

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE

BIANCA DOS SANTOS COSTA

**DIVERSIDADE DAS LINHAGENS DE SIRIS DO GÊNERO *Callinectes* (STIMPSON,
1860) NO GOLFÃO MARANHENSE A PARTIR DE MARCADORES DE DNA
MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

São Luís – MA

2025

BIANCA DOS SANTOS COSTA

DIVERSIDADE DAS LINHAGENS DE SIRIS DO GÊNERO *Callinectes* (STIMPSON, 1860) NO GOLFÃO MARANHENSE A PARTIR DE MARCADORES DE DNA MITOCONDRIAL E NUCLEAR

Documento de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Linha de Pesquisa: Ecologia e conservação da biodiversidade de ambientes aquáticos

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Carvalho Costa

São Luís – MA

2025

Costa, Bianca dos Santos

Diversidade das linhagens de siris do gênero *Callinectes* (STIMPSON, 1860) no
Golfão Maranhense a partir dos marcadores de DNA mitocondrial e nuclear./ Bianca
dos Santos Costa. – São Luís (MA), 2025.

...p.128

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade -PPGECB)
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, 2025.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Carvalho Costa.

1. Siris-azuis. 2. Filogenia Molecular. 3. Diversidade Críptica. 4.
Maranhão. 5. Canibalismo. I.Título.

Elaborado por Luciana de Araújo - CRB 13/445

BIANCA DOS SANTOS COSTA

DIVERSIDADE DAS LINHAGENS DE SIRIS DO GÊNERO *Callinectes* (STIMPSON, 1860) NO GOLFÃO MARANHENSE A PARTIR DE MARCADORES DE DNA MITOCONDRIAL E NUCLEAR

Documento de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre Ecologia e Conservação da Biodiversidade

Aprovado em: 27 / 06 / 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Fernando Carvalho Costa (orientador)
Doutor em Ecologia e Recursos Naturais
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente
 **MARINA BEZERRA FIGUEIREDO**
Data: 02/09/2025 20:37:40-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Marina Bezerra Figueiredo
Doutora em Biologia Ambiental
Universidade Estadual do Maranhão

Documento assinado digitalmente
 **FLAVIO DE ALMEIDA ALVES JUNIOR**
Data: 01/09/2025 15:17:45-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Flavio de Almeida Alves Junior
Doutor em Oceanografia
Universidade Federal Rural da Amazônia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ser meu abrigo seguro, por me conceder força para enfrentar os desafios com resiliência e determinação.

À minha família, que foi minha rede de apoio constante, incentivando meus estudos e acreditando sempre no meu potencial.

Ao meu pai, Eduardo, que esteve envolvido diretamente com essa pesquisa, muitas vezes renunciando aos seus dias de descanso para me acompanhar de perto nas coletas. Por não medir esforços, por sonhar comigo, por me ouvir, me aconselhar e ser o meu melhor amigo:

Te amo, pai!

À minha mãe, Rosa, por ser meu refúgio, por me ouvir, incentivar e sempre dar aquele choque de realidade (que só ela sabe fazer) nos meus momentos difíceis. Por não medir esforços, por sonhar comigo, por me ouvir, me aconselhar e ser a minha melhor amiga: Te amo, mãe!

À minha irmã, Gizely, por estar sempre ao meu lado, vibrando comigo a cada conquista, me incentivando e apoiando meus sonhos.

À minha sobrinha, Maria Eduarda, por ser a luz da minha vida, enchendo os meus dias de alegria e amor.

À minha vó, Adriana Costa, por ser uma inspiração para mim de força e sabedoria.

Aos meus queridos amigos/irmãos Marcos, Rayane, Alice, Victoria, Thauanny, Natália e Rafael, que sempre estiveram comigo, tornando os meus dias mais leves, me dando apoio, carinho e amor. Um agradecimento especial a Marcos Santos e Rayane Viegas, que estiveram ao meu lado nos momentos mais desafiadores, oferecendo suporte quando eu mais precisei.

Ao meu orientador, Luis Fernando Carvalho-Costa, por sua competência, conselhos, conhecimento compartilhado e incentivo.

À minha companheira de laboratório e amiga, Jaqueline Sá, por me ajudar nos momentos difíceis, me aconselhar e tornar essa jornada mais leve. Gratidão por tudo.

À Maira Gonçalves, que contribuiu com a identificação morfológica dos exemplares e com o trabalho.

Ao Dalton Prado que me ajudou com os métodos de delimitação.

Aos pescadores Josadaque (município de Paço do Lumiar), Leilson Nascimento (município de Tutóia), Rodrigo (município de Cururupu), Marciano (município de Raposa), Adedilson (município de Godofredo Viana) e Isac (comunidade do Cajueiro, São Luís), pela valiosa contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Fernando Luis Medina Mantelatto, que gentilmente cedeu amostras e contribuiu com este estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Biodiversidade Molecular da Universidade Federal do Maranhão. Em especial, à Michele Batista e Judá Bem-Hur.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Estadual do Maranhão.

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGem) da Universidade Federal do Maranhão.

À Coleção de Tecidos e DNA da fauna Maranhense (CoFauMa).

À Coleção Carcinológica da Universidade de São Paulo (USP).

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Minha eterna gratidão!!!

“Aprendi a ser o máximo possível de mim mesmo!”

Nelson Rodrigues

RESUMO

Os siris do gênero *Callinectes* Stimpson, 1860 são um grupo da fauna bentônica de importância ecológica e socioeconômica. O conhecimento das relações filogenéticas e da diversidade das suas linhagens é parâmetro importante para sua conservação e manejo. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever a diversidade de linhagens de siris do gênero *Callinectes* presentes no limite leste da costa Amazônica brasileira. A dissertação foi estruturada em três capítulos, sendo o capítulo I voltado diretamente à investigação do objetivo principal deste trabalho, e os demais capítulos contribuem com informações complementares e inéditas sobre canibalismo e primeira ocorrência de táxon na região. O capítulo I aborda a diversidade críptica em espécies de siris do gênero *Callinectes* na costa amazônica brasileira utilizando análises filogenéticas baseadas em quatro marcadores mitocondriais (Citocromo c oxidase subunidade I: COI; 12S rRNA: 12S; 16S rRNA: 16S; e Citocromo b: Cyt b) e um nuclear (ATP/ADP translocase). Também foram utilizados diferentes métodos de delimitação de espécies (ABGD, ASAP, PTP e GMYC) e redes de haplótipos para análises populacionais. Um total de 117 espécimes foram capturados, dos quais 50 foram incluídos nas análises: 25 identificados como *Callinectes bocourti* Milne-Edwards, 13 como *Callinectes danae* Smith, 1869, seis como *Callinectes exasperatus* Gerstaecker, 1856, três como *Callinectes ornatus* Ordway, 1863, e três identificados como *Callinectes marginatus* (A. Milne-Edwards, 1861). Desse material, 43 sequências para o DNA mitocondrial e quatro para o DNA nuclear foram produzidas, sendo algumas delas inéditas para o Brasil e a costa Amazônica brasileira. A maioria dos marcadores analisados conseguiu recuperar grupos monofiléticos para cada espécie, exceto para *C. marginatus* e *Callinectes larvatus* Ordway, 1863, que agruparam juntas em um único clado, sugerindo um processo recente de especiação. Os modelos de delimitação conseguiram recuperar MOTUs, na maioria dos casos, correspondentes às espécies e à identificação atribuída para as sequências extraídas dos bancos de dados. Os resultados mostraram que espécies da região do litoral leste Amazônico apresentam padrões genéticos inéditos e contrastantes. Em termos populacionais, as únicas espécies que apresentaram divergência foram *C. bocourti* e *C. ornatus*, sugerindo a possível existência de diversidade críptica nessas espécies. O capítulo II apresenta o primeiro registro de *C. marginatus* no Estado do Maranhão, com três indivíduos coletados na região leste do litoral Amazônico brasileiro, ampliando o mapa de ocorrência dessa espécie na costa brasileira. O capítulo III descreve, pela primeira vez, um registro de canibalismo entre dois indivíduos de *C. ornatus* em condições naturais, contribuindo com informações novas sobre o comportamento dessa espécie e sugerindo um possível mecanismo de regulação populacional. Nosso estudo não só preenche uma lacuna histórica sobre o conhecimento dos *Callinectes* no litoral amazônico, sendo o primeiro trabalho filogenético realizado na região, como também apresenta o primeiro registro de ocorrência de *C. marginatus* no Maranhão e a descrição inédita de canibalismo natural em *C. ornatus*. Essas informações são de extrema relevância, pois ampliam o conhecimento sobre a biodiversidade aquática da costa amazônica brasileira e servem de subsídio para medidas de manejo e conservação eficazes para este importante recurso pesqueiro.

Palavras-chaves: Siris-azuis; Filogenia Molecular; Diversidade Críptica; Maranhão, Canibalismo.

ABSTRACT

Crabs belonging to the genus *Callinectes* Stimpson, 1860 are an ecologically and socioeconomically significant group of benthic organisms. Knowledge of the phylogenetic relationships and diversity of their lineages is an important parameter for their conservation and management. Thus, the objective of this work was to describe the diversity of crab lineages of the genus *Callinectes* present at the eastern limit of the Brazilian Amazonian coast. The dissertation is structured into three chapters. Chapter I examines the primary objective of this study. In contrast, the other chapters provide supplementary and novel information on cannibalism and document the first occurrence of a taxon in the region. Chapter I addresses cryptic diversity in *Callinectes* swimming crab species on the Brazilian Amazon coast using phylogenetic analyses based on four mitochondrial markers (Cytochrome c oxidase subunit I: COI; 12S rRNA: 12S; 16S rRNA: 16S; and Cytochrome b: Cyt b) and one nuclear marker (ATP/ADP translocase). Different species delimitation methods (ABGD, ASAP, PTP, and GMYC) and haplotype networks were also used for population analyses. A total of 117 specimens were captured and identified, of which 50 were included in the analyses: 25 identified as *Callinectes bocourti* Milne-Edwards, 13 as *Callinectes danae* Smith, 1869, six as *Callinectes exasperatus* Gerstaecker, 1856, three as *Callinectes ornatus* Ordway, 1863, and three identified as *Callinectes marginatus* A. Milne-Edwards, 1861. A total of 43 sequences were produced for mitochondrial DNA and four for nuclear DNA, some of which are novel for Brazil and the Brazilian Amazonian coast. Most of the markers analyzed were able to recover monophyletic groups for each species, except for *C. marginatus* and *Callinectes larvatus* Ordway, 1863, which clustered into a single clade, suggesting a recent speciation process. The delimitation models were able to recover MOTUs, which in most cases corresponded to the species and the identification assigned to the sequences extracted from the databases. The results revealed that species from the east coast of the Amazon exhibit unique and contrasting genetic patterns. At the population level, the only species that showed divergence were *C. bocourti* and *C. ornatus*, suggesting the possible existence of cryptic diversity in these species. Chapter II presents the first record of *C. marginatus* in the state of Maranhão, with three individuals collected in the eastern region of the Brazilian Amazon coast, expanding the distribution map of this species along the Brazilian coast. Chapter III describes, for the first time, a case of cannibalism between two individuals of *C. ornatus* under natural conditions, providing new information on the behavior of this species and suggesting a possible mechanism of population regulation. Our study not only fills a historical gap in the knowledge of *Callinectes* on the Amazonian coast, being the first phylogenetic work carried out in the region, but also presents the first record of *C. marginatus* occurrence in Maranhão and the unprecedented description of natural cannibalism in *C. ornatus*. This information is of extreme relevance, as it expands the knowledge about the aquatic biodiversity of the Brazilian Amazonian coast and serves as a basis for effective management and conservation measures for this important fishery resource.

