudoziidae Alcock, 1898**

Gênero ***Euryozius* Miers, 1886**

Pseudozius (*Euryozius*) Miers, 1886: 142 [Espécie tipo: *Xantho bouvieri* A. Milne-Edwards, 1869, por monotipia]

Espécies inclusas. *Euryozius bouvieri* A. Milne-Edwards, 1869 [*Xantho*]; *E. camachoi* Ng & Liao, 2002; *E. canorus* (Rathbun, 1911); *E. danielae* Davie, 1992; *E. pagalu* Manning & Holthuis, 1981; *E. sanguineus* (Linnaeus, 1771).

Observações. Os gêneros *Euryozius* e *Pseudozius* Dana, 1851, são morfologicamente semelhantes entre si, diferindo, essencialmente pela presença de aparelho estridulatório em *Euryozius* (Figura 11).



Figura 11. A, B, *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). A, Tomografia computadorizada, fêmea (MOUFPE 12762) LC 10 mm ; CC 06 mm , Rio Grande do Norte. B, fêmea, LC 27 mm CC 44 mm (MZUSP 39404). A seta indica o aparelho estridulatório. Escala: A. 0.8 mm.

***Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771)**

(Figuras Figura 11, Figura 13, Figura 14, Figura 16, Figura 17C, Figura 18, Figura 19A)

Cancer sanguineus Linnaeus, 1771: 542 [Localidade tipo: Ascensão]

Euryozius sanguineus – Holthuis *et al.* 1980: 38; Manning & Holthuis, 1981: 124, 129; Manning & Chace, 1990: 55, 56

Xantho bouvieri - A. Milne Edwards, 1869: 377

Pseudozium mellissi Miers, 1881 432

Ozium edwardsi Barrois, 1888: 10

Pseudozium bouvieri - Capart, 1951: 164; Monod, 1956: 239

Euryozium bouvieri - Guinot, 1968: 325; Türkay, 1976: 61; Manning & Holthuis, 1981: 125; Barreto, 1991: 53

Euryozium pagalu Manning & Holthuis, 1981: 126

Material examinado. Atlântico ocidental: Pará: 1 macho juvenil (MOUFPE 43), Expedição Geomar GM Estação 43, 01°33'00"N, 46°45'00"W. 1 macho juvenil (MOUFPE 29), Expedição Geomar GM Estação 29, 00°38'00"N, 45°52'30"W. Maranhão: 1 ?juvenil (MOUFPE 5922), RV "Almirante Saldanha, Estação 1743A, °12'00.0"S, 43°54'30.0"W. 1 ?juvenil (MOUFPE 1728), RV "Almirante Saldanha, Estação 1728A, 2°05'00.0"S, 41°27'00.0"W . Ceará: 1 fêmea juvenil (MOUFPE 12758), REVIZEE NE-I, Estação 210, próximo à Cascavel, 3°50'16.8"S, 37°37'04.8"W. 1 macho juvenil (MOUFPE 5921), RV "Almirante Saldanha, Estação 1718, 2°07'00.0"S, 40°36'00.0"W. Banco Canopus: 1 fêmea juvenil (MZUSP 16942), 120 milhas de Fortaleza, coll. J. Coltra, agosto 2005. 1 macho juvenil (UFPE 5923), Expedição Canopus UFPE Estação 16, 1°35'00.0"S, 38°07'00.0"W. Rio Grande do Norte: 1 fêmea juvenil (MOUFPE 12762), REVIZEE NE-III Touros, Estação 85A, 3°28'01.2"N, 35°03'39.6"W, 04/06/1998. Atlântico Central: Arquipélago São Pedro e São Paulo: 1 fêmea (MZUSP 16687), Pernambuco, Arquipélago de São Pedro e São Paulo, Enseada, 4m coll. Vanessa Bevilaqua, det. Mauricio Q. Vanna. 1 fêmea (MZUSP 39337), 1 fêmea (MZUSP 39340), 1 fêmea (MZUSP 39402), 1 fêmea (MZUSP 39403), 1 macho (MZUSP 39341), 1 macho (MZUSP 39338), 1 macho (MZUSP 39339), Enseada, W. Santana, L. Simone, C. Cunha & E. Faria, cols. 29.x.2007 a 10.xi.2007, profundidade 3-18m, W.Santana & A.P. Pinheiro, det. 27.v.2009. 8 fêmeas, 1 macho (MZUSP 39404), 1 fêmea, 1 macho (MZUSP 39405), 1 fêmea (MZUSP 39406), Cabeço da Tartaruga, 18.ii.2009 a 05.iii.2009, W. Santana, L. Simone, C. Cunha & I. Just W.Santana & A.P. Pinheiro, det. 27.v.2009. 1 macho (MZUSP 4836), entre Belmont e SPSP, 22.iv.1979, #14-4, 25 m de profundidade em pedregulhos presos em escombros em uma encosta íngreme. Atlântico oriental: Golfo da Guiné: 1 macho, 1 fêmea (MZUSP 9629), Annobon, "Calypso" Estação 108, 04.vi.1956, Forest & Guinot det. 1965.

Distribuição geográfica. Atlântico Central: Ascensão, Santa Helena e Arquipélago São Pedro e São Paulo. Atlântico ocidental: Brasil (Pará, Maranhão, Ceará e Rio Grande do Norte) (Figura 12).

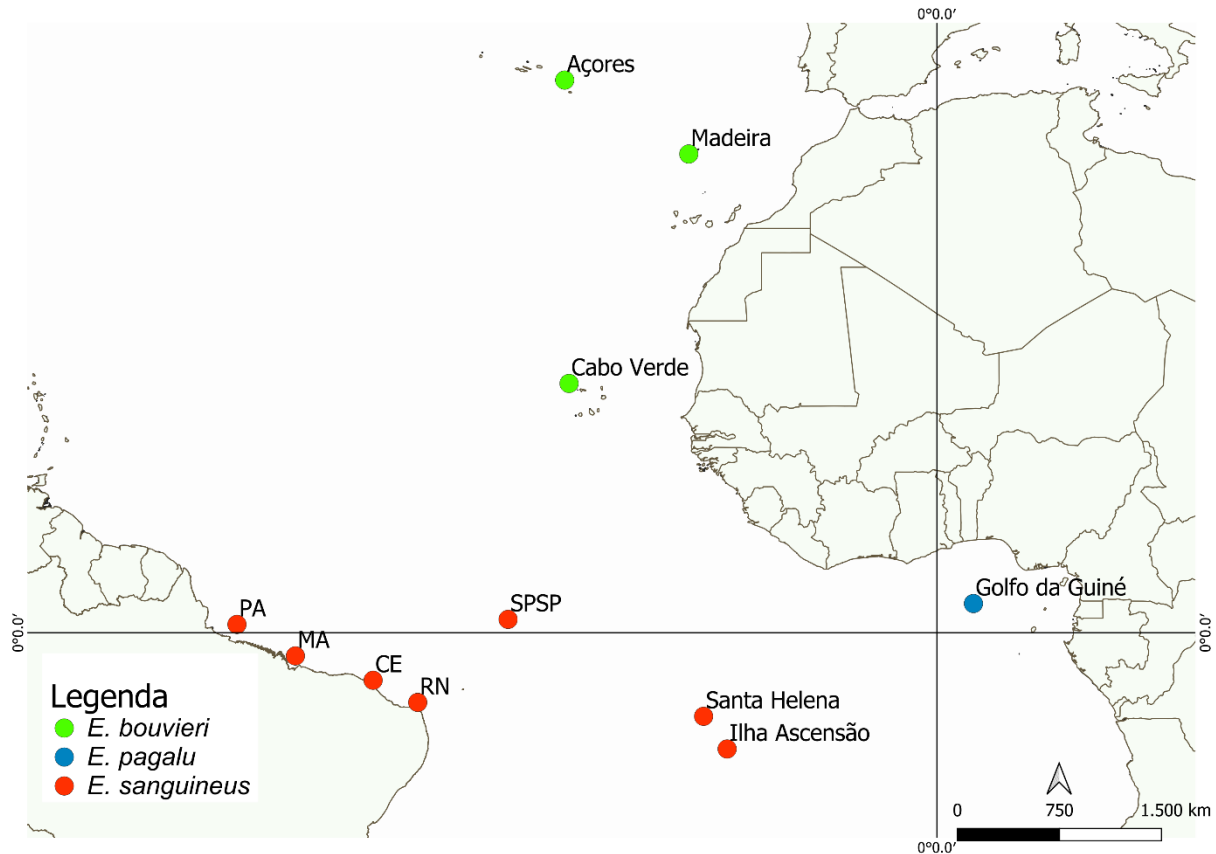


Figura 12. Distribuição geográfica das espécies Atlânticas do gênero *Euryozius* Miers, 1886: *Euryozius bouvieri* A. Milne-Edwards, 1869, *E. pagalu* Manning & Holthuis, 1981; *E. sanguineus* (Linnaeus, 1771).

Habitat. Sob rochas em fundos de areia, cascalho entre 1 e 120 m (Melo, G. A. S. 1996).

Descrição. Carapaça transversalmente oval, comprimento cerca 0.5 to 0.7 vezes a largura, regularmente convexa longitudinalmente. Margem frontorbital pouco mais da metade da largura máxima da carapaça. Fonte 2-lobada, lobos sinuosos em vista dorsal (menos sinuosa em exemplares jovens), separados por entalhe mediano distinto. Trajeto da margem frontal acompanhada dorsalmente por crista baixa. Órbita com margem superior lisa, interrompida próximo ao ângulo orbital externo por entalhe inconspícuo; ângulo orbital externo elevado em forma de tubérculo, baixo, arredondado. Margem orbital inferior pontuada por 2-3 tubérculos baixos, arredondados; ângulos orbitais inferiores externo e interno elevados.