Keywords: Blue crabs; Molecular Phylogeny; Cryptic Diversity; Maranhão, Cannibalism,

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO I Diversidade críptica em espécies de siris do gênero <i>Callinectes</i> Stimpson, 1860) na Costa Amazônica brasileira	28
CAPÍTULO II Primeiro registro do siri-azul <i>Callinectes marginatus</i> (A. Milne-Edwards, 1861) para o Estado do Maranhão, Norte do Brasil	107
CAPÍTULO III Primeiro registro de canibalismo no caranguejo azul <i>Callinectes ornatus</i> Ordway, 1863 (Decapoda: Portunidae)	118

1 INTRODUÇÃO

A Costa Amazônica Brasileira estende-se do Amapá até o Maranhão, abrangendo dezenas de estuários, baías e reentrâncias, sendo fortemente influenciada pelo delta do Rio Amazonas (Rosa-Filho *et al.*, 2018). O litoral maranhense constitui parte importante da costa Amazônica brasileira, atuando como zona de transição entre duas importantes regiões biogeográficas: a Guianesa e a Brasileira (Coelho; Ramos-Porto, 1980), destacando-se por abrigar, sozinho, metade da extensa faixa de manguezais que compõe o maior cinturão contínuo desse ecossistema no mundo (Nascimento *et al.*, 2013). Trata-se de uma peça-chave na conservação da biodiversidade, sendo um habitat importante para uma variedade de crustáceos, incluindo siris do gênero *Callinectes* Stimpson, 1860.

O gênero *Callinectes* possui vasta distribuição geográfica com registros nos oceanos Índico, Pacífico e Atlântico (Williams, 1974). Atualmente, é representado por 15 espécies válidas (Robles *et al.*, 2024), das quais oito são encontradas ao longo da costa brasileira: *Callinectes affinis* Fausto-Filho, 1980, *Callinectes bocourti* A. Milne-Edwards, 1879, *Callinectes danae* Smith, 1869, *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Coelho *et al.*, 2008; Boos *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2016). Até o momento, quatro espécies foram registradas no litoral Amazônico maranhense: *C. bocourti*, *C. danae*, *C. exasperatus* e *C. ornatus* (Coelho; Ramos-Porto, 1980; Sousa *et al.*, 2015).

As espécies do gênero *Callinectes* são representantes da macrofauna bentônica e desempenham um papel ecológico vital como predadores ávidos e estabilizadores de teias tróficas (Mantelatto; Fransozo, 1999; Braga *et al.*, 2021; Farrell *et al.*, 2024). São conhecidas por apresentar comportamento agressivo e territorialista (Reichmuth *et al.*, 2010), geralmente associado à competição por alimentos (Clark *et al.*, 1999), que fica mais evidente em ambientes com alta densidade populacional e recursos alimentares limitados (Mansour; Lipcius, 1991; Clark *et al.*, 1999). Cenário ideal para o aumento de interações agonísticas entre conspecíficos, podendo ocasionar comportamento de canibalismo, fenômeno pouco documentado para espécies do gênero *Callinectes*.

Para além da importância ecológica, os *Callinectes* possuem valor socioeconômico, sendo componente fundamental da dieta de comunidades tradicionais costeiras (Pestana *et al.*, 2020). Contudo, apesar da sua relevância, espécies de *Callinectes* da costa amazônica maranhense permanecem pouco estudadas, especialmente sob o ponto de vista molecular. O uso de técnicas da biologia molecular tem impulsionado os estudos filogenéticos, auxiliando na compreensão dos padrões evolutivos das espécies e na elucidação de incertezas taxonômicas.

Em *Callinectes*, estudos filogenéticos recentes realizados no litoral brasileiro mostraram que diferentes espécies do gênero apresentam padrões de diversidade genética contrastantes. Por exemplo, *C. ornatus* apresenta populações com alta diferenciação genética, enquanto *C. danae* apresenta populações com baixa diferenciação genética (Peres *et al.*, 2020; Peres *et al.*, 2022). Cenários como esses tornam evidente a necessidade de investigar populações de *Callinectes* da costa maranhense, uma vez que é provável que elas possam abrigar padrões próprios de diversidade genética ainda não documentados.

A presente dissertação está estruturada em três capítulos: O capítulo I aborda a diversidade críptica em espécies de siris do gênero *Callinectes* na costa amazônica brasileira, revelando com base em diferentes métodos de análise (filogenias, redes de haplótipos e métodos de delimitação de espécies), a existência de linhagens evolutivas distintas dentro do gênero e a presença de diversidade críptica. O capítulo II apresenta o primeiro registro de *Callinectes marginatus* A. Milne-Edwards, 1861 no litoral amazônico maranhense, ampliando o mapa de ocorrência desta espécie na costa brasileira. Por fim, o capítulo III descreve, pela primeira vez, um registro de canibalismo em *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 em condições naturais, que contribui com informações inéditas sobre o comportamento dessa espécie, lançando luz sobre um possível mecanismo de regulação populacional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade das linhagens genéticas dos siris do gênero *Callinectes* presentes no Golfão Maranhense.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Validar a eficiência dos marcadores mitocondriais e nucleares para a identificação molecular das espécies de siris do gênero *Callinectes* presente no Golfão Maranhense e a divergência entre suas populações;
- ✓ Identificar, por meio de DNA, o nível de parentesco evolutivo entre as espécies do gênero *Callinectes* do Golfão Maranhense e outras populações conspecíficas no Brasil;
- ✓ Complementar a caracterização das linhagens com registros ecológicos e distribuição de espécies, ampliando o conhecimento sobre a ocorrência e o comportamento das espécies de *Callinectes* no Golfão Maranhense.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais do gênero *Callinectes*

O Subfilo Crustácea é um dos maiores e mais diversificados grupos do filo Artrópoda, reunindo aproximadamente cerca de 70 mil espécies viventes (Brusca; Moore; Shuster, 2018). Esses invertebrados são amplamente distribuídos no ambiente marinho, vivendo especialmente em regiões bentônicas, pelágicas de áreas oceânicas, costeiras e estuarinas (Ahyong, 2001; Serejo *et al.*, 2006; Brusca; Brusca, 2007; Brusca; Moore; Shuster, 2018). Além de possuírem ampla distribuição geográfica, esses animais possuem um alto valor ecológico e comercial, com destaque para a ordem Decapoda, considerada a mais variada e importante ordem de crustáceos, que reúne espécies populares e de grande interesse econômico como os camarões, caranguejos, lagostas e siris (De grave *et al.*, 2023).

Os caranguejos nadadores do gênero *Callinectes* possuem ampla distribuição geográfica, com ocorrência registrada nos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (Williams, 1974). Atualmente, é representado por 15 espécies válidas (Robles *et al.*, 2024), *Callinectes affinis* Fausto-Filho, 1980; *Callinectes amnicola* (de Rochebrune, 1883); *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863; *Callinectes bellicosus* (Stimpson, 1859); *Callinectes bocourti* A. Milne-Edwards, 1879; *Callinectes danae* Smith, 1869; *Callinectes exasperatus* (Gerstaecker, 1856); *Callinectes larvatus* Ordway, 1863; *Callinectes marginatus* (A. Milne-Edwards, 1861); *Callinectes ornatus* Ordway, 1863; *Callinectes pallidus* (de Rochebrune, 1883); *Callinectes rathbunae* Contreras, 1930; *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896; *Callinectes similis* Williams, 1966 e *Callinectes toxotes* Ordway, 1863. Destas, oito espécies ocorrem ao longo da costa brasileira: *C. affinis*, *C. bocourti*, *C. danae*, *C. exasperatus*, *C. ornatus*, *C. larvatus* e *C. marginatus* e *C. sapidus* (Coelho *et al.* 2008; Boos *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2016). No litoral maranhense, atualmente são conhecidas quatro espécies: *C. bocourti*, *C. danae*, *C. exasperatus*, *C. ornatus*, *C. marginatus* (Coelho; Ramos-Porto, 1980; Sousa *et al.*, 2015).

Essa ampla distribuição, tanto em escala global quanto regional, pode estar relacionada à plasticidade ecológica característica do gênero *Callinectes*, pois são animais capazes de adaptar seu comportamento, sua fisiologia e sua morfologia para sobreviver em diferentes ambientes marinhos e estuarinos, habitando desde substratos lamacentos e arenosos em águas rasas até regiões oceânicas de maior profundidade (William, 1974; Melo, 1997; Ortega *et al.*, 2020). Ambientes como esses são essenciais para o sucesso biológico desses indivíduos, visto que oferecem condições e recursos ambientais fundamentais para sua sobrevivência em diferentes fases do seu ciclo de vida.

Essa capacidade adaptativa de habitar diferentes ambientes está diretamente relacionada ao seu papel ecológico. Como importantes representantes da macrofauna bêntica, as espécies de *Callinectes* têm uma função ecológica vital no ambiente em que vivem, uma vez que atuam na regulação das teias tróficas, ajudando a manter o equilíbrio em diferentes níveis da cadeia alimentar, operando como predadores generalistas e servindo como fonte de alimento para diferentes animais (Mantelatto; Fransozo, 1999; Braga *et al.*, 2021; Farrell *et al.*, 2024).

Em termos comportamentais, *Callinectes* é conhecido por ser um gênero composto por animais extremamente agressivos e territorialistas (Reichmuth, *et al.*, 2010). Frequentemente, esse tipo de comportamento está relacionado à necessidade de garantir alimentos para sobrevivência (Clark *et al.*, 1999). Esse padrão comportamental torna-se ainda mais evidente em ambientes com alta densidade populacional e baixa disponibilidade de recursos (Mansour; Lipcius, 1991; Clark *et al.*, 1999), cenários em que os animais competem por recursos pode culminar em predação intraespecífica.

No caso dos Portunídeos do gênero *Callinectes*, o comportamento agonístico ocorre por meio de relações hierárquicas, nas quais indivíduos maiores tendem a subjugar indivíduos menores (Reichmuth, *et al.*, 2010). A exemplo do que foi relatado para *C. ornatus*, acredita-se que esta espécie tenha se adaptado a ambientes hipersalinos de praia para fugir de interações agressivas dentro dos estuários com indivíduos maiores, como, por exemplo, com *C. danae* (Sant'anna *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2014). Esse tipo de relação agonística, sobretudo em cenários de escassez de recursos alimentares e superpopulação, pode favorecer a predação intraespecífica, como já foi documentado para espécies do gênero em ambientes de aquacultura (Romano; Zeng *et al.*, 2016). Na natureza, os registros de canibalismo são escassos, e o que se conhece geralmente resulta de situações induzidas e não de forma natural (ex. Peery, 1989; Ryer *et al.*, 1997; Romano e Zeng, 2016).

Para além da importância ecológica, algumas espécies do gênero *Callinectes* possuem valor comercial, sendo utilizadas como recurso alimentar pesqueiro e compondo a dieta de comunidades tradicionais ribeirinhas, que as utilizam como meio de subsistência (Pita *et al.*, 1985; Mantelatto; Fransozo, 1999; Branco; Masunari, 2000; Branco; Fracasso, 2004; Severino-Rodrigues *et al.*, 2012; Pestana *et al.*, 2020). No Brasil, as espécies *C. bocourti*, *C. danae*, *C. ornatus* e *C. sapidus* são as que mais se destacam economicamente (Pinheiro *et al.*, 2016), frequentemente capturadas de forma incidental na pesca de camarão-branco em diferentes áreas do litoral brasileiro (ex. Branco; Fracasso, 2004; Santos *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2016; Mantelatto *et al.*, 2016; Bochini *et al.*, 2019; Pestana *et al.*, 2020).

Segundo Pinheiro *et al.* (2016), a captura acessória de crustáceos portunídeos, especialmente durante a pesca de camarão-branco, pode representar uma potencial ameaça para esses indivíduos, uma vez que, essas atividades de alguma forma podem comprometer o equilíbrio ecológico das áreas exploradas. Muitos desse animais, que não são aproveitados comercialmente, são devolvidos para o mar mortos ou debilitados (com apêndices locomotores perdidos) no momento da limpeza das redes (Severino-Rodrigues *et al.*, 2002). Para mitigar esses efeitos são necessárias medidas de manejo e conservação. Nesse contexto, é essencial avaliar o status de conservação dos crustáceos, incluindo os portunídeos do gênero *Callinectes*.

Conforme o Livro Vermelho de Crustáceos do Brasil, as espécies *C. bocourti*, *C. danae*, *C. exasperatus*, *C. ornatus*, *C. marginatus* e *C. sapidus* se enquadram na categoria de espécies menos preocupantes (LC). Apesar de não estarem ameaçadas extinção, algumas destas espécies contam com medidas legais e ações de manejo e conservação, como no caso das espécies *C. danae* e *C. sapidus*, são protegidas por normativas que regulam a sua exploração, com as portarias nº N-024, de 26 de julho de 1983, SUDEPE, 1983, e a portaria SUDEPE nº 11, de 18/05/1988, que proíbem a captura de fêmeas ovígeras (Pinheiro *et al.*, 2016). Entretanto, para essas medidas funcione de fato, é fundamental a identificação correta desses animais.

Os caranguejos nadadores do gênero *Callinectes* apresentam como característica diagnóstica principal o corpo achatado dorso-ventralmente e o último par de pereiópodos adaptados para natação (Williams, 1974). A identificação de indivíduos adultos baseia-se na visualização do dorso da carapaça, considerando aspectos como o formato e número dos dentes frontais, a curvatura dos dentes anterolaterais, o comprimento dos espinhos laterais, a presença e ausência de granulação da superfície dorsal, bem como a disposição e o comprimento dos gonópodes dos machos (Williams, 1974, Rodriguez, 1982; Melo, 1996).

Contudo, a identificação morfológica de *Callinectes* apresenta limitações, sendo a exclusão de indivíduos juvenis das chaves de identificação um dos principais entraves. Ignorar indivíduos juvenis das chaves de identificação pode implicar tanto na subestimação quanto na superestimação da real diversidade existente dessas espécies (Lane-Medeiros *et al.*, 2021). Esse desafio é amplificado em grupos que apresentam ciclos de vida complexos, como ocorre nas espécies de *Callinectes* (ex. Costa; Negreiros-Fransozo, 1998; Júnior; Negreiros-Fransozo; Fransozo, 2008), que durante o seu desenvolvimento sofrem mudanças morfológicas através de sucessivas ecdises (substituição do exoesqueleto), o que pode causar

diagnósticos equivocados de indivíduos que estão em transição do estágio juvenil para o adulto.

Além disso, a similaridade morfológica observada em algumas espécies de *Callinectes* pode contribuir para incertezas taxonômicas. Por exemplo, Williams (1974), com base na disposição dos gonópodes, considera semelhantes *C. danae* e *C. arcuatus*; *C. similis* e *C. ornatus*; *C. bocourti* e *C. toxotes*. Isso pode dificultar a diferenciação entre as espécies, fazendo com que, em determinadas situações, critérios morfológicos sejam considerados insuficientes para distinguir esses táxons. Esse cenário fica ainda mais evidente no estudo realizado por Robles *et al.* (2006) que por meio de análises do DNA, demonstraram que as características morfológicas não foram suficientes para validar *C. maracaiboensis* (atualmente considerada como sinônimo júnior de *C. bocourti*) como uma espécie única. Isso mostra que depender exclusivamente da morfologia, em alguns casos, pode não ser a melhor estratégia para lidar com espécies com alta similaridade morfológica.

Diante disso, os métodos moleculares têm se mostrado úteis na delimitação de espécies. A identificação de espécies por DNA em conjunto com dados morfológicos tem se mostrado como uma importante ferramenta taxonômica (Hebert *et al.*, 2003), fornecendo uma base mais sólida e eficiente na determinação de espécies de crustáceos (Varela *et al.*, 2021; Marco-Herrero; Cuesta; GonzálezGordillo, 2021), incluindo espécies do gênero *Callinectes* (Mancinelli *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2020). Dessa forma, as abordagens que integram diferentes métodos de delimitação de espécies representam uma importante ferramenta para resolver as complexidades taxonômicas de alguns táxons, além de contribuir no entendimento das relações evolutivas de diversos grupos (Andrade *et al.*, 2021).

Os estudos filogenéticos buscam investigar os padrões evolutivos das espécies e podem desempenhar um papel crucial na resolução de incertezas taxonômicas. A análise de sequências de DNA permite a reconstrução de filogenias moleculares, contribuindo para a identificação de espécies e para a compreensão das suas relações evolutivas. Em *Callinectes*, há poucos trabalhos sobre filogenia molecular do gênero. Robles *et al.* (2007) analisaram as relações evolutivas das espécies gênero a partir de duas regiões do DNA mitocondrial (rRNA 12S e rRNA16S), mostrando que o gênero é monofilético e dividido em duas linhagens evolutivas principais nomeadas como grupo “danae” (*C. danae*, *C. exasperatus*, *C. ornatus*, *C. larvatus*, *C. arcuatus*, *C. bellicosus*, *C. similis*) e grupo “bocourti” (*C. bocourti*, *C. sapidus*, *C. toxotes* e *C. rathbunae*). Contudo, a posição taxonômica das espécies africanas *C. amnicola*, *C. marginatus* e *C. pallidus* não ficou esclarecida. Diante dessa limitação, com base nos caracteres morfológicos e fisiológicos disponíveis na literatura especializada, esses

autores hipotetizaram que *C. amnicola* pertencia a linhagem “bocourti”, enquanto *C. marginatus* e *C. pallidus* ao grupo “danae”.

Essa hipótese foi confirmada no estudo mais recente de Robles et al. (2024) que investigaram novamente as relações evolutivas dentro do gênero utilizando duas regiões do DNA mitocondrial (rRNA 12S e rRNA16S), mostrando que de fato *C. amnicola* pertence a linhagem “bocourti” e que *C. marginatus* e *C. pallidus* pertencem a linhagem “danae”. Além disso, esses autores apoiaram a validade de *C. marginatus* e *C. larvatus* como espécies distintas. Contudo, a validade taxonômica dessas duas espécies ainda continua sendo motivo de debate. Além disso, os autores questionam o ressurgimento de *C. maracaiboensis* como espécie válida. Diante desse cenário, embora o trabalho de Robles et al. (2024) tenha esclarecido sobre a posição taxonômica de algumas espécies do gênero, existe a necessidade de esclarecer questões que ainda permanecem em aberto, e para resolver essas questões, os autores incentivam análises integrativas.

Além de estudos sobre filogenia, algumas espécies de *Callinectes* também são analisadas quanto a sua diversidade genética (Weber; Levy, 2000; Peres et al., 2020; Peres et al., 2022). Em termos populacionais, estudos revelaram padrões distintos de diversidade genética entre populações de diferentes espécies de *Callinectes*. No litoral brasileiro, por exemplo, as espécies *C. ornatus* e *C. danae* apresentaram padrões de diversidade genética contrastantes: *C. ornatus* apresenta populações com alta diferenciação genética (Peres et al., 2022), enquanto *C. danae* apresenta baixa diferenciação genética ao longo da sua distribuição no litoral brasileiro (Peres et al., 2020). Um padrão de divergência genética também foi observado nas populações de *C. sapidus*, que possui duas linhagens evolutivas ocorrendo em simpatria em estuários brasileiros (Rodrigues et al., 2017).

2.2 Métodos de delimitação de espécies na caracterização de linhagens evolutivas

A taxonomia tradicional ainda continua sendo uma das principais ferramentas utilizadas na identificação e classificação de espécies. Contudo, essa abordagem apresenta limitações, tornando-se ineficiente na identificação de grupos de espécies crípticas, nas quais as características morfológicas permanecem conservadas, enquanto revelam diferenciação genética, assim dificultando a sua identificação (Bickford *et al.*, 2006).

Diante desse cenário, o avanço das técnicas de DNA *barcoding* e sequenciamento de DNA possibilitou o desenvolvimento de diversas abordagens. Entre elas, as metodologias de delimitação de espécies vêm se popularizando nos últimos anos (Puillandre *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Fujisawa; Barraclough, 2013; Puillandre; Brouillet; Achaz, 2021; Goulpeau *et al.*, 2022), sendo cada vez mais empregadas como ferramentas complementares em abordagens de taxonomia integrativa, que buscam investigar os limites entre espécies, estimar a diversidade de comunidades biológicas e descrever a distribuição espacial dos organismos (Goulpeau *et al.*, 2022).

Os métodos de delimitação de espécies utilizam a análise de sequências de DNA na recuperação das MOTUs (*Molecular Operational Taxonomic Units*). Os modelos mais utilizados são: ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*), ASAP (*Assemble Species by Automatic Partitioning*), PTP (*Poisson Tree Process*) e GMYC (*General Mixed Yule Coalescent*) (Puillandre *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Fujisawa; Barraclough, 2013; Puillandre; Brouillet; Achaz, 2021). Esses métodos diferem entre si de acordo com o tipo de análise e pressupostos em que se baseiam (Goulpeau *et al.*, 2022).

De modo geral, os métodos de delimitação podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro grupo inclui métodos que analisam apenas as diferenças genéticas entre as sequências (chamadas de “matrizes de distâncias genéticas”), sem precisar reconstruir a árvore evolutiva dos organismos: é o caso dos métodos ABGD e ASAP. Já o segundo grupo inclui métodos que utilizam árvores filogenéticas, mostrando as relações evolutivas entre os indivíduos. Nesse grupo estão os métodos PTP e GMYC (Goulpeau *et al.*, 2022).

O método ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) compara as distâncias genéticas de todas as sequências de DNA analisadas, ou seja, mede quanto cada sequência é parecida ou diferente das outras. Quando há diferença clara dentro da mesma espécie (intraespecífica) e entre espécies diferentes (interespecífica), o método detecta automaticamente o chamado “*gap de código de barras*”. A partir desse *gap*, o método propõe um limite de distância genética, separando as sequências em grupos que representam possíveis espécies (Puillandre; Brouillet; Achaz, 2021).

O método ASAP (*Assemble Species by Automatic Partitioning*) também utiliza matrizes de distâncias genéticas em suas inferências. Esse algoritmo organiza os valores da matriz de distância genética em ordem crescente e testa, sucessivamente, cada valor como um possível limite entre variações intraespecíficas e interespecíficas para verificar qual seria o mais provável a separar os grupos. Para cada uma das divisões, o método atribui uma pontuação baseada em dois critérios: o primeiro considera o tamanho das diferenças genéticas entre os grupos, conhecido como “*gap de código de barras*”; e o segundo considera a probabilidade de que um grupo de fato represente uma espécie (valor p). Após analisar esses critérios, a partição com melhor pontuação é considerada (Puillandre *et al.*, 2012; Puillandre; Brouillet; Achaz, 2021).

O modelo GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent*) utiliza uma árvore filogenética ultramétrica, ou seja, calibrada no tempo e inferida a partir de sequências de DNA. Esse método funciona identificando o ponto na árvore onde ocorre a transição entre os processos de especiação (divergência entre espécies diferentes) e coalescência (variação genética dentro de uma mesma espécie) (Fujisawa; Barraclough, 2013). O modelo PTP (*Poisson Tree Process*) não utiliza árvore ultramétrica e sua inferência baseia-se no número de substituições ao longo dos ramos da árvore, identificando quais grupos de sequências compartilham uma história comum dentro de uma mesma espécie e quais estão evoluindo separadamente como espécies distintas (Zhang *et al.*, 2013).