Margem anterolateral da carapaça cristada; terminando posteriormente por 2 dentes anterolaterais nas proximidades da maior largura da carapaça; primeiro dente anterolateral menos desenvolvido (às vezes inconspícuo) do que o segundo dente. Regiões da carapaça indistintas, superfície dorsal punctada; regiões cardíaca e intestinal ladeadas por sulcos pouco marcados.

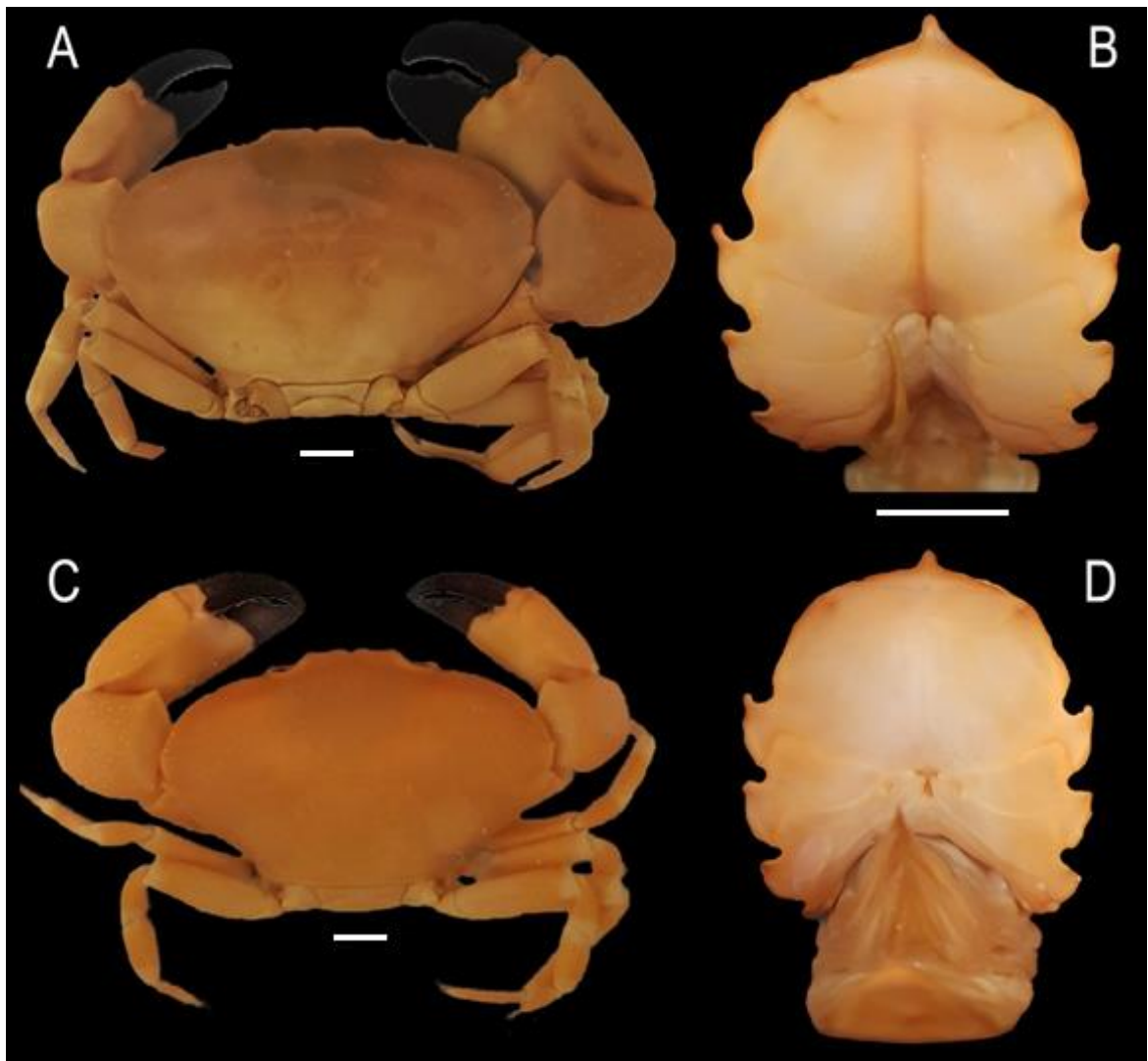


Figura 13. *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). A. macho (MZUSP 39338), LC 29 mm, CC 40 mm. B, fêmea, LC 27 mm CC 44 mm (MZUSP 39404). Escala: 5 mm.

Aparelho estridulatório sob a margem anterolateral da carapaça formado por estrias bem desenvolvidas que se iniciam próximo ao primeiro dente anterolateral extendendo-se até o dente infraorbital externo (Figura 11).

Terceiro maxilípede obstruindo completamente a cavidade bucal. Isquio subretangular, mero subquadrado, distintamente menor do que o isquio. Exopodito alcançando o ângulo antero externo do mero; flagelo multiarticulado bem desenvolvido.

Palpo tri-articulado, afilado-se progressivamente distalmente. Maxilípedes 2, 1, com exopoditos e flagelos bem desenvolvidos. Maxílula, maxila, como figurados. Mandíbula com palpo tri-articulado (Figura 14).

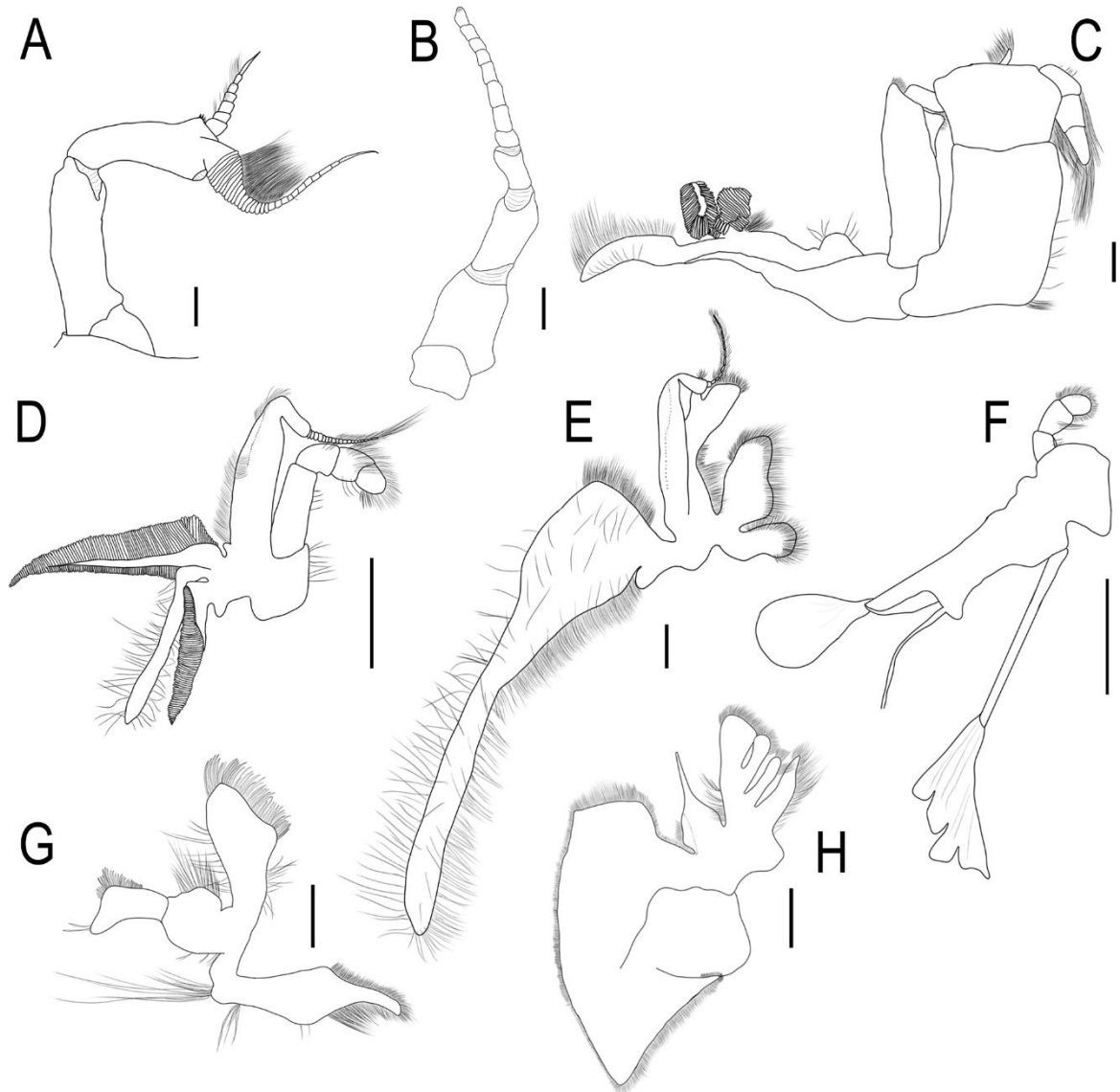


Figura 14. A–H, *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). A, B, C, Antênula, antena direita e terceiro maxilípede, respectivamente (MZUSP 39338). D, Segundo maxilípede (MZUSP 16942) E, Primeiro maxilípede (MZUSP 39340). F, Mandíbula direita (MZUSP 16942). G, H, Maxílula e maxila direitas, respectivamente (MZUSP 39340).

Quelípodos fortemente heteroquelos. Carpo com superfície dorsal lisa, punctada; margem interna protraída em forte lobo estridulatório triangular, terminando dente rombudo. Própodo massivo, liso, punctado. Dedos fortes, negros, margens cortantes aproximadamente lisas; dedo fixo com dente massivo, arredondado.

Pereópodes subiguais, aumentando em comprimento do primeiro ao terceiro. Primeiro pereópode com tubérculo distal inconspícuo sobre a margem interna do carpo; dátilos pouco mais longos do que os respectivos própodos, providos de cerdas simples, sulcados dorsalmente e lateralmente. própodos do terceiro e quarto pereópodes distintamente sulcados.

Pléon com 6 segmentos e telson livres e em ambos os sexos (Figure 15). Primeiro e segundo gonópodes masculinos como figurados (Figura 16).