REFERÊNCIAS

- AHYONG, S. T. Revision of the Australian Stomatopod Crustacea. **Records of the Australian Museum, Supplement**, v. 26, p. 1–326, 2001.
- ANDRADE, M. P.; FERREIRA, F. S.; PINTO, T. C. F.; SAMPRONHA, S.; SANTOS, D.; SILVA, P. K. R.; CARRIJO, T. F.; NUNES, T. F.; OLIVEIRA, O. M. P. Um panorama atual sobre a filogenia de Metazoa: conflitos e concordâncias. **Revista da Biologia**, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1984-5154.v21p1-13>
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–155, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- BRAGA, A.A.; OLIVEIRA, A.C.M.; ZAPPES, C.A. Caracterização da pesca e importância dos crustáceos a partir da percepção de pescadores artesanais do sul do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais** v. 16, n. 1, p. 59-71, 2021. DOI: <http://doi.org/10.46357/bcnaturais.v16i1.208>.
- BRANCO, J. O.; FRACASSO, H. A. A. Ocorrência e abundância da carcinofauna acompanhante na pesca do camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* Heller (Crustacea, Decapoda), na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 295-301, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-81752004000200022>
- BRANCO, J. O.; MASUNARI, S. Reproductive ecology of the blue crab, *Callinectes danae* Smith, 1869 in the Conceição Lagoon system, Santa Catarina Isle, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, p. 17-27, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-71082000000100004>
- BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER S. E. Invertebrados. 3. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2018.
- BRUSCA, R.C.; G.J. BRUSCA. Invertebrados. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2007.
- BOOS, H.; MAGALHÃES, C.; SANTOS, R.; BUCKUP, G.; BUCKUP, L.; ALMERÃO, M.; ARAUJO, P.; MANTELATTO, F. Checklist of the Crustacea from the state of Santa Catarina, Brazil. **Check List**, v. 8, n. 6, p. 1020–1046, 2012. DOI: <https://doi.org/10.15560/8.6.1020>
- CLARK, M.; WOLCOTT, T. G.; WOLCOTT, D. L.; HINES, A. H. Intraspecific interference among foraging blue crabs *Callinectes sapidus*: interactive effects of predator density and prey patch distribution. **Marine Ecology Progress Series**, v. 178, p. 69–78, 1999. DOI: <https://doi.org/10.3354/meps178069>
- COELHO, P. A.; ALMEIDA, A. O. D.; BEZERRA, L. E. A. Checklist of the marine and estuarine Brachyura (Crustacea: Decapoda) of northern and northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 1956, n. 1, p. 1–58, 2008. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1956.1.1>

COELHO, P. A.; RAMOS-PORTO, M. Crustáceos decápodos da costa do Maranhão, Brasil. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 29, n. 2, p. 135–138, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0373-55241980000200028>

COSTA, R. C.; CARVALHO-BATISTA, A.; HERRERA, D. R.; PANTALEÃO, J. A. F.; TEODORO, S. S. A.; DAVANSO, T. M. Carcinofauna acompanhante da pesca do camarão-sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* em Macaé, Rio de Janeiro, Sudeste brasileiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p. 611–624, 2016. DOI: [Doi 10.20950/1678-2305.2016v42n3p611](https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n3p611)

COSTA, T. M.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. The Reproductive Cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 (Decapoda, Portunidae) in the Ubatuba Region, Brazil. **Crustaceana**, v. 71, n. 6, p. 615–627, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1163/156854098X00617>

DE GRAVE, S.; DECOCK, W.; DEKEYZER, S.; DAVIE, P. J. F.; FRANSEN, C. H. J. M.; BOYKO, C. B.; POORE, G. C. B.; MACPHERSON, E.; AHYONG, S. T.; CRANDALL, K. A.; MAZANCOURT, V.; OSAWA, M.; CHAN, T. Y.; NG, P. K. L.; LEMAITRE, R.; MEIJ, S. E. T.; SANTOS, S. Benchmarking global biodiversity of decapod crustaceans (Crustacea: Decapoda). **Journal of Crustacean Biology**, v. 43, n. 3, p. 42, 2023. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruad042>

FARRELL, E.M.; NEUMANN, A.; BEERMANN, J.; WREDE, A. Raised water temperature enhances benthopelagic links via intensified bioturbation and benthos-mediated nutrient cycling. **PeerJ**, v. 12, p. 17047, 2024. DOI: [https://DOI 10.7717/peerj.17047](https://doi.org/10.7717/peerj.17047). eCollection 2024

FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. **Systematic Biology**, v. 62, n. 5, p. 707–724, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>

GOULPEAU, A.; PENEL, B.; MAGGIA, M. E.; MARCHÁN, D. F.; STEINKE, D.; HEDDE, M.; DECAËNS, T. OTU Delimitation with Earthworm DNA Barcodes: A Comparison of Methods. **Diversity**, v. 14, n. 10, p. 866, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/d14100866>

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003. DOI: [https://DOI10.1098/rspb.2002.2218](https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218)

JÚNIOR, E. A. B.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L.; FRANSOZO, A. Juvenile Development of *Callinectes Ornatus* Ordway, 1863 (Crustacea: Decapoda: Portunidae), from Megalopae Obtained in the Neuston. **Zootaxa**, v. 1788, n. 1, p. 1–20, 2008. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1788.1.1>

- LANE-MEDEIROS, L.; MORAES, S. A. S. N.; ALENCAR, C. E. R. D.; ROCHA, M. A. L.; FREIRE, F. A. M. Body shape variations help to diminish taxonomy uncertainty in juvenile swimming crab *Callinectes* Stimpson, 1860. **Zoologischer Anzeiger**, v. 295, p. 89–98, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2021.09.009>
- LEE, B. B.; SCHOTT, E. J.; BEHRINGER, D. C.; BOJKO, J.; KOUGH, A.; PLOUGH, L. V. Rapid Genetic Identification of the Blue Crab *Callinectes sapidus* and Other *Callinectes* spp. Using Restriction Enzyme Digestion and High Resolution Melt (HRM) Assays. **Frontiers In Marine Science**, v. 7, p. 1-13, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00633>
- MANCINELLI, G.; CHAINHO, P.; CILENTI, L.; FALCO, S.; KAPIRIS, K.; KATSELIS, G.; RIBEIRO, F. The Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* in southern European coastal waters: Distribution, impact and prospective invasion management strategies. **Marine pollution bulletin**, v. 119, n. 1, p. 5-11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.050>
- MANSOUR, R.A.; LIPCIUS, R.N. Density-dependent foraging and mutual interference in blue crabs preying upon infaunal clams. *Marine Ecology Progress Series*, v. 72, p. 239–246, 1991. DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/meps072239>
- MANTELATTO, F. L. M.; FRANSOZO, A. Characterization of the physical and chemical parameters of Ubatuba bay, northern coast of São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, p. 23-31, 1999. DOI: <http://DOI.10.1590/s0034-71081999000100004>
- MANTELATTO, F. L.; BERNARDO, C. H.; SILVA, T. E.; BERNARDES, V. P.; COBO, V. J.; FRANSOZO, A. Composição e distribuição de crustáceos decápodes associados à pesca do camarão-sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) no litoral norte do Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p. 307–326, 2016. DOI:10.20950/1678-2305.2016v42n2p307
- MARCO-HERRERO, E.; CUESTA, J.A.; GONZÁLEZ-GORDILLO, J. Ignacio. DNA barcoding allows identification of undescribed crab megalopas from the open sea. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 20573, 2021. DOI: 10.1038/S41598-021-99486-4.
- MELO, G. A. S. Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do litoral brasileiro, Editora Plêiade, São Paulo, 317p, 1996.
- NASCIMENTO, W. R.; SOUZA-FILHO, P. W. M.; PROISY, C.; LUCAS, R. M.; ROSENQVIST, A. Mapping changes in the largest continuous Amazonian mangrove belt using object-based classification of multisensor satellite imagery. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 117, p. 83–93, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.10.005>
- ORTEGA, I.; IBEIRO, C. F.; RODRIGUES, L. S.; RODRIGUES, M. A.; DUMONT, L. F. C. Habitat use in different life and moulting stages of *Callinectes sapidus* (Decapoda, Portunidae) in South Brazilian estuarine and marine environments. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 100, n. 1, p. 79–91, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0025315419001085>

PEERY, C.A. **Cannibalism Experiments with the Blue Crab (*Callinectes sapidus* Rathbun): Potential Effects of Size and Abundance**. M.S. Thesis. College of William and Mary-Virginia Institute of Marine Science, United States, 1989.

PERES, P. A.; BRACKEN-GRISSOM, U.; TIMM, L.; MANTELATTO, F. L. M. Genomic Analyses Implicate the Amazon–Orinoco Plume as the Driver of Cryptic Speciation in a Swimming Crab. **Genes**, v. 13, n. 12, p. 2263, 2022. DOI: 10.3390/genes13122263

PERES, P. A.; LOPES, M.; NEGRI, M.; ROBLES, R.; SANTOS, C. R. M.; MANTELATTO, F. L. M. Lack of population genetic structure among Brazilian populations of *Callinectes danae* (Brachyura: Portunidae): implication for management and conservation. **Regional studies in marine science**, v. 37, p. 101336–101336, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101336>

PESTANA, S. S.; VIANA, A. R. C.; DINIZ, A. L. C.; SOUZA, D. B.; ALMEIDA, Z. S. Comparação entre a produção pesqueira do camarão branco e a fauna de siris do gênero *Callinectes* na pesca de zangaria no Município de Raposa, Maranhão – Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 7732–7749, 2020. DOI:10.34117/bjdv6n2-178

PINHEIRO, M.A.A.; BOOS, H.; REIGADA, A. L. D.; RODRIGUES, E. S. Avaliação dos Caranguejos Portunídeos (Decapoda: Portunoidea: Ovalipidae, Polybiidae e Portunidae). Cap. 26: p. 337-365. In: Pinheiro, M. & Boos, H. (Org.). **Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014**. Porto Alegre, RS, Sociedade Brasileira de Carcinologia - SBC, p. 466. 2016.

PITA, J. B.; RODRIGUES, E. S.; LOPES, R. G.; COELHO, J. A. P. OBSERVAÇÕES BIOECOLÓGICAS SOBRE O SIRÍ *Callinectes danae* SMITH, 1869(CRUSTÁCEA, PROTUNIDAE), NO COMPLEXO BAÍA-ESTUÁRIO DE SANTOS, BRASIL. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 12, n. 4, p. 35–43, 1985.

PUILLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for Primary Species Delimitation. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1864–1877, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>

PUILLANDRE, N.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ASAP: Assemble Species by Automatic Partitioning. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n. 2, p. 609–620, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>

REICHMUTH, J. M.; MACDONALD, J.; RAMIREZ, J.; WEIS, J. S. Fight or flight: an investigation of aggressive behavior and predator avoidance in two populations of blue crabs (*Callinectes sapidus* Rathbun) in New Jersey. **Hydrobiologia**, v. 658, n. 1, p. 173–182, 2010. DOI: 10.1007/s10750-010-0460-z

ROBLES, R.; SCHUBART, C. D.; CONDE, J. E.; CARMONA-SUÁREZ, C.; ALVAREZ, F.; VILLALOBOS, J. L.; FELDER, D. L. Molecular phylogeny of the American *Callinectes*

Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae), based on two partial mitochondrial genes. **Marine Biology**, v. 150, n. 6, p. 1265–1274, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-006-0437-7>

ROBLES, R.; SCHUBART, C.D.; FELDER, D.L. Molecular phylogenetic reassessment of eastern Atlantic *Callinectes* (Brachyura, Portunidae). **Crustaceana**, 97, p. 865–874, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-006-0437-7>

RODRÍGUEZ, B. D. Los cangrejos de la familia Portunidae (Decapoda: Brachyura) del Caribe colombiano. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras**, v. 12, 1982 <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.1982.12.0.501>

RODRIGUES, M. A.; DUMONT, L. F. C.; SANTOS, C. R. M.; D'INCAO, F.; WEISS, S.; FROUFE, E. Two distinct mtDNA lineages of the blue crab reveal large-scale population structure in its native Atlantic distribution. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 197, p. 45–53, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.08.004>

RODRÍGUEZ, B.D. Los cangrejos de la familia Portunidae (Decapoda: Brachyura) del Caribe colombiano. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras** 12: 137–184, 1982. DOI: <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.1982.12.0.501>

ROMANO, N.; ZENG, C. Cannibalism of Decapod Crustaceans and Implications for Their Aquaculture: A Review of its Prevalence, Influencing Factors, and Mitigating Methods. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 25, n. 1, p. 42–69, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/23308249.2016.1221379>

ROSA-FILHO, J. S.; PEREIRA, L. C. C.; AVIZ, D.; BRAGA, C. F.; MONTEIRO, M. C.; COSTA, R. A. M.; ASP, N. E.; BEASLEY, C. R. Benthic Estuarine Assemblages of the Brazilian North Coast (Amazonia Ecoregion). **Brazilian Estuaries: A Benthic Perspective**, p. 39–74, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-77779-5_2

RYER, C.; MONTFRANS, J. V.; MOODY, K. E. Cannibalism, refugia and the molting blue crab. **Marine ecology. Progress series**, v. 147, p. 77–85, 1997.