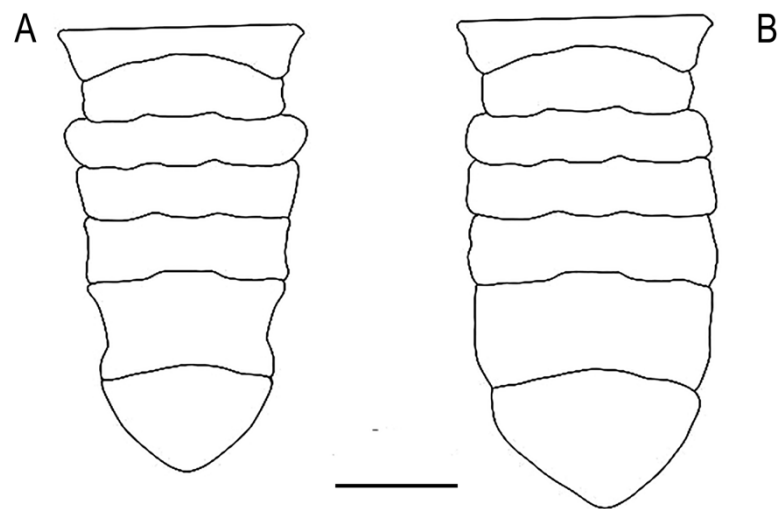


Figure 15. *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). A, Pléon macho (MZUSP 39338). B, Pléon fêmea (MZUSP 39404). Escala: 5 mm.

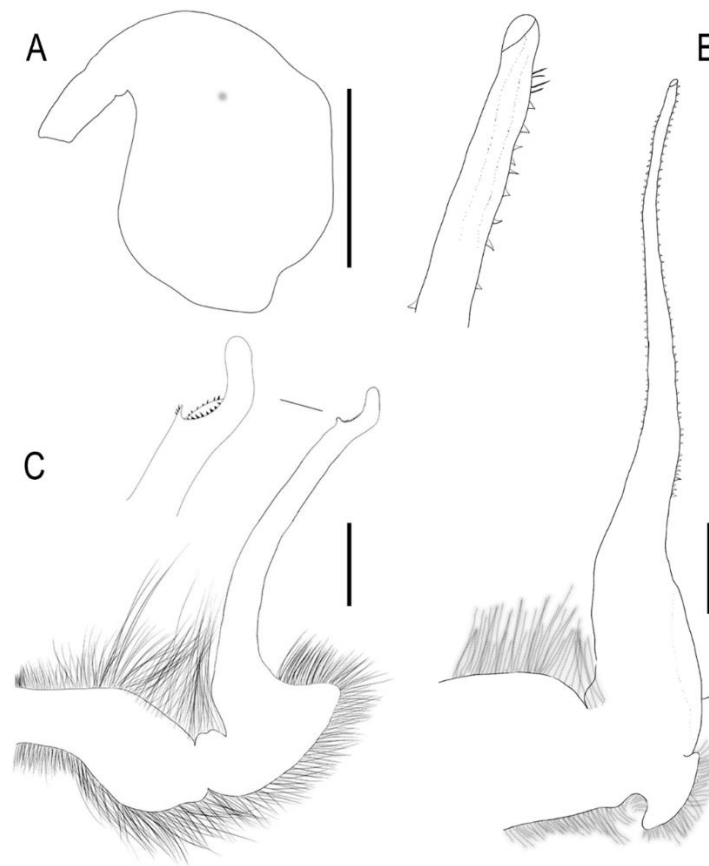


Figura 16. *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). A, Pênis. B, Primeiro gonópodo. C, segundo gonópodo (MZUSP 39338). Escalas: A, 0.5 mm. B, 1 mm. C, 0.25 mm.

Observações. Manning & Holthuis (1981) reconheceram três espécies de *Euryozius* no Atlântico com base na combinação de características envolvendo o tamanho da carapaça (comprimento da carapaça x largura da carapaça), o comprimento relativo do terceiro e quarto pereópodes e o padrão de coloração dos pereópodes.

O material proveniente de Cabo Verde disponível para Manning & Holthuis (1981) inclui exemplares pequenos (medida de um dos síntipos: 8 x 12 mm) e grandes com 30 x 47 mm (*viz.* Guinot 1968c), à exemplo dos exemplares provenientes dos Açores (25,8 x 38,5 mm) e os síntipos de *P. mellissii* de Ascensão e Santa Helena (25 x 38 mm e 35.5 x 59 mm). Todavia, dentre os 33 exemplares oriundos de Annobon (Golfo da Guiné), nenhum excede 10 x 16 mm e adultos são encontrados a partir de 7 x 11 mm (Manning & Holthuis 1981).

Segundo A. Milne-Edwards (1869: 378), no material tipo de *Euryozius bouvieri* (como *Xantho bouvieri*) “Les pattes ambulatoires sont grêles et remarquables par les dimensions de celles de la quatrième paire qui dépasse les autres de toute la longueur du doigt qui lui-même est très développé.”. Entretanto, Manning & Holthuis (1981) notaram que no material de

Annobon o quarto pereópode excede o terceiro em comprimento por no máximo metade do comprimento do dátilo e não por todo o comprimento do dátilo como mencionado por A. Milne-Edwards para o material do Cabo Verde.

A. Milne-Edwards (1869: 378) refere-se aos exemplares de Cabo Verde como sendo vermelhos com os dedos dos quelípodes pretos. Barrois (1888: 12; fig. 1) ilustrou e descreveu em muito mais detalhes o seu *Ozius edwardsi* (sinônimo júnior de *E. bouvieri*): “... d’un beau rouge orangé, légèrement teinté de jaune en arrière; les pattes ravisseuses sont de même teinte que la carapace, sauf les doigts qui sont d’un noir intense, tandis que les pattes ambulatoires sont d’une nuance plus claire et plus rosée.”.

Manning & Holthuis (1981) observaram que nenhum dos dois autores mencionou a existência de bandas brancas nos pereópodes e que Barrois (1888: fig. 1) ilustrou *O. edwardsi* com pereópodes uniformemente vermelhos (Figura 17A). Similarmente, *Euryozius camachoi* Ng & Liao, 2002, espécie Filipina, possui pereópodes uniformemente vermelhos, sugerindo que há de fato, diferença de cor entre pelo menos algumas espécies (Figura 17C). Em contraste, em todos os exemplares de Ascensão os pereópodes são providos de bandas vermelhas e brancas (Manning & Holthuis 1981), assim como um exemplar de São Tomé ilustrado por Ng *et al.* (2008) (Figura 17B). Holthuis (1980), ao descrever em detalhes a coloração da jovem fêmea de São e Pedro e São Paulo, referiu-se aos pereópodes com bandas vermelhas e claras: “The walking legs are slightly lighter orange than the carapace and chelipeds; carpus, propodus and dactylus bear a lighter ring distally...”.



Figura 17. A, *Ozius edwardsi* Barrois, 1888, sinônimo mais recente de *E. bouvieri* (A. Milne-Edwards, 1869). B, *Euryozius camachoi* Ng & Liao, 2002, Filipinas. C, *Euryozius pagalu* Manning & Holthuis, 1981, São Tomé. B, C, segundo Ng *et al.* (2008).

Assim, com base na combinação de tamanho da carapaça, comprimento relativo do terceiro e quarto pereópodes e no padrão de coloração dos pereópodes, Manning & Holthuis (1981) sugeriram a existência de três espécies, como segue: *Euryozius sanguineus* (grande tamanho, pereópodes com bandas vermelhas e claras, carapaça com dois dentes obsoletos e frente 4-lobada. Holthuis (1980) e Manning & Holthuis (1981) não fizeram menção ao comprimento relativo do terceiro e quarto pereópodes nessa espécie); *Euryozius bouvieri* (grande tamanho, pereópodes uniformemente avermelhados, quarto pereópode excedendo o terceiro em comprimento por todo o comprimento do dátilo) e *E. pagalu* (pequeno tamanho, pereópodes com bandas vermelhas e claras; quarto pereópode excedendo o terceiro em comprimento por no máximo metade do comprimento do dátilo) (Figura 18).

Manning & Holthuis (1981) consideram que *E. sanguineus* e *E. pagalu* diferem ainda quanto a relação entre a largura frontorbital comparativamente à largura da carapaça. No maior macho de Ascensão (17,6 x 27,8 mm) essa relação foi de 0,45x e de 0,37x na fêmea de Santa Helena (42,5 x 72,1). No menor macho de Ascensão (de tamanho comparável a *E. pagalu* de Annobon) a relação largura frontorbital x largura da carapaça foi 0,67x; em *E. pagalu* a relação variou entre 0,54x e 0,7x.

Adicionalmente, os lobos frontais são menos sinuosos e a carapaça e superfície dorsal do carpo e própodo da quela mais rugosas em *E. pagalu*; o terceiro pereópode sobrepassa o segundo por 1/3 a 1/2 do seu comprimento em *E. pagalu* e 2/3 em *E. sanguineus*; o tubérculo bem reconhecível na superfície distal interna do carpo do segundo e terceiro pereópodes em *E. sanguineus* é inconspícuo ou não detectável em *E. pagalu* (Figura 18).