SANTOS, M. C. F.; SILVA, K. C. A.; CINTRA, I. H. A. Carcinofauna acompanhante da pesca artesanal do camarão-sete-barbas ao largo da foz do rio São Francisco (Alagoas e Sergipe, Brasil) / Accompanied carcinofauna of artisanal Atlantic seabob shrimp fishery offshore of the mouth of the rio San Francisco (States of Alagoas and Sergipe, Brazil). **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2312/Actafish.2016.4.1.1-10>

SEREJO, C et al. Capítulo 8. Filo **Arthoropoda**. **Subfilo Crustacea**. In: LAVRADO, H.P.; IGNACIO, B.L. (Eds.). Biodiversidade bentônica da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira. Rio de Janeiro: Museu Nacional. p. 299–337, 2006.

SEVERINO-RODRIGUES, E.; MUSIELLO-FERNANDES, J.; MOURA, A. A. S.; BRANCO, G. M. P.; CANÉO, V. O. C. Biologia reprodutiva de fêmeas de *Callinectes danae* (Decapoda, Portunidae) no complexo estuarino-lagunar de Iguape e Cananéia (SP). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, n. 1, p. 31-41, 2012.

SEVERINO-RODRIGUES, E.; GUERRA, D. S. F.; GRAÇA-LOPES, R. Carcinofauna acompanhante da pesca dirigida ao camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) desembarcada na praia do Perequê, estado de São Paulo, **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, n. 1, 33–48, 2002.

SOUSA, D. B.; SANTOS, N. B.; OLIVEIRA, V. M.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; ALMEIDA, Z.S. Carcinofauna bêmica estuarina de dois manguezais da costa amazônica maranhense, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 105, p. 339–347, 2015. DOI: 10.1590/1678-476620151053339347

VARELA, C.; GOLIGHTLY, C.; TIMM, L. E.; WILKINS, B.; FRANK, T.; FENOLIO, D.; COLLINS, S. B.; BRACKEN-GRISSOM, U. DNA barcoding enhances large-scale biodiversity initiatives for deep-pelagic crustaceans within the Gulf of Mexico and adjacent waters. **The Journal of Crustacean Biology**, v. 41, n. 1, p. ruab005, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruab005>

WATANABE, T. T.; SANT'ANNA, B. S.; HATTORI, G.Y.; ZARA, F. J. Population biology and distribution of the portunid crab *Callinectes ornatus* (Decapoda: Brachyura) in an estuary-bay complex of southern Brazil. **Zoologia (Curitiba)**, v. 31, p. 329–336, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-46702014000400004>

WEBER, L. I.; LEVY, J. A. Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. **Hydrobiologia**, v. 420, n. 1, p. 203–210 2000.

WILLIAMS. A. B. The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). **Fish Bull**, v. 72. p. 685–798, 1974.

ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869–2876, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>

CAPÍTULO I

**Diversidade críptica em espécies de siris do gênero *Callinectes* Stimpson, 1860
(Decapoda: Portunidae) na Costa Amazônica brasileira**

Este manuscrito foi escrito nas normas da revista Marine Biology

Print version ISSN 0025-3162 | Electronic ISSN 1432-1793

Diversidade críptica em espécies de siris do gênero *Callinectes* Stimpson, 1860 na Costa Amazônica brasileira

Bianca S. Costa¹, Jaqueline P. Sá¹, Luis F. Carvalho-Costa²

1. Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, São Luís, Maranhão, Brasil.

2. Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Departamento de Biologia, São Luís, Maranhão, Brasil.

Autor Correspondente: Luis Fernando Carvalho-Costa (luis.costa@ufma.br)

ORCIDS

Bianca S. Costa: <https://orcid.org/0009-0002-8598-4047>

Jaqueline P. Sá: <https://orcid.org/0009-0007-7636-7393>

Luis F. Carvalho-Costa: <https://orcid.org/0000-0002-9590-1797>

Resumo

Os siris do gênero *Callinectes* Stimpson, 1860 possuem ampla distribuição geográfica nas regiões do oceano Atlântico, Índico e Pacífico, além de expressiva relevância ecológica e socioeconômica. No entanto, a taxonomia deste grupo permanece confusa. A alta similaridade morfológica entre espécies, associada com a exclusão de indivíduos juvenis e fêmeas das chaves de identificação dificulta uma delimitação mais precisa. Neste estudo, investigamos a diversidade de linhagens em espécies do gênero *Callinectes* na Costa Amazônica brasileira. As análises foram baseadas em quatro marcadores mitocondriais (Citocromo c oxidase subunidade I: COI; 12S rRNA: 12S; 16S rRNA: 16S; e Citocromo b: Cyt b) e um nuclear

(ATP/ADP translocase), utilizando diferentes métodos de delimitação de espécies (ABGD, ASAP, PTP e GMYC), além de redes de haplótipos para análises populacionais. Dos 117 espécimes coletados, 50 foram incluídos nas análises filogenéticas: 25 identificados como *Callinectes bocourti* Milne-Edwards, 13 como *Callinectes danae* Smith, 1869, seis como *Callinectes exasperatus* Gerstaecker, 1856, três como *Callinectes ornatus* Ordway, 1863, e três identificados como *Callinectes marginatus* A. Milne-Edwards, 1861. Na maioria dos casos, as análises morfológica e molecular foram congruentes; no entanto, os dados moleculares foram inconclusivos na delimitação entre *C. marginatus* e *Callinectes larvatus* Ordway, 1863, sugerindo que essas espécies são irmãs e oriundas de um processo recente de especiação. Os modelos de delimitação conseguiram recuperar MOTUs que, na maioria dos casos, correspondem às análises morfológicas e às identificações atribuída para às sequências extraídas dos bancos de dados. Embora, em alguns casos, os modelos de delimitação tenham apresentado inconsistências, eles detectaram padrões de divergência genética intraespecífica que podem indicar a presença de espécies crípticas. Em termos populacionais, as únicas espécies que apresentaram divergência foram *C. bocourti* e *C. ornatus*, sugerindo possível diversidade críptica nas populações dessas espécies. Nosso estudo representa a primeira investigação envolvendo a diversidade de linhagens do gênero *Callinectes* na costa Amazônica brasileira, além de ser o primeiro estudo do gênero a utilizar vários marcadores moleculares e diferentes métodos de análises. Os resultados revelaram que espécies da região apresentam padrões genético inéditos e contrastantes, sugerindo possível diversidade críptica dentro do grupo. Nossos resultados não só preenchem uma lacuna histórica sobre o conhecimento dos *Callinectes* no litoral Amazônico, mas também fornece fundamentos para uma reavaliação taxonômica em pesquisas futuras, além de servir de subsídios para estratégias de manejo e conservação desse importante grupo de portunídeos.

Palavra-chave: Linhagens simpátricas; Diversidade críptica; Crustáceos; Divergência populacional; Delimitação de espécies; Taxonomia integrativa; Marcadores moleculares.

Introdução

O gênero *Callinectes* Stimpson, 1860 pertence à ordem Decapoda, a mais diversa do subfilo Crustacea (De Grave et al. 2023). Esses crustáceos têm ampla distribuição geográfica, com registros nos oceanos Índico, Pacífico e Atlântico (Williams 1973). Atualmente, são reconhecidas 15 espécies válidas (Robles et al. 2024), das quais oito ocorrem no Brasil (Coelho et al. 2008; Boos et al. 2012; Pinheiro et al. 2016) e quatro no litoral do Maranhão, região oriental da costa Amazônica brasileira (Coelho e Ramos-Porto, 1980; Sousa et al. 2015).

Como representantes da macrofauna bêntica, o gênero *Callinectes* desempenha um papel ecológico relevante por atuarem como estabilizadores da cadeia trófica em ambientes estuarinos e marinhos, influenciando diretamente a abundância de outras espécies no ecossistema em que estão inseridos (Braga et al. 2021). Além disso, são animais de grande interesse econômico no Brasil, sendo utilizados como recurso alimentar pesqueiro de comunidades tradicionais costeiras, que deles dependem para subsistência (Pita et al. 1985; Mantelatto e Fransozo, 1999; Branco e Masunari 2000; Branco e Fracasso 2004; Severino-Rodrigues et al. 2012; Pestana et al. 2020; Anacleto et al. 2024).

Apesar da sua importância ecológica e socioeconômica, as informações sobre a taxonomia e diversidade desse grupo ainda permanecem pouco esclarecidas (Robles et al. 2024). Um dos principais desafios está relacionado à similaridade entre algumas espécies, o que dificulta a sua correta distinção. Além disso, a exclusão de indivíduos juvenis e fêmeas das chaves de identificação implica na subestimação ou superestimação da diversidade real desse grupo (Lane-Medeiros et al. 2021). Tais aspectos dificultam a diferenciação entre espécies, tornando os critérios morfológicos, em determinadas situações, insuficientes para a delimitação taxonômica.

Nesse contexto, os métodos moleculares têm se mostrado cada vez mais úteis na delimitação de espécies (Hebert et al. 2003). Isso se deve ao fato de que as análises morfológicas em conjunto com as análises de DNA fornecem uma base sólida e eficiente na determinação da identidade taxonômica de crustáceos (ex. Mancinelli et al. 2017; Lee et al. 2020; Varela et al. 2021; Marco-Herrero; Cuesta; González-Gordillo, 2021)

Para além da identificação de espécie, os dados moleculares também são comumente empregados em estudos filogenéticos de *Callinectes*, seja na reconstrução de sua filogenia (Robles et al. 2007; Robles et al. 2024), seja em análises populacionais (ex. Weber; Levy, 2000; Peres et al. 2020; 2022). Em termos populacionais, têm sido observados padrões distintos de diversidade genética entre populações de diferentes espécies de *Callinectes*. No litoral brasileiro, por exemplo, as espécies *C. ornatus* e *C. danae* apresentam padrões de diversidade genética contrastantes: *C. ornatus* apresenta populações com alta diferenciação genética (Peres et al. 2022), enquanto *C. danae* apresenta baixa diferenciação genética ao longo da sua distribuição (Peres et al. 2020). Um padrão de divergência genética também foi observado nas populações de *C. sapidus* que possui duas linhagens evolutivas ocorrendo em simpatria em estuários brasileiros (Rodrigues et al. 2017).

Diante dos padrões genéticos contrastantes apresentados por algumas espécies de *Callinectes* do litoral brasileiro e da ausência de estudos filogenéticos sobre esse gênero na Costa Amazônica maranhense, é possível que esta região possa abrigar linhagens evolutivas crípticas ou revelem padrões próprios de diversidade ainda não documentados. Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar as linhagens evolutivas do gênero *Callinectes* na extremidade leste da Costa Amazônica brasileira. A investigação sobre essa lacuna pode fornecer subsídios para a compreensão sobre a diversidade real de espécies desse grupo, e permitir a implementação de estratégias de manejo e conservação mais adequadas.

Materiais e métodos

Área de estudo e coletas

Os animais foram obtidos por meio da busca ativa (utilizando rede de arrasto e coleta manual) e por aquisição nos principais pontos de desembarque pesqueiros em sete municípios (São Luís, Paço do Lumiar, Raposa, São José de Ribamar, Cedral, Cururupu e Paulino Neves) localizados no Estado do Maranhão, Brasil (Fig. 1). Após a coleta, os siris foram eutanasiados pelo processo de resfriamento em gelo, acondicionados em sacos plásticos etiquetados, colocados em caixas de isopor refrigeradas e transportados ao laboratório. Além disso, também foram utilizadas amostras de *Callinectes ornatus* coletadas no município de São José de Ribamar, cedidas pela Coleção Carcinológica da Universidade de São Paulo (USP).