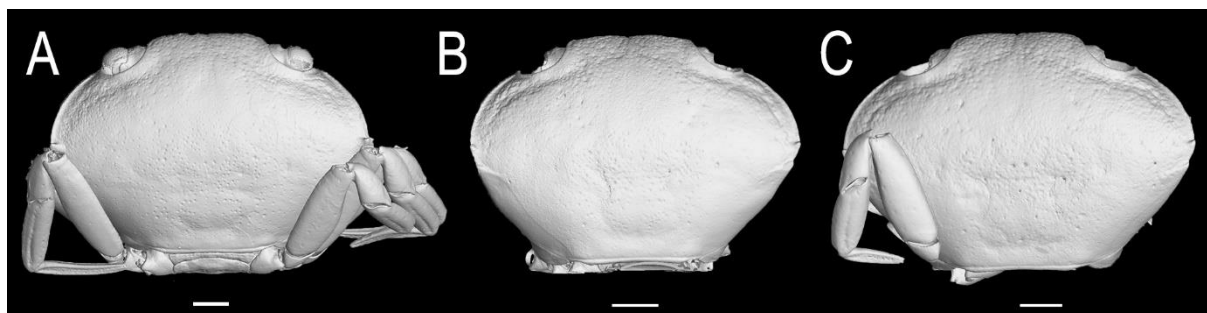


Figura 18. A, *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771), Pará, fêmea jovem (MOUFPE 29). B, C. *Euryozius pagalu* Manning & Holthuis, 1981, macho e fêmea, respectivamente, São Tomé (MZUSP 9629). Escalas: 1 mm.

Manning & Chace (1990) limitaram a ocorrência de *E. sanguineus* à Ascensão, Santa Helena e São Pedro e São Paulo, e não discutiram a identidade dos espécimes provenientes do litoral brasileiro (atribuídos por Barreto *et al.* 1993 à *E. bouvieri*).

Coelho Filho & Coelho (1995) apesar de disporem de material do litoral brasileiro (Pará, Maranhão e Ceará; mas não São Pedro e São Paulo) e de São Tomé (Golfo da Guiné), sem de fato discutir o assunto opinaram que “... as pequenas diferenças assinaladas [por Manning & Holthuis 1981] são comuns em espécies tropicais e encontradas em muitos outros grupos taxonômicos.” e então concluíram que *E. bouvieri* e *E. pagalu* são sinônimas mais recentes de *E. sanguineus*. Gonzáles (2018) aceitou a validade de *E. bouvieri* ao listar essa espécie para a fauna de Cabo Verde.

Para o presente trabalho, nós dispusemos de vários exemplares machos e fêmeas de tamanhos variados (maior macho: 25 x 40 mm, MZUSP 39338; maior fêmea: 26,5 x 43 mm, MZUSP 39337) de São Pedro e São Paulo, de jovens do litoral brasileiro e de um macho e fêmea jovens de São Tomé (Golfo da Guiné). Em adultos e jovens de São Pedro e São Paulo, a superfície dorsal da carapaça (ligeiramente mais clara posteriormente), quelípodes e pereópodes são vermelho alaranjados; carpo, própodo e dátilo dos pereópodes marcados distalmente por uma banda clara. Os pequenos *spots* esbranquiçados mencionados por Holthuis (1980) são bem visíveis na carapaça e quelípodes. Pela coloração se assemelham à *E. sanguineus* de Ascensão e à *E. pagalu* do Golfo da Guiné. Nos adultos de São Pedro e São Paulo a fronte é fendida em “V” bem marcado, formando 2 lobos distintos (4 lobos se contados os lobos orbitais internos). Já todos os jovens machos e fêmeas de São Pedro e São Paulo, do litoral do Brasil e de São Tomé (MZUSP 9629) compartilham a fronte inconspicuamente fendida, separada em dois lobos pouco distintos.

Em adultos e jovens de São Pedro e São Paulo e jovens do litoral brasileiro o quarto pereópode excede o terceiro em pouco menos do comprimento do dátilo, mas nunca por todo o comprimento do dátilo. Na realidade, o própodo (principalmente) e dátilo do quarto pereópode excedem em comprimento o própodo e dátilo do terceiro pereópode. O macho e fêmea de São Tomé têm os pereópodes desarticulados, mas as proporções são essencialmente as mesmas.

Aparentemente, a relação largura frontorbital/ largura da carapaça varia entre adultos e jovens. O macho e fêmea de São Pedro e São Paulo (MZUSP 39338 e MZUSP 39337, respectivamente) essa relação (0,41x e 0,39x, respectivamente) é semelhante aos maiores exemplares de Ascensão. Entretanto, em um jovem macho (6,8 x 10 mm) de São Pedro e São Paulo a relação largura frontorbital/ largura da carapaça se assemelha àquela encontrada em jovens do banco Canopus (7,3 x 10,6 mm) (macho 0,68x) e Golfo da Guiné (macho 5,5 x 8,6 mm; fêmea 5,7 x 8,6 mm) (0,67x e 0,64x, respectivamente).

Segundo Manning & Holthuis (1981), em *Euryozius pagalu* a face anterodorsal da carapaça é mais rugosa e a face dorsal do carpo do quelípodo irregular (Figura 19).

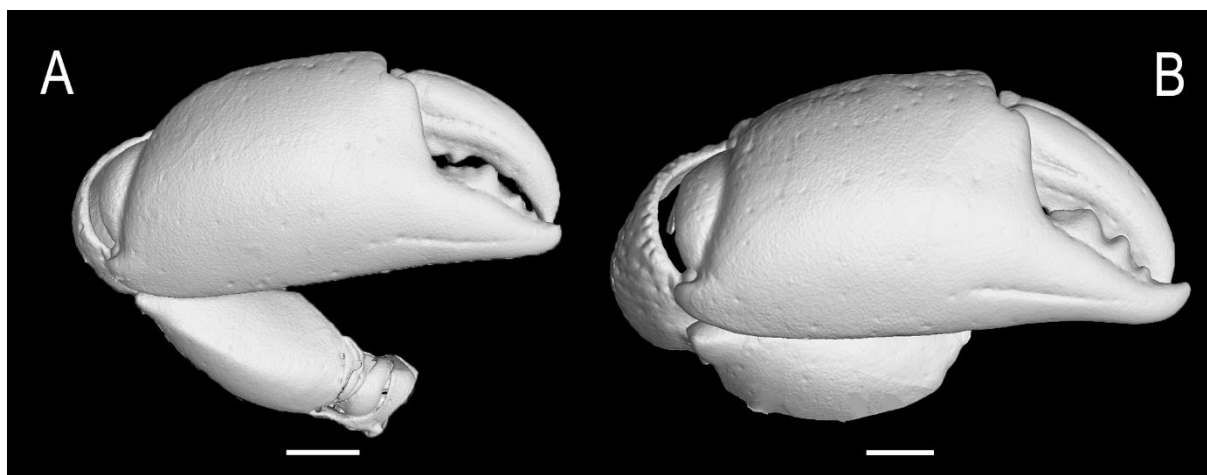


Figura 19. A, B, Quelípodo direito. A, *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771) Arquipélago São Pedro e São Paulo (MZUSP 39404). B, *Euryozius pagalu* Manning & Holthuis, 1981, São Tomé, fêmea (MZUSP 9629). Escalas: A. 1mm. B 0.8mm

Comparativamente, os exemplares de São Pedro e São Paulo têm as regiões anterodorsal da carapaça e dorsal do carpo do quelípodo distintamente mais lisas.

Manning & Chace (1990) esclareceram que a autoria de *E. sanguineus* deve ser atribuída a Linnaeus (1771). Manning & Holthuis (1981: 124, 128) atribuíram erroneamente essa espécie à Linnaeus (1767).

Análise filogenética. Foram amplificados e sequenciados os genes mitocondriais COI e 16S, obtidos a partir de material proveniente do Arquipélago São Pedro e São Paulo e do litoral brasileiro (Banco Canopus). À despeito das diversas tentativas não foi possível obter sequências para os demais exemplares do litoral brasileiro (Pará, Maranhão, Ceará e Rio Grande do Norte), São Tomé (Golfo da Guiné) (Anexo II).

Não houve divergência genética entre os exemplares oriundos de São Pedro e São Paulo e do Banco Canopus, restando certo se tratarem da mesma espécie (Figura 20). Esses resultados implicam (ainda que na ausência de dados genéticos para os exemplares do Pará, Maranhão, Rio Grande do Norte e Ceará) que os exemplares do Brasil devem, de fato, serem atribuídos à *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771). Continua em suspenso, em termos de evidências moleculares, a validade de *Euryozius bouvieri* e *E. pagalu*.

A inclusão de *Euryozius camachoi* Ng & Liao, 2002 e do também Pseudoziidae *Pseudozius caystrus* (Adams & White, 1849) sugere, ainda que preliminarmente, o monofiletismo de *Euryozius* e sua posição em Pseudoziidae. *Euryozius*, usualmente posicionado em Xanthidae (e.g. Manning & Holthuis, 1981; Manning & Chace 1990; Coelho Filho & Coelho 1995) ou ainda Manippidae (Guinot 1968c; 1978), foi transferido para Pseudoziidae por Ng & Liao (2002) com base na aparência geral da carapaça; macho com 6 segmentos pleonais mais telson livremente articulados; primeiro gonópodo masculino (G1) relativamente delgado, ligeiramente sinuoso, simples com cerdas spiniformes e segundo gonópodo 0,2 a 0,3 vezes o comprimento do G1.

Guinot (1967) mencionou que *Euryozius* (entre outros Pseudoziidae) é próximo à *Carpilius* Desmarest, 1823 (Carpiliidae). A inclusão de duas espécies de *Carpilius* nas análises sugere a proximidade entre Pseudoziidae e Carpiliidae (Figura 20).