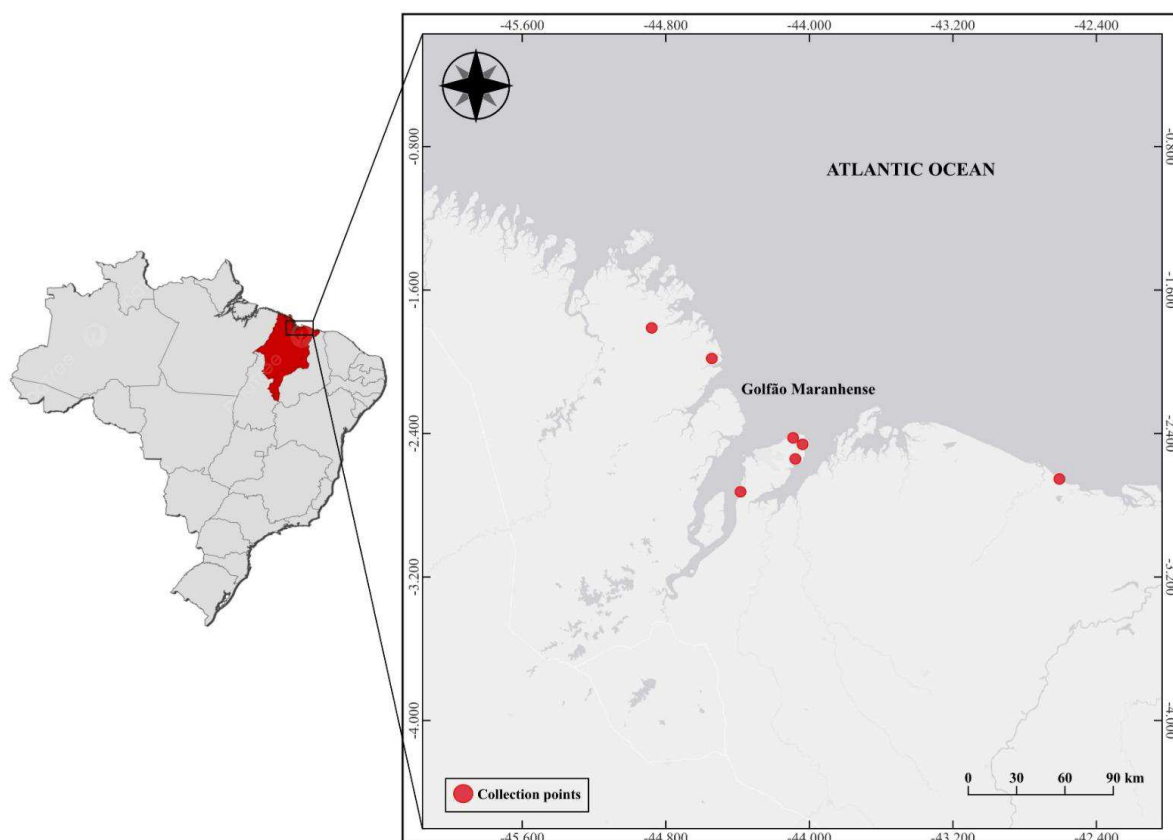


Fig. 1 Pontos amostrais das coletas de espécies de siris do gênero *Callinectes* na costa do Maranhão (leste do litoral amazônico brasileiro).

Conformidade com os padrões éticos

O estudo está em conformidade com os padrões éticos da legislação brasileira. Não houve a necessidade de submeter este projeto a um comitê de ética uma vez que a Lei Arouca (Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008) e outras resoluções normativas que tratam sobre o uso e cuidados de animais em pesquisas científicas não abordam a utilização de invertebrados. A coleta e transporte dos siris foi realizada mediante a autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) emitida por meio do Sistema de Autorização (SISBio) sob as licenças nº 26334-4 e 83715-1. Todos os exemplares coletados e sua destinação a coleção zoológica serão registrados na plataforma SISGEN (Sistema de gestão do patrimônio genético).

Triagem do material biológico e identificação morfológica

Para as análises do DNA, uma porção do tecido muscular fresco foi retirada da região dos quelípedos. Os tecidos foram transferidos para tubos contendo etanol absoluto e armazenados em freezer a -20°C. A identificação morfológica foi conduzida com base nas literaturas especializadas propostas por Williams (1974), Manning e Holthuis (1981), Rodriguez (1982), Melo (1996) e Fransen (2014).

Após esse processo, os siris foram fotografados e em seguida fixados em formol a 10%, conservados em etanol 70%, e posteriormente, depositados na coleção biológica da CoFauMa (Coleção de Tecidos e DNA da fauna maranhense) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), sob o número de tombo prefixado em CFMCR. As fotografias foram editadas no *software* livre GIMP 3.0.2-1 (GNU Image Manipulation Program EUA), utilizando os valores RGB (vermelho, verde e azul) na caracterização da coloração das estruturas corporais dos exemplares.

Identificação molecular

A extração de DNA foi realizada pelo método proposto por Aljanabi e Martinez (1997) com adaptações. Após a extração, foi realizada a quantificação das amostras utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) para verificar a concentração e pureza do DNA. Além disso, a qualidade do DNA foi avaliada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8%, com visualização em transluminador de LED. Os fragmentos de quatro marcadores mitocondriais (Citocromo c oxidase subunidade I, 12S rRNA, 16S rRNA, Citocromo b) e um marcador nuclear (ATP/ADP translocase) foram amplificados pelo método de PCR (Reação em cadeia de polimerase) em reações com volume final de 25µL contendo 1X taq Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 uM DNTP, primers a 0,3 uM, 1U de taq polimerase, DNA molde a 50 ng e água ultrapura. As amplificações em 35 ciclos com as seguintes temperaturas: desnaturação a 94°C por 5 minutos, anelamento 45°C - 60°C 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto (Tabela 1). A eficiência da amplificação foi verificada em eletroforese de gel de agarose 1% com marcador de peso molecular. As amplificações foram purificadas com kit comercial e sequenciadas pelo método de terminação de cadeia em sequenciador de DNA automático de uma empresa terceirizada.

Análises das sequências

As sequências *forward* foram avaliadas visualmente no *software* Bioedit 5.0.9 (Hall 1999), consideramos como sequência de qualidade aquelas que apresentaram picos bem definidos, ausência de ruídos e sobreposição. Além disso, foram corrigidos manualmente, eventuais erros em regiões onde o sequenciamento não soube determinar claramente os nucleotídeos. As sequências geradas para cada marcador foram contrastadas com as sequências das mesmas espécies disponíveis nos bancos de dados públicos BOLD Systems (Barcoding of Life Data Base) e Genbank (National Center for Biotechnology Information), porém apenas os marcadores COI e 16S foram utilizados para confirmar o status taxonômico

devido à maior representatividade de sequências disponíveis. No caso dos outros marcadores, embora não tenham sido utilizados na identificação das espécies, serviram para avaliar sua eficiência na formação dos grupos nas árvores filogenéticas e, conseqüentemente, possibilitaram a geração de sequências inéditas para o grupo. Todas as sequências de COI produzidas em nosso estudo foram depositadas na base de dados pública BOLD Systems e, as dos outros marcadores, no GenBank.

Tabela 1 Informações detalhadas sobre os *primers* e suas condições de amplificação em espécies de *Callinectes* da costa amazônica brasileira.

Primer	Sequências (5'-3')	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referências
LCO1490 ^I HCO2198	F - GGTCAA CAAATCATAAAGATATTGG R - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	658	45	Folmer et al. (1994)
COH6 ^{II} COL6b	F-TADACTTCDGGRTGDCCAARAYCA R-ACAAATCATAAAGATATYGG	700	50	Schubart e Huber(2006)
16SH2 ^{III} 16SL2	F-AGATAGAAACCAACCTGG R- TGCCTGTTTATCAAAAACAT	600	46	Schubart et al. (2000a; 2000b)
Csap 12s – F ^{IV} Csap 12s – R	F-CCAGGTTCACTTTCCAGTAA R-ATGAGAGTTGTAGCGGGTAA	790	50	Feng et al. (2017)
CIT B – 144F ^V CIT B – 270F	F-TGAGSNCARATGTCNTWYTG R-AANAGGAARTAYCAYTCNGGYTG	430	48	Merritt et al. (1998)
ANT3F ^{VI} ANT4R	F- CTT GCT GTA TTG GAA CCC TTT R- GAG CCT TTG AGC AACTGA CC	486	60	Palumbi et al. (1991)

^{I e II} Citocromo c oxidase subunidade I; ^{III}16S rRNA; ^{IV}12S rRNA; ^V Citocromo b; ^{VI} ATP/ADP Translocase.

Construção de árvores filogenéticas e cálculo de distâncias genéticas

As sequências geradas em nosso estudo e as disponíveis nos bancos de dados para as espécies de *Callinectes* foram alinhadas com o algoritmo Clustal W (Thompson et al. 1994) do programa *Bioedit* (Hall 1999) e editadas manualmente. As informações detalhadas sobre as sequências geradas neste estudo e as sequências extraídas dos bancos de dados estão disponíveis (Tabela suplementar 1).

As distâncias genéticas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura 1980) no software MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013). Esse modelo considera a taxa de mudança entre purinas e pirimidinas (transversão) e diferenças das alterações dentro das purinas ou pirimidinas (transições) (Caldart et al. 2016; Kaur e Sharma 2021). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando dois métodos: *Máxima verossimilhança* (ML) e *Inferência Bayesiana* (Felsenstein 1973; Huelsenbeck e Ronquist 2001). O primeiro método foi realizado no *software* RAxML (Stamatakis 2014; Edler et al. 2021) e o segundo, no BEAST 1.10 (Suchard et al. 2018).

Levando em consideração que diferentes marcadores moleculares evoluem de maneira distinta, a seleção do modelo de substituição de nucleotídeos ideal foi feita individualmente para cada marcador. Essa seleção foi realizada automaticamente pelo *software* ModelTest v.2.1.6 (Darriba et al. 2012) que utiliza, principalmente, dois critérios estatísticos para a escolha do modelo evolutivo: o AICc (Corrected Akaike Information Criterion) para análises de Máxima Verossimilhança (ML) e o BIC (Bayesian Information Criterion) para inferências bayesianas. Foram analisadas combinações de dois modelos de substituição de nucleotídeos: modelo HKY (Hasegawa-Kishino-Yano, 1985) que diferencia taxas de substituição entre transição e transversões; modelo GTR (General Time Reversible) que define que cada mudança no nucleotídeo tenha taxas de substituição própria. Os modelos foram combinados com a distribuição gama (+G), com sítios invariantes (+I) ou ambos (+G+I).

Para a construção das árvores filogenéticas por inferência bayesiana no software BEAST, foram considerados os seguintes parâmetros: modelo de relógio molecular relaxado com distribuição lognormal, uso de frequências de base empíricas e o processo de especiação de Yule (assumindo que cada linhagem possui uma taxa fixa de especiação ao longo do tempo) como prior para as árvores, considerando 100 milhões de gerações – cuja topologias foram verificadas a cada 1000 gerações. Posteriormente, os parâmetros de ESS (Effective Sample Size) foram avaliados no Tracer v1.6 (Rambaut et al. 2014), sendo considerado satisfatórios valores acima de 200. As árvores resultantes desse processo foram sumarizadas no TreeAnnotator (parte do pacote BEAST) com descarte dos primeiros 10% das amostras como burn-in para obtenção das árvores consenso.

As árvores de *Máxima verossimilhança* (ML) tiveram o suporte dos nós estimados pela técnica de *bootstrap* a partir de 1000 pseudoréplicas (Felsenstein 1985). Por fim, as versões finais das árvores foram visualizadas no software FigTree v1.4 (Rambaut 2018) e editadas no programa de edição de gráficos vetoriais livre Inkscape (<https://inkscape.org/pt-br/>).