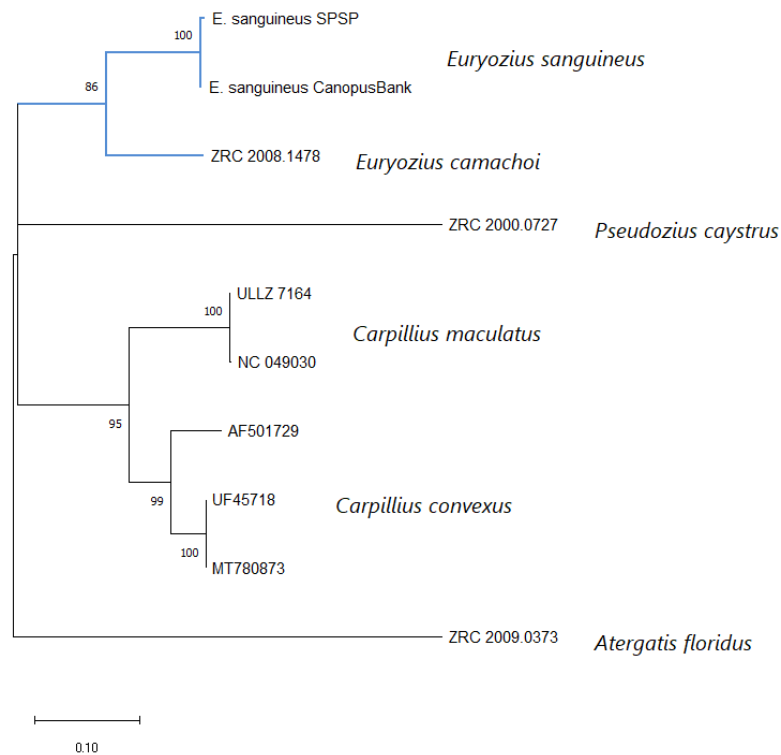


Figura 20. A, B, Filogenia Molecular mostrando as relações entre Pseudoziidae, clado azul e Carpiliidae. Análise concatenada dos genes mitocondriais COI e 16S usando maximum likelihood com valores de bootstrap maiores que 50% apresentados.

Tabela 5 Matriz de distâncias genética entre espécies de *Euryozius* e gêneros aliados, usando seqüências do gene mitocondrial COI (p-distance).

	<i>E. sanguineus</i> MZ39341	<i>E. sanguineus</i> MZ39338	<i>E. camachoi</i>	<i>Carpilius convexus</i> MT780873	<i>C. convexus</i> MW278155	<i>C. maculatus</i> HM638026	<i>Pseudozius caystrus</i> ZRC 2000.0727	<i>Atergatis floridus</i> ZRC 2009.0373	<i>A. floridus</i> DQ889081
<i>E. sanguineus</i> MZUSP 39341									
<i>E. sanguineus</i> MZUSP 39338	0,002								
<i>E. camachoi</i>	0,129	0,127							
<i>Carpilius convexus</i> MT780873	0,149	0,151	0,162						
<i>C. convexus</i> MW278155	0,149	0,151	0,162	0,000					
<i>C. maculatus</i> HM638026	0,151	0,153	0,164	0,103	0,103				
<i>Pseudozius caystrus</i> ZRC_2000.0727	0,183	0,185	0,169	0,190	0,190	0,192			
<i>Atergatis floridus</i> ZRC 2009.0373	0,172	0,170	0,178	0,165	0,165	0,163	0,199		
<i>A. floridus</i> DQ889081	0,172	0,170	0,174	0,170	0,170	0,167	0,193	0,005	

Tabela 6. Matriz de distâncias genética entre espécies de *Euryozius* e gêneros aliados, usando sequências do gene mitocondrial 16S (p-distance).

	<i>E. sanguineus</i> MZ39341	<i>E. sanguineus</i> MZ39340	<i>E. sanguineus</i> MZ39228	<i>E. sanguineus</i> MZ39339	<i>E. sanguineus</i> MZ39241	<i>E. camachoi</i>	<i>Carpilius maculatus</i>	<i>Carpilius convexus</i>	<i>Atergatis floridus</i>	<i>P. caystrus</i>
<i>Euryozius sanguineus</i> MZ39341										
<i>E. sanguineus</i> MZ39340	0,00									
<i>E. sanguineus</i> MZ39228	0,00	0,00								
<i>E. sanguineus</i> MZ39339	0,00	0,00	0,00							
<i>E. sanguineus</i> MZ39241	0,00	0,00	0,00	0,00						
<i>Euryozius camachoi</i>	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09					
<i>Carpilius maculatus</i>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13				
<i>Carpilius convexus</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13	0,06			
<i>Atergatis floridus</i>	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,17	0,18	0,17		
<i>Pseudozizus caystrus</i>	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,19	0,22	0,23	0,22	

Comentários zoogeográficos. Durante muitos anos *Euryozius bouvieri* foi a única espécie do gênero tratada como válida, de modo que a sua distribuição no oceano Atlântico se inscrevia no padrão anfi-Atlântico (A. Milne-Edwards 1880; Rathbun 1918; 1930; 1937; Ekman 1953; Manning & Holthuis 1981; Edwards & Lubbock 1983; Wirtz *et al.* 1988; Manning & Chace 1990; Melo 1996; Anker *et al.* 2016; Tavares *et al.* 2017).

Manning & Holthuis (1981) esclareceram que *Euryozius* comporta duas espécies adicionais, *E. sanguineus* (Atlântico Central e litoral brasileiro) e *E. pagalu* (Golfo da Guiné) (Figura 18). Uma vez aceita a validade de *E. bouvieri* e *E. pagalu*, ou seja, admitindo-se que o padrão de distribuição de *E. sanguineus* não é o resultado artificial de conhecimento taxonômico insuficiente, resta que a distribuição de *E. sanguineus*, restrita às ilhas oceânicas Ascensão e São Pedro e São Paulo e ao litoral brasileiro é pouco comum. Possivelmente, a ocorrência de *E. sanguineus* na costa brasileira seja a consequência do transporte de larvas de leste para oeste pela corrente Sul Equatorial (Figura 21 e 10). Como se sabe, a dominância do fluxo da corrente transatlântica Sul Equatorial (Colling 2001), traz águas tropicais quentes da costa atlântica africana facilitando, portanto, a migração de espécies do Atlântico oriental para as costas Americanas– litoral brasileiro inclusive (Figura 21).

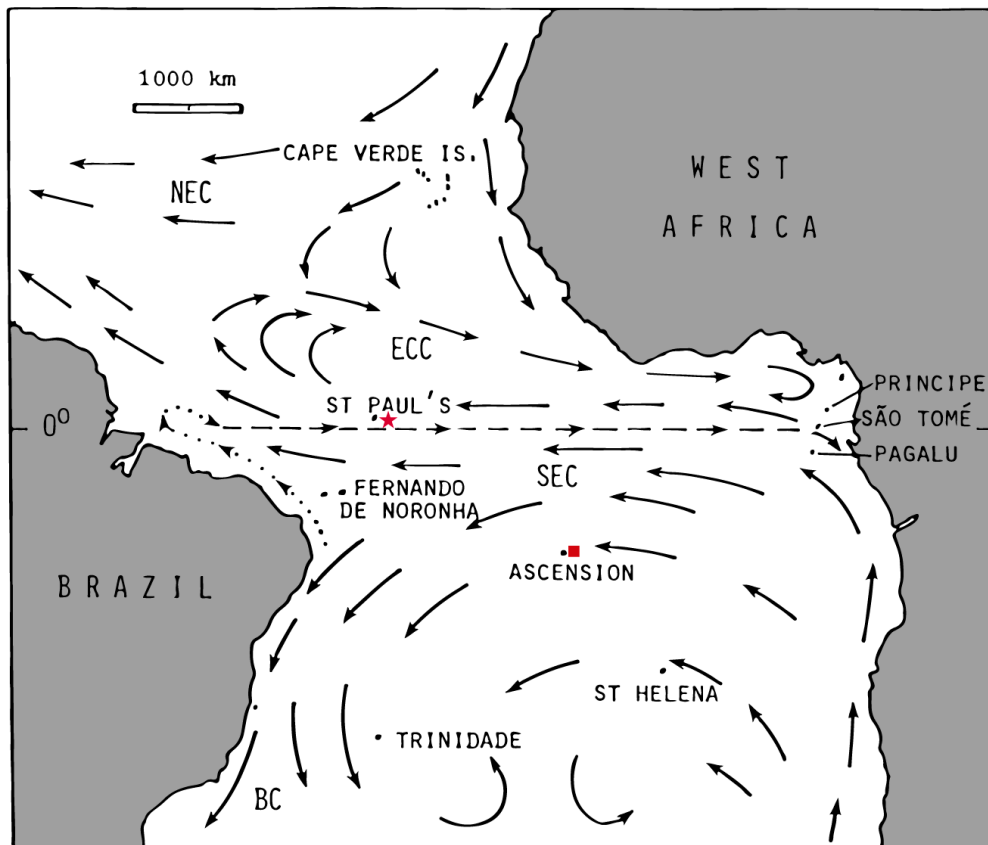


Figura 21. Principais correntes rasas na região tropical do oceano Atlântico central e sul. SEC, Corrente Sul Equatorial. NEC, Corrente Equatorial Norte, ECC, Contracorrente Equatorial. BC, Corrente Brasileira (baseado em Edwards & Lubbock 1983).

A população de *E. sanguineus* em São Pedro e São Paulo é formada por jovens e adultos, incluindo fêmeas ovígeras, o que permite concluir que aquela população insular seja autossustentável, sendo, portanto, independente do aporte de larvas provenientes de Ascensão. As amostras de *E. sanguineus* do litoral brasileiro são constituídas essencialmente de jovens machos e fêmeas. No momento, é prematuro depreender que a presença de *E. sanguineus* do litoral brasileiro é efêmera, sendo tão somente o resultado de eventos isolados de transporte de larvas de leste a oeste pela corrente Sul Equatorial.

Considerações finais

Atualmente se tem conhecimento da ocorrência de três espécies de *Euryozius* Miers, 1886 no Atlântico sendo: *Euryozius sanguineus* (Linnaeus, 1771) originalmente descrita da Ilha Ascensão, no Atlântico Central, *Euryozius bouvieri* (A. Milne-Edwards, 1869) (Açores, Madeira

e Cabo Verde) e *E. pagalu* Manning & Holthuis, 1981 (Golfo da Guiné). Barreto (1991) considerou que o material de *Euryozius* proveniente do litoral brasileiro pertence a *E. bouvieri*, então considerada como espécie de distribuição anfi-Atlântica. Coelho Filho & Coelho (1995) sinonimizaram *E. bouvieri* e *E. pagalu* à *E. sanguineus*. E Melo (1996) considerou *E. sanguineus* como espécie anfi-Atlântica. Evidências morfológicas e moleculares (genes mitocondriais COI e 16S) obtidas pelo presente estudo mostram que o material de São Pedro e São Paulo e do litoral brasileiro não diferem, indicando um padrão de distribuição amplo. Entretanto, os genes mitocondriais COI e 16S de *E. bouvieri* e *E. pagalu* não foram amplificadas com sucesso pois possivelmente o DNA está degradado. Os espécimes de Ascensão e Santa Helena serão incorporados a esse estudo oportunamente.

Referências

- Anker, A., Tavares, M. & Mendonça, J.B. 2016. Alpheid shrimps (Decapoda: Caridea) of the Trindade & Martin Vaz Archipelago, off Brazil, with new records, description of a new species of *Synalpheus* and remarks on zoogeographical patterns in the oceanic islands of the tropical southern Atlantic. *Zootaxa*, 4138(1), 1–58.
- Barreto, A.V., Coelho, P.A. & Melo, G.A.S. de 1993. Ocorrência de *Acidops cessaci* (A. Milne Edwards, 1878) (Crustacea, Decapoda, Brachyura) no Brasil. *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco*, 22, 271–279 [1991]
- Barrois, Th. 1888. *Catalogue des Crustacés marins recueillis aux Açores durant les mois d'Août et de Septembre 1887*. 110 pages, 8 Figuras, 4 plates. Lille.
- Coelho Filho, P.A. & Coelho, P.A. 1995. Estudo do gênero *Euryozius* Miers, 1886 (Crustacea, Decapoda, Brachyura) no oceano Atlântico. *Trabalhos oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco*, 23, 143–148.
- Colling, A. 2001. *Ocean circulation*. 2nd Edition. Butterworth-Heinemann, Oxford, 286 pp.
- Collins, R. A., Boykin, L. M., Cruickshank, R. H., & Armstrong, K. F. (2012). Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(3), 457-465.
- Davie, P.J.F., Guinot, D. & Ng, P.K.L. 2015. Systematics and classification of Brachyura. In: Castro, P., Davie, P.J.F., Guinot, D., Schram, F.R. & von Vaupel Klein, J.C. (Eds.), *Treatise on zoology – anatomy, taxonomy, biology, Decapoda: Brachyura* Vol. 9C-II. Part 2. Brill, Leiden, pp. 1049–1130.
- Edwards, A. & Lubbock, R. 1983. Marine zoogeography of St Paul's Rocks. *Journal of Biogeography*, 10, 65–72.
- Ekman, S. 1953. *Zoogeography of the Sea*. London, Sidgwick & Jackson, 417p.
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- González, J. 2018. Checklists of Crustacea Decapoda from the Canary and Cape Verde Islands, with an assessment of Macaronesian and Cape Verde biogeographic marine ecoregions. *Zootaxa*, 4413(3), 401–448.

- Guinot, D. 1967a. La faune carcinologique (Crustacea Brachyura) de l'océan Indien occidental et de la Mer Rouge: Catalogue, remarques biogéographiques et bibliographiques. In: Réunion de Spécialistes C.S.A. sur la Crustacés (C.S.A. Specialist Meeting on Crustaceans), Zanzibar, 19-26 IV 1964. Organization of African Unity Publication, 96:235-352. [Also published with same pagination in *Memoires de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire*, 77.]
- Guinot, D. 1968c. Les Carpilinae: Recherches préliminaires sur les groupements naturels chez les Crustacés, Décapodes, Brachyours, VI. *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle* (Paris), series 2, 40(2):320-334, Figures 1-16, plates 1, 2.
- Guinot, D. 1977. Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés, Décapodes, Brachyours. *Comptes-rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences* (Paris), series D, 285, 1049–1052.
- Guinot, D.; Tavares, M. & Castro, P. 2013). Significance of the sexual openings and supplementary structures on the phylogeny of brachyuran crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura), with new nomina for higher-ranked podotreme taxa. *Zootaxa*, 3665(1), 1–414.
- Holthuis, L.B., Edwards, A.J. & Lubbock, H.R. 1980. The decapod and stomatopod Crustacea of St Paul's Rocks. *Zoologische Mededelingen*, 56(3), 27–51.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059-3066.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; *et al.* 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Linnaeus, C. 1767. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Edition 12, volume 1, part 2, pages 533-1327. Stockholm.

- Linnaeus, C. 1771. *Mantissa planJarum altera, Generum editionis VI. & Specierum editionis II*, volume 2p i-iv, 143-588. Holmiae.
- Miers, E.J. 1881. On a Collection of Crustacea made by Baron Hermann Maltzam (sic) at Goree Island, Senegambia. *Annals and Magazine of Natural History*, series 5, 8:204-220, 259-281, 364-377, plates 13-16.
- Miers, E.J. 1886. Report on the Brachyura Collected by H. M. S. *Challenger* during the Years 1873-1876. *Report on the Scientific Results of the Voyage of H. M. S. Challenger during the Years 1873-76, Zoology*, 17, xli + 362 pages, plates 1-29.
- Milne-Edwards, A. 1869. Description de quelques espèces nouvelles de Crustacés provenant du voyage de M. A. Bouvier aux Iles du Cap Vert. *Revue et Magasin de Zoologie*, 21, 350-355, 374-378, 409-412.
- Milne-Edwards, A. 1880 Études préliminaires sur les crustacés. *In* Reports on the Results of Dredging, under the Supervision of Alexander Agassiz, in the Gulf of Mexico, and in the Caribbean Sea, 1877, '78, '79, by the United States Coast Survey Steamer "Blake," Lieut.-Commander C D. Sigsbee, U.S.N., and Commander J. R. Bartlett, U.S.N., Commanding, VIII. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology, Harvard*, 8 (1), 1-68.
- Manning, R.B. & Holthuis, L.B. 1981. West African Brachyuran Crabs (Crustacea: Decapoda). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 306, 1-379.
- Manning, R.B. & Chace, F.A. Jr. 1990. Decapod and stomatopod Crustacea from Ascension Island, South Atlantic Ocean. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 503, 1-91.
- Melo, G.A.S. 1996. *Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do Litoral Brasileiro*. Editora, Plêiade, São Paulo, 604 pp.
- Nei, M., & Kumar, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press.
- Ng, P.K.L. & Liao, L.M. 2002. On a new species of *Euryozius* Miers, 1886 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Pseudoziidae) from the Philippines, with notes on the taxonomy of the genus. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 115(3), 585-593.
- Ng P.K.L.; Davie P.J.F. & Guinot D. 2008. *Systema Brachyurorum*: Part 1. An Annotated checklist of extant Brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 17, 1-286.
- Rathbun, M.J. 1918. The grapsoid crabs of America. *Bulletin of the United States National Museum*, 97, 1-461.

- Rathbun M. J. 1930. The Cancroid Crabs of America of the Families Euryalidae, Portunidae, Atelecyclidae, Cancridae and Xanthidae. *Bulletin of the United States National Museum Bulletin*, 152, 1– 609.
- Rathbun M.J. 1937. The oxystomatous and allied crabs of America. *United States National Museum Bulletin*, 166, 1–278.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Tavares, M.; Carvalho, L. & Mendonça, J.B. de 2017. Towards a review of the decapod Crustacea from the remote oceanic Archipelago of Trindade and Martin Vaz, South Atlantic Ocean: new records and notes on ecology and zoogeography. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 57(14), 157–176.
- Wirtz, P. 2004. Four amphi-Atlantic shrimps new for São Tomé and Príncipe (Eastern Central Atlantic). *Life and Marine Science*, 21(A), 83–85.
- Wirtz, P.; Müller, B. & Nahke, P. 1988. The Caribbean shrimp *Tuleariocaris neglecta* Chace 1969 found in association with *Diadema antillarum* at Madeira, and two new records of decapod crustaceans from the Cape Verde Islands. *Courier Forschungs Institut Senckenberg*, 105, 169–171.

APÊNDICES

APÊNDICE A

CAPÍTULO 1

Análise molecular

Escolha dos marcadores. No presente trabalho foram escolhidas para a amplificação as regiões COI (Folmer *et al.*, 1994) e 16S (Palumbi *et al.*, 2002) de indivíduos de *Acidops cessacii*. Pois os genes COI e 16S, são amplamente utilizados na distinção entre espécies estreitamente relacionadas de crustáceos.

Iniciadores selecionados para o estudo:

Iniciador	Sequência	Táxon	T°C	Tamanho do Fragmento (pb)
LCO1490/ HC02198	Forward: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG Reverse: TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Universal Metazoa	40-55	650
16sar- L/16sbr-H	Forward: CGCCTGTTTATCAAAAACAT Reverse: CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Universal Metazoa	45-55	500

Extração de DNA. O DNA foi extraído utilizando-se o kit comercial INVITROGEN PureLink Genomic DNA Kit seguindo o protocolo do fabricante adaptado, a partir de tecido muscular dos pereopodos. O tecido foi colocado em thermomixer a 56°C com tampão de digestão e Proteinase K de 1 a 4 horas até o material ser completamente lisado. Para remover qualquer material particulado há centrifugação por 3 minutos e transferência do sobrenadante para um novo e estéril microtubo. Posteriormente é adicionado RNase para lisar todo o RNA presente na amostra, juntamente ao tampão de lise e etanol 96-100% misturando com breve Vortex de 5 segundos. Todo o material lisado é transferido para tubos com coluna de sílica (PureLink Spin Column) e centrifugado com Wash Buffer (tampão de lavagem do material). E por fim é adicionado o tampão de eluição (PureLink Elution Buffer) à coluna onde a amostra fica incubada em temperatura ambiente por 1 hora e é estocada em freezer -20°C.