Para o enraizamento das árvores, sequências das espécies de caranguejos portunídeos do gênero *Charybdis* De Haan, 1833, *Arenaeus cribrarius* (Lamarck) e *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) foram incluídas como grupo externo em nossa análise filogenéticas dos marcadores COI, 12S, 16S e Cyt b. Para o marcador ATP/ ADP translocase, cujo sequenciamento de amostras da espécie *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) não foi bem-sucedido e para os quais não havia sequências disponíveis nos bancos de dados para esta espécie, foram utilizadas sequências disponíveis em bancos de dados públicos de *Portunus trituberculatus* (Miers, 1876) e *Scylla paramamosain* Estampador, 1950.

Construção das redes de haplótipos

A diversidade de haplótipos foi estimada utilizando o software DnaSP v6 (Rozas et al. 2017). Para representar as relações evolutivas entre os haplótipos de cada marcador, foram construídas redes utilizando o método *Median-Joining* (Bandelt et al. 1999) implementado no programa PopART v1.7 (Leigh e Bryant 2015).

Modelos de delimitação de espécies

Para realizar a análise de delimitação de espécies, foram utilizados quatro modelos: ABGD, ASAP, PTP e GMYC. Para todos os modelos de delimitação, foram utilizados os alinhamentos das sequências produzidas neste estudo, bem como aquelas disponíveis em bancos de dados públicos referentes ao gene citocromo oxidase subunidade I.

O método ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) (Puillandre et al. 2012), foi executado por meio da plataforma online (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>), na qual foi selecionado o modelo de distância (p-distance), que calcula a proporção de diferenças entre as sequências. Além disso, foram mantidos os parâmetros padrão da plataforma: valor mínimo e máximo de divergência intraespecífica ($P_{min} = 0,001$, $P_{max} = 0,1$); número de etapas recursivas e quantidade de intervalo (= 10, NBins = 20); largura relativa da lacuna (*gap width* = 1,5). O método ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning) (Puillandre et al. 2020) também foi aplicado via servidor online (o mesmo servidor utilizado no método ABGD) com o mesmo alinhamento como entrada. Para o cálculo das distâncias genéticas, foi selecionado o modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros (K80), fixada em 2.0 (valor que representa a razão entre a taxa de transições e a taxa de transversões).

Em relação ao modelo PTP (*Poisson Tree Processes*) (Zhang et al. 2013), utilizamos como arquivo de entrada a árvore filogenética de Máxima Verossimilhança gerada no *software* RAXM. O teste de delimitação foi realizado na plataforma online (<https://species.h->

[its.org/](#)) considerando os parâmetros padrões sugeridos pelo servidor. No caso do modelo GMYC (*Generalized Model Yule Coalescent*), utilizamos como arquivo de entrada a árvore ultramétrica por inferência bayesiana construídas no software BEAST, considerando os parâmetros mencionados na sessão de análise filogenética. A delimitação de espécies foi realizada no software R v. 4.1.0 (Venables et al. 2021) utilizando os pacotes APE e Splits na inferência.

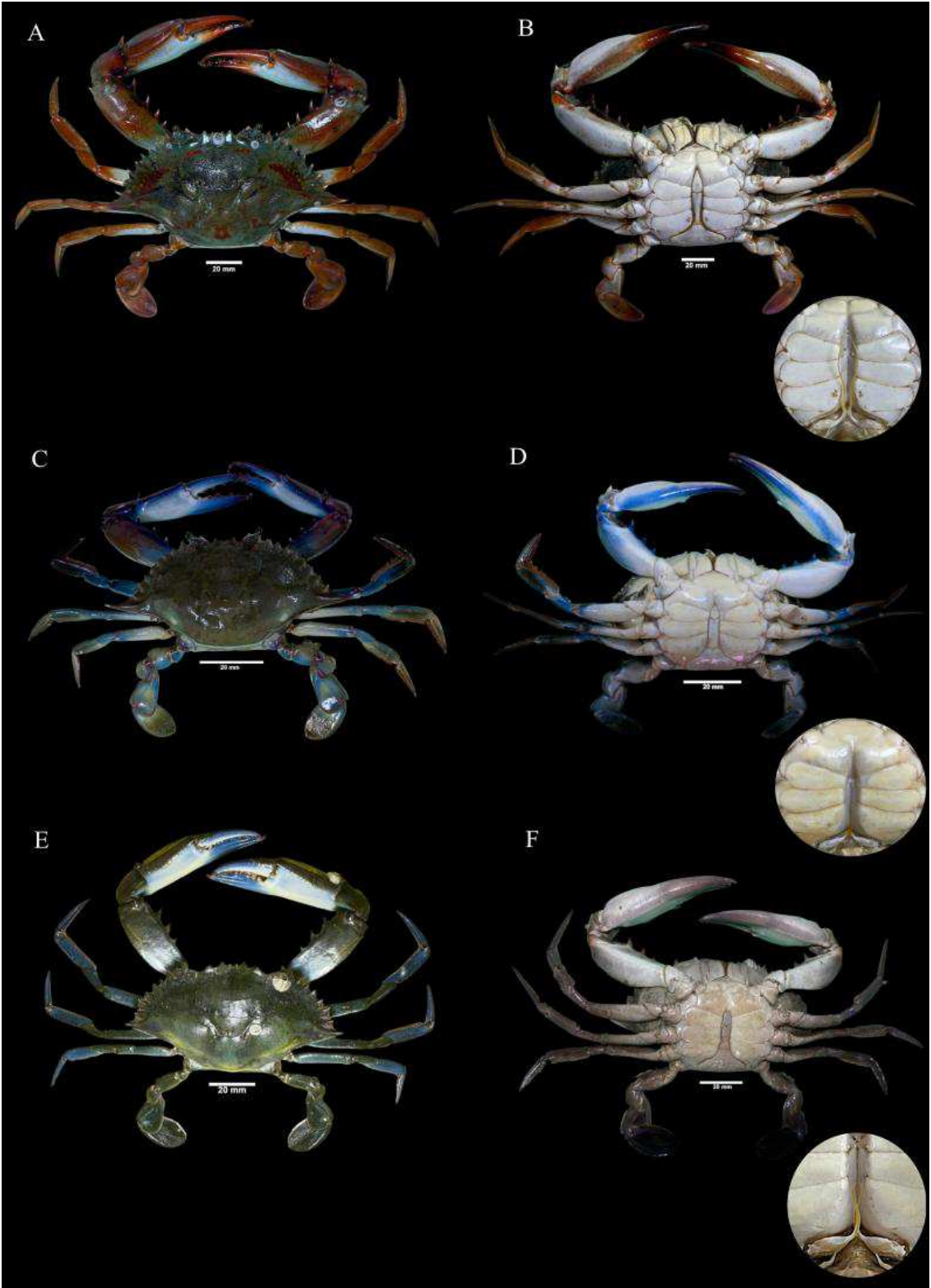
Resultados

Identificação morfológica

Foram coletados 117 espécimes de siris do gênero *Callinectes*. Deste total, 50 foram incluídos nas análises filogenéticas: 25 identificados como *Callinectes bocourti* Milne-Edwards, 13 como *Callinectes danae* Smith, 1869, seis como *Callinectes exasperatus* Gerstaecker, 1856, três como *Callinectes ornatus* Ordway, 1863, e três identificados como *Callinectes marginatus* (A. Milne-Edwards, 1861) (Fig. 2). Apesar da ocorrência registrada para o litoral maranhense, não foram coletadas amostras de *Callinectes sapidus*.

Variações morfológicas

Durante a identificação a maioria dos espécimes examinados apresentaram padrões morfológicos e de coloração consistentes com o que é descrito na literatura, sem variações significativas, exceto para *C. bocourti* e *C. exasperatus* que apresentaram variações em sua coloração. Em *C. bocourti*, a coloração típica da maioria dos exemplares foi predominantemente marrom-escuro e cinza-escuro (Fig. 2A), mas alguns exemplares apresentaram tons predominantes de vermelho-escuro e preto distribuídos na carapaça, quelípodos e pernas de caminhada. Em relação a *C. exasperatus*, os exemplares apresentaram coloração diferente do que é descrito na literatura, apresentando tons predominantemente cinza-escuro e azul-escuro distribuídos na carapaça, quelípodos e pernas de caminhada (Fig. 2E).



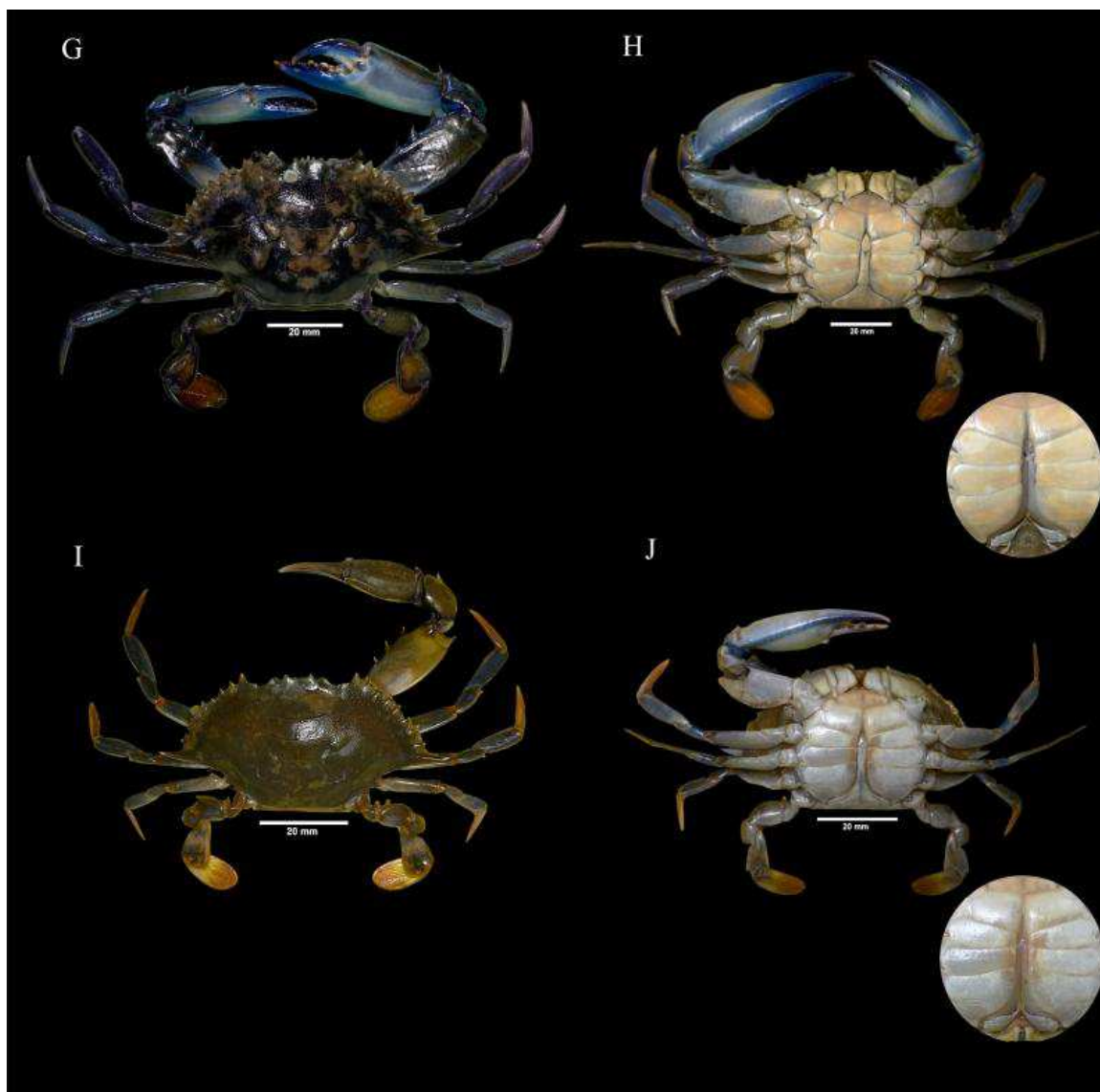


Fig. 2 Fotografia de espécimes do gênero *Callinectes* da costa Amazônica brasileira. a - Vista dorsal de *Callinectes bocourti*. b - Vista ventral de *Callinectes bocourti* (zoom dos gonópodes do macho); c - Vista dorsal de *Callinectes danae*. d - Vista ventral de *Callinectes danae* (zoom dos gonópodes do macho); e - Vista dorsal de *Callinectes exasperatus*. f- Vista ventral de *Callinectes exasperatus* (zoom dos gonópodes do macho); g - Vista dorsal de *Callinectes ornatus*. h - Vista ventral de *Callinectes ornatus* (zoom dos gonópodes do macho); i - Vista dorsal de *Callinectes marginatus*. j - Vista ventral de *Callinectes marginatus* (zoom dos gonópodes do macho).