Em casos de material antigo e DNA degradado foi utilizado o método de extração com Fenol Clorofórmio, o uso de fenol-clorofórmio permite que contaminantes proteicos sejam desnaturados com partição dos mesmos na fase orgânica, enquanto ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. Primeiramente o material é lavado com H₂O ultrapura e etanol

70%, e colocado com solução TE em thermomixer a 37°C por 1 hora. Para a digestão das amostras foi adicionado EDTA; SDS; Tris – HCl; DTT; Proteinase K e as amostras colocadas em thermomixer a 56°C overnight (até 72 horas). Após a digestão é adicionado o fenol clorofórmio com álcool e a mistura é realizada por inversão por 5 minutos, após a homogeneização o material é centrifugado por 10 minutos para a separação da fase aquosa das amostras. Posteriormente etanol 96% é adicionado e os tubos ficam abertos em banho seco a 65°C por 20 minutos e o DNA é ressuspenso com H₂O ultrapura e armazenado em freezer -20°C.

Amplificação dos genes. As condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram otimizadas para as temperaturas de anelamento e para as concentrações de MgCl₂ e *Taq DNA Polymerase*.

Para o MgCl₂ foram testadas as seguintes concentrações: 1,5mM, 2,0 mM e 2,5mM; e para a *Taq DNA Polymerase* (5U/μl) as concentrações de teste variaram de 0,5μL a 0,6μL. Estes testes foram feitos para um volume final de solução de 20μL, contendo 2μL de DNA previamente extraído, 1x solução tampão (KCl), 0,25 mM de dNTPs, 2μL de cada iniciador a 10% (*forward e reverse*).

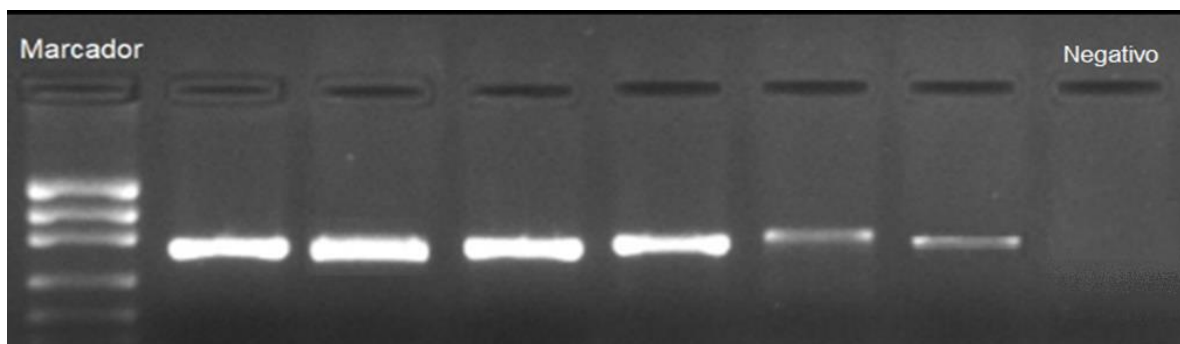
Em complemento quando houve a baixa concentração de DNA foi utilizada no mix para PCR Trehalose que é um potente potencializador, pois auxilia na redução da temperatura de fusão do DNA e estabilização térmica da *Taq polimerase* (Spiess *et al.*, 2004).

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador utilizando-se o seguinte ciclo termal: desnaturação inicial à 94°C por 5 min; seguido por 35 ciclos de anelamento: 94°C por 40s; temperatura de anelamento variando de 40°C a 55°C por 1 min; 72°C por 40s e extensão final 10 min à 72°C. Em casos de amostras com baixa concentração de DNA foi utilizada a técnica de *Touchdown* que consiste na redução gradual da temperatura de anelamento, onde: desnaturação inicial à 94°C por 5 min; seguido por 10 ciclos de anelamento: 94°C por 40s; temperatura de anelamento indo de 55°C para 40°C e 35 ciclos finais de 40°C; 72°C por 40s e extensão final 10 min à 72°C.

Os produtos de PCR foram primeiramente avaliados em eletroforese horizontal em gel de agarose 2% corados com SYBR® *Safe DNA Gel Stain Invitrogen*TM, por aproximadamente 1 hora, imerso em tampão TAE 1X, a uma corrente elétrica com voltagem em 120V. Os produtos

da amplificação foram identificados por meio da visualização das bandas em um fotodocumentador.

Resultado da amplificação por gel para o gene COI:



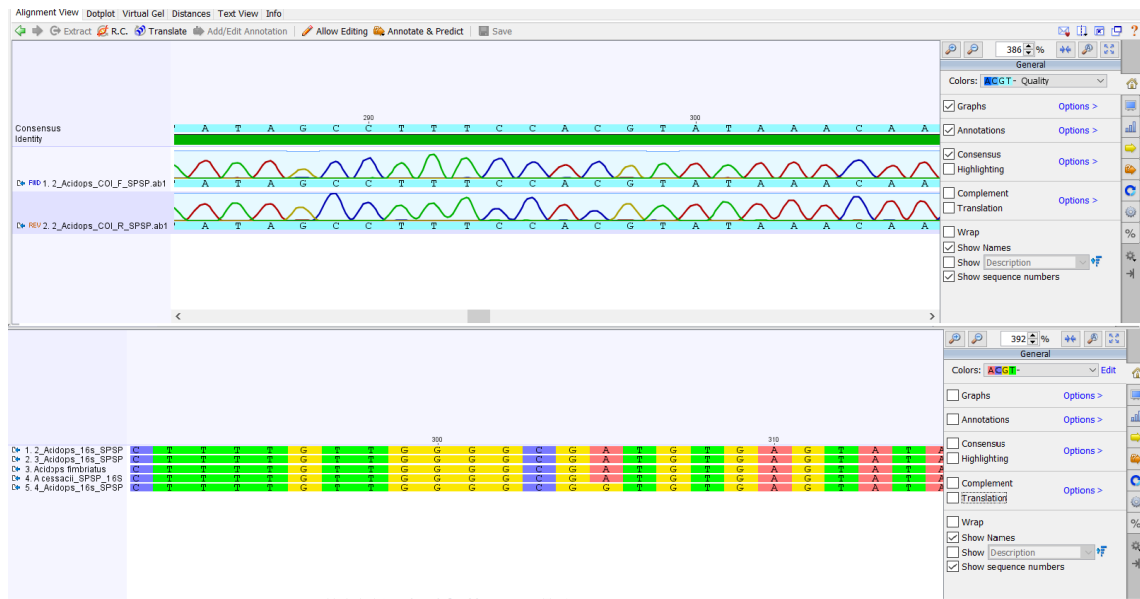
Purificação do produto de PCR. Foram considerados funcionais os fragmentos que apresentaram o tamanho (em número de pares de base) esperado, considerando também a qualidade e intensidade da banda observada no gel para envio para sequenciamento. As amostras selecionadas foram purificadas com EXO-SAP.

Sequenciamento do DNA. Após purificação, os produtos das reações de PCR foram enviados para sequenciamento na Humanizing Genomics Macrogen, na Coreia do Sul. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências de *Brachyura* do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), por meio do algoritmo BLAST (Zheng Zhang *et al.*, 2000). Todas as sequências foram analisadas pelo sequenciamento de ambas as fitas do DNA para confirmação do posicionamento taxonômico delas. A identificação das espécies foi determinada baseada no melhor valor de resultado obtido quanto à similaridade e identidade. Feito isso, foi realizado a edição das sequências, obtenção das sequências consenso e alinhamento no programa computacional Geneious 7.1.9 (Kearse *et al.* 2012). Complementarmente foram utilizados dados do Genbank para comparação.

Foram sequenciadas amostras de *Acidops cessacii* do Arquipélago de São e Pedro e São Paulo (MZUSP 39256; MZUSP 39262; MZUSP 39263; MZUSP 39265; MZUSP 39273) e Ascensão (USNM 252242). Não foi possível amplificar a amostra de tecido de *Acidops cessacii* proveniente do Ceará (MZUSP 24762). Mesmo realizando nessa amostra os métodos de extração com kit comercial e Fenol Clorofórmio, o gel de DNA total demonstrou ausência de banda no gel, o que é indício de DNA degradado. Então foi realizada a quantificação dessas

amostras por meio de fluorescência (Qubit® 2.0 Fluorometer) que permite a quantificação da amostra de DNA de forma mais sensível, resultando em <0.50 ng/ml sendo muito baixo. Em complemento pela baixa concentração de DNA foi utilizada no mix para PCR Trehalose e complementarmente a técnica de Touchdown para facilitar a amplificação, entretanto o resultado foi negativo reforçando a ideia de que o DNA dessa amostra está degradado.

Alinhamento e edição de seqüências. *Software* Geneious:



Análise de distância genética. O objetivo principal para a construção das árvores filogenéticas deste estudo foi identificar espécies e separá-las em grupos monofiléticos, sem fins de análises filogenéticas. Para tal, foram utilizados algoritmos simples que têm como base o método de análise Máxima Verossimilhança, por estabelecer uma única árvore parcimoniosa para fins de diferenciação.

APÊNDICE B

CAPÍTULO 2

Análise molecular

Escolha dos marcadores. No presente trabalho foram escolhidas para a amplificação as regiões COI (Folmer *et al.*, 1994) e 16S (Palumbi *et al.*, 2002) de indivíduos de *Euryozius sanguineus*. Pois os genes COI e 16S, são amplamente utilizados na distinção entre espécies estreitamente relacionadas de crustáceos.

Iniciadores selecionados para o estudo:

Iniciador	Sequência	Táxon	T°C	Tamanho do Fragmento (pb)
LCO1490/ HCO2198	Forward: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG Reverse: TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Universal Metazoa	40-55	650
16sar- L/16sbr-H	Forward: CGCCTGTTTATCAAAAACAT Reverse: CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Universal Metazoa	45-55	500

Extração de DNA. O DNA foi extraído utilizando-se o kit comercial INVITROGEN PureLink Genomic DNA Kit seguindo o protocolo do fabricante adaptado, a partir de tecido muscular dos pereopodos. O tecido foi colocado em thermomixer a 56°C com tampão de digestão e Proteinase K de 1 a 4 horas até o material ser completamente lisado. Para remover qualquer material particulado há centrifugação por 3 minutos e transferência do sobrenadante para um novo e estéril microtubo. Posteriormente é adicionado RNase para lisar todo o RNA presente na amostra, juntamente ao tampão de lise e etanol 96-100% misturando com breve Vortex de 5 segundos. Todo o material lisado é transferido para tubos com coluna de sílica (PureLink Spin Column) e centrifugado com Wash Buffer (tampão de lavagem do material). E por fim é adicionado o tampão de eluição (PureLink Elution Buffer) à coluna onde a amostra fica incubada em temperatura ambiente por 1 hora e é estocada em freezer -20°C.

Em casos de material antigo e DNA degradado foi utilizado o método de extração com Fenol Clorofórmio, o uso de fenol-clorofórmio permite que contaminantes proteicos sejam desnaturados com partição dos mesmos na fase orgânica, enquanto ácidos nucléicos permanecem na fase aquosa. Primeiramente o material é lavado com H₂O ultrapura e etanol 70%, e colocado com solução TE em thermomixer a 37°C por 1 hora. Para a digestão das

amostras foi adicionado EDTA; SDS; Tris – HCl; DTT; Proteinase K e as amostras colocadas em thermomixer a 56°C overnight (até 72 horas). Após a digestão é adicionado o fenol clorofórmio com álcool e a mistura é realizada por inversão por 5 minutos, após a homogeneização o material é centrifugado por 10 minutos para a separação da fase aquosa das amostras. Posteriormente etanol 96% é adicionado e os tubos ficam abertos em banho seco a 65°C por 20 minutos e o DNA é ressuspendido com H₂O ultrapura e armazenado em freezer -20°C.

Amplificação dos genes. As condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram otimizadas para as temperaturas de anelamento e para as concentrações de MgCl₂ e *Taq DNA Polymerase*.

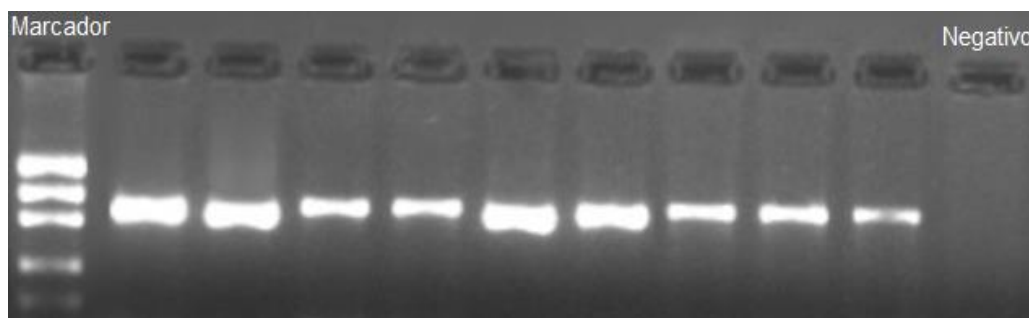
Para o MgCl₂ foram testadas as seguintes concentrações: 1,5mM, 2,0 mM e 2,5mM; e para a *Taq DNA Polymerase* (5U/μl) as concentrações de teste variaram de 0,5μL a 0,6μL. Estes testes foram feitos para um volume final de solução de 20μL, contendo 2μL de DNA previamente extraído, 1x solução tampão (KCl), 0,25 mM de dNTPs, 2μL de cada iniciador a 10% (*forward e reverse*).

Em complemento quando houve a baixa concentração de DNA foi utilizada no mix para PCR Trehalose que é um potente potencializador, pois auxilia na redução da temperatura de fusão do DNA e estabilização térmica da *Taq polimerase* (Spiess *et al.*, 2004).

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador utilizando-se o seguinte ciclo termal: desnaturação inicial à 94°C por 5 min; seguido por 35 ciclos de anelamento: 94°C por 40s; temperatura de anelamento variando de 40°C a 55°C por 1 min; 72°C por 40s e extensão final 10 min à 72°C. Em casos de amostras com baixa concentração de DNA foi utilizada a técnica de *Touchdown* que consiste na redução gradual da temperatura de anelamento, onde: desnaturação inicial à 94°C por 5 min; seguido por 10 ciclos de anelamento: 94°C por 40s; temperatura de anelamento indo de 55°C para 40°C e 35 ciclos finais de 40°C; 72°C por 40s e extensão final 10 min à 72°C.

Os produtos de PCR foram primeiramente avaliados em eletroforese horizontal em gel de agarose 2% corados com *SYBR® Safe DNA Gel Stain Invitrogen™*, por aproximadamente 1 hora, imerso em tampão TAE 1X, a uma corrente elétrica com voltagem em 120V. Os produtos da amplificação foram identificados por meio da visualização das bandas em um fotodocumentador.

Resultado da amplificação por gel para o gene COI:



Purificação do produto de PCR. Foram considerados funcionais os fragmentos que apresentaram o tamanho (em número de pares de base) esperado, considerando também a qualidade e intensidade da banda observada no gel para envio para sequenciamento. As amostras selecionadas foram purificadas com EXO-SAP.

Sequenciamento do DNA. Após purificação, os produtos das reações de PCR foram enviados para sequenciamento na Humanizing Genomics Macrogen, na Coreia do Sul. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências de *Brachyura* do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), por meio do algoritmo BLAST (Zheng Zhang *et al.*, 2000). Todas as sequências foram analisadas pelo sequenciamento de ambas as fitas do DNA para confirmação do posicionamento taxonômico delas. A identificação das espécies foi determinada baseada no melhor valor de resultado obtido quanto à similaridade e identidade. Feito isso, foi realizado a edição das sequências, obtenção das sequências consenso e alinhamento no programa computacional Geneious 7.1.9 (Kearse *et al.* 2012). Complementarmente foram utilizados dados do Genbank para comparação.

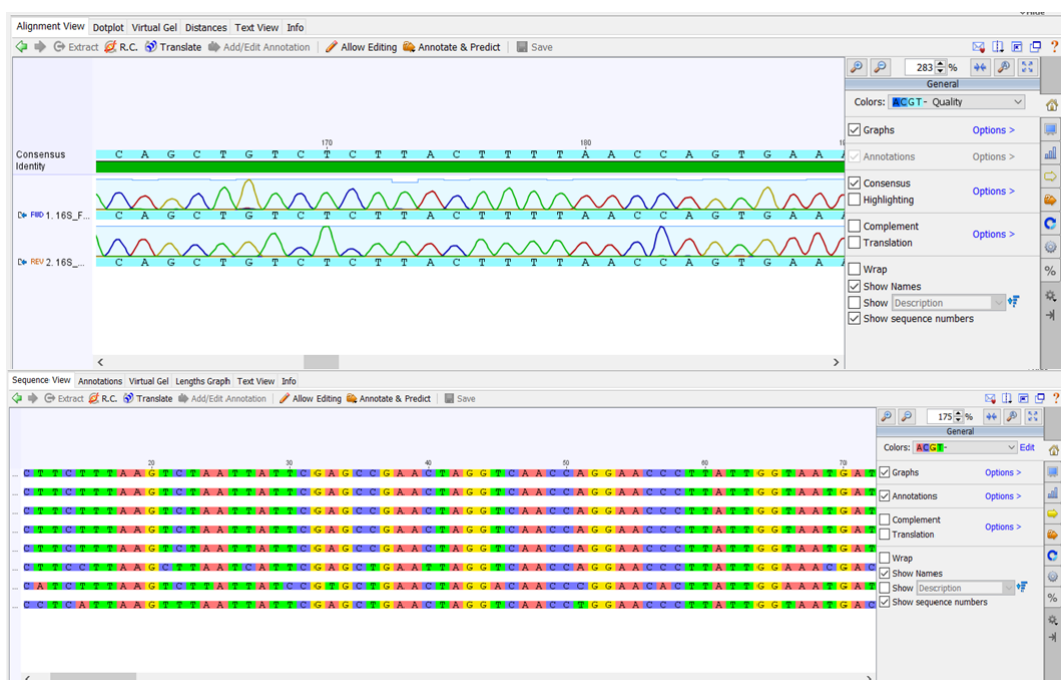
Foram sequenciadas amostras de *Euryozius sanguineus* do Arquipélago de São e Pedro e São Paulo (MZUSP 16942; MZUSP 39338; MZUSP 39339; MZUSP 39340) e Canopus Bank (MZUSP 39341). As amostras da costa brasileira de *Euryozius sanguineus* (MOUFPE 12758; MOUFPE 12762; MOUFPE 5921; MOUFPE 5922), *Euryozius bouvieri* (MOUFPE 43; MOUFPE 1728A; MOUFPE 29; MZUSP 4836) e do Golfo da Guiné de *Euryozius bouvieri* (MZUSP 9629) não amplificaram. Mesmo realizando nessas amostras os métodos de extração com kit comercial e Fenol Clorofórmio, o gel de DNA total demonstrou ausência de banda no gel e arraste vertical no gel, o que é indício de DNA degradado. Então foi realizada a quantificação dessas amostras por meio de fluorescência (Qubit® 2.0 Fluorometer) que permite a

quantificação da amostra de DNA de forma mais sensível, resultando em <0.50 ng/ml sendo muito baixo. Em complemento pela baixa concentração de DNA foi utilizada no mix para PCR Trehalose e complementarmente a técnica de Touchdown para facilitar a amplificação, entretanto o resultado foi negativo reforçando a ideia de que o DNA dessa amostra está degradado.

Resultado da corrida de DNA total com ausência de banda e arraste vertical:



Alinhamento e edição de seqüências. *Software* Geneious:



Análise de distância genética. O objetivo principal para a construção das árvores filogenéticas deste estudo foi identificar espécies e separá-las em grupos monofiléticos, sem fins de análises filogenéticas. Para tal, foram utilizados algoritmos simples que têm como base o método de análise Máxima Verossimilhança, por estabelecer uma única árvore parcimoniosa para fins de diferenciação.