Identificação molecular e análises filogenéticas

Foram produzidas 47 sequências de DNA, sendo 43 para o DNA mitocondrial (COI, 12S, 16S, Cyt b) e quatro para o DNA nuclear (ATP/ADP Translocase). Os resultados para cada marcador molecular serão apresentados em subseções abaixo.

Citocromo c oxidase subunidade I

As 21 sequências produzidas confirmaram o status taxonômico (98.27% a 100% de similaridade no BOLD e GenBank) de todas as espécies identificadas morfológicamente, exceto *C. marginatus*, cuja identificação não foi conclusiva em nenhum dos bancos de dados, apresentando índices de similaridade altos tanto para *C. marginatus* (99.84%) quanto para *C. larvatus* (99.20%) (Tabela 3).

Um alinhamento com comprimento médio de 620 pb foi gerado a partir de 18 sequências (três foram eliminadas devido ao pequeno tamanho em relação às outras): cinco sequências de *C. bocourti*, três de *C. danae*, cinco de *C. exasperatus*, três de *C. marginatus* e duas de *C. ornatus*. Além disso, foram incorporadas nas análises 60 sequências dos bancos de dados BOLD e GenBank correspondentes às mesmas espécies coletadas neste estudo e outras espécies do gênero *Callinectes*.

A árvore filogenética estimada a partir deste alinhamento mostrou que cada uma das espécies forma grupos monofiléticos exclusivos, com exceção de *C. marginatus* e *C. larvatus*, que juntas formam um único clado (Fig. 3). A topologia da árvore indica ainda a presença de duas linhagens principais, ambas com suporte moderado. O Grupo I é formado por oito espécies: *C. danae*, *C. similis*, *C. arcuatus*, *C. ornatus*, *C. pallidus*, *C. exasperatus*, *C. marginatus* e *C. larvatus*. O grupo II é formado por cinco espécies: *C. sapidus*, *C. toxotes*, *C. rathbunae*, *C. amnicola* e *C. bocourti*. *Callinectes bellicosus* não agrupa em nenhum dos dois grupos principais. A filogenia revela que a maioria das espécies que ocorrem no Maranhão

compartilha agrupamentos com populações de outras regiões do Brasil e do Caribe, com pouca ou nenhuma diferenciação genética (Fig. 3, Tabela 3).

As distâncias genéticas pareadas entre as espécies coletadas no Maranhão variou de 13% (*C. danae* x *C. exasperatus*) a 18% (*C. marginatus* x *C. exasperatus*) (Tabela 3). As distâncias genéticas entre as espécies do Maranhão com as de outros locais no Brasil e exterior foram de 6% (*C. aminicola* x *C. exasperatus*) a 18% (*C. aminicola* x *C. bocourti*) (Tabela 3).

Tabela 2 Similaridade (%) das sequências de COI das espécies de *Callinectes* coletadas com as sequências dos bancos de dados BOLD e GenBank.

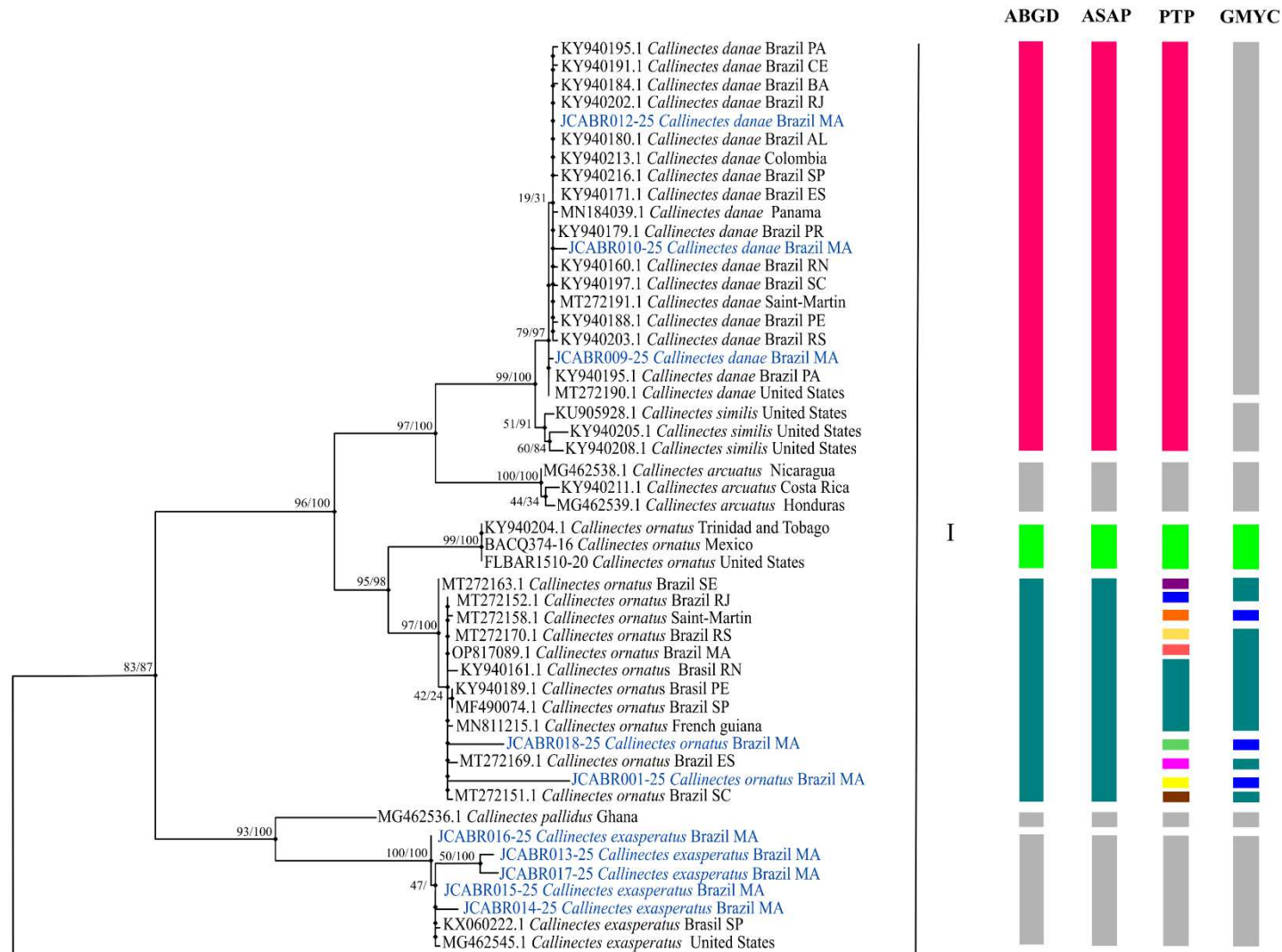
IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR			
	BOLD	%	GenBank	%
<i>Callinectes bocourti</i>	<i>Callinectes bocourti</i>	100	<i>Callinectes bocourti</i>	100
	-		-	
<i>Callinectes bocourti</i>	-	100	-	99.82
<i>Callinectes bocourti</i>	-	100	-	99.38
<i>Callinectes bocourti</i>	-	100	-	98.02
<i>Callinectes bocourti</i>	-	100	-	98.49
<i>Callinectes bocourti</i>	-	99.43	-	98.31
<i>Callinectes danae</i>	<i>Callinectes danae</i>	100	<i>Callinectes danae</i>	100
	-		-	
<i>Callinectes danae</i>	-	100	-	98.39
<i>Callinectes danae</i>	-	100	-	99.30
<i>Callinectes danae</i>	-	100	-	98.93
<i>Callinectes danae</i>	-	99.66	-	98.72
<i>Callinectes exasperatus</i>	<i>Callinectes exasperatus</i>	100	<i>Callinectes exasperatus</i>	100
	-		-	
<i>Callinectes exasperatus</i>	-	100	-	98.96
<i>Callinectes exasperatus</i>	-	99.52	-	98.27

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR			
	BOLD	%	GenBank	%
<i>Callinectes exasperatus</i>	-	99.50	-	98.71
<i>Callinectes exasperatus</i>	-	99.84		99.53
<i>Callinectes marginatus</i>	<i>Callinectes larvatus</i>	99.84	<i>Callinectes larvatus</i>	99.84
	<i>Callinectes marginatus</i>		<i>Callinectes marginatus</i>	
<i>Callinectes marginatus</i>	-	99.82	<i>Callinectes larvatus</i>	99.20
<i>Callinectes marginatus</i>	<i>Callinectes larvatus</i>	99.68	<i>Callinectes larvatus</i>	98.88
	<i>Callinectes marginatus</i>		<i>Callinectes marginatus</i>	
<i>Callinectes ornatus</i>	<i>Callinectes ornatus</i>	99.81	<i>Callinectes ornatus</i>	99.76
<i>Callinectes ornatus</i>	-	99.82	-	99.85

As sequências de COI de *Callinectes danae* de amostras do Maranhão agruparam em um único clado (com alto suporte) com sequências de amostras de outros Estados do Brasil (do Amapá ao Rio Grande do Sul) e países do Caribe (Colômbia e Panamá) sem indicação de diferenciação genética populacional, uma vez que as distâncias genéticas foram baixas (Fig. 3, Tabela 3). As sequências de *C. exasperatus* do Maranhão também agruparam em um único clado (com alto suporte) com sequências dessa mesma espécie do Brasil (São Paulo) e dos Estados Unidos, com pouca divergência genética entre elas (Fig. 3, Tabela 3). O mesmo ocorreu para *C. marginatus* do Maranhão em relação às sequências dessa espécie com origem no Brasil (Rio Grande do Norte) e Estados Unidos.

A sequência de COI de *Callinectes bocourti* do Maranhão agrupou com as outras sequências dessa espécie no Brasil (Amapá, São Paulo) e Caribe (Venezuela, Colômbia, Costa Rica e Porto Rico), formando um clado monofilético subdividido em subclados com suporte moderado e alto (Fig. 3), indicando a presença de diferentes linhagens dentro dessa espécie. No caso das amostras de *C. bocourti* do Maranhão, estas fazem parte de dois subclados bem suportados: um deles formado com amostras somente do Maranhão e outro grupo formado com amostras do Maranhão e do Amapá (Fig. 3). Esses dois subclados tem divergência de 1.1% entre si. A diferenciação genética entre as amostras de *C. bocourti* é mais baixa dentro da Costa Norte (Maranhão x Amapá = 1.1%) em comparação à São Paulo (2.3%). Na comparação com as populações do Caribe, as distâncias genéticas também indicaram divergência populacional variando de 1.5% a 1.9 % (Tabela 3).

O clado de *C. ornatus* também é subdividido em subclados distintos (com suporte alto): um formado com sequências de amostras do Maranhão e de outros Estados do Brasil (Pernambuco ao Rio Grande do Sul) e países do Caribe (Guiana Francesa e Saint Martin) e outro clado formado apenas por amostras dos Estados Unidos, Trinidad e Tobago e México (Fig. 3). As distâncias genéticas entre esses subclados foi de 6% (Tabela 3).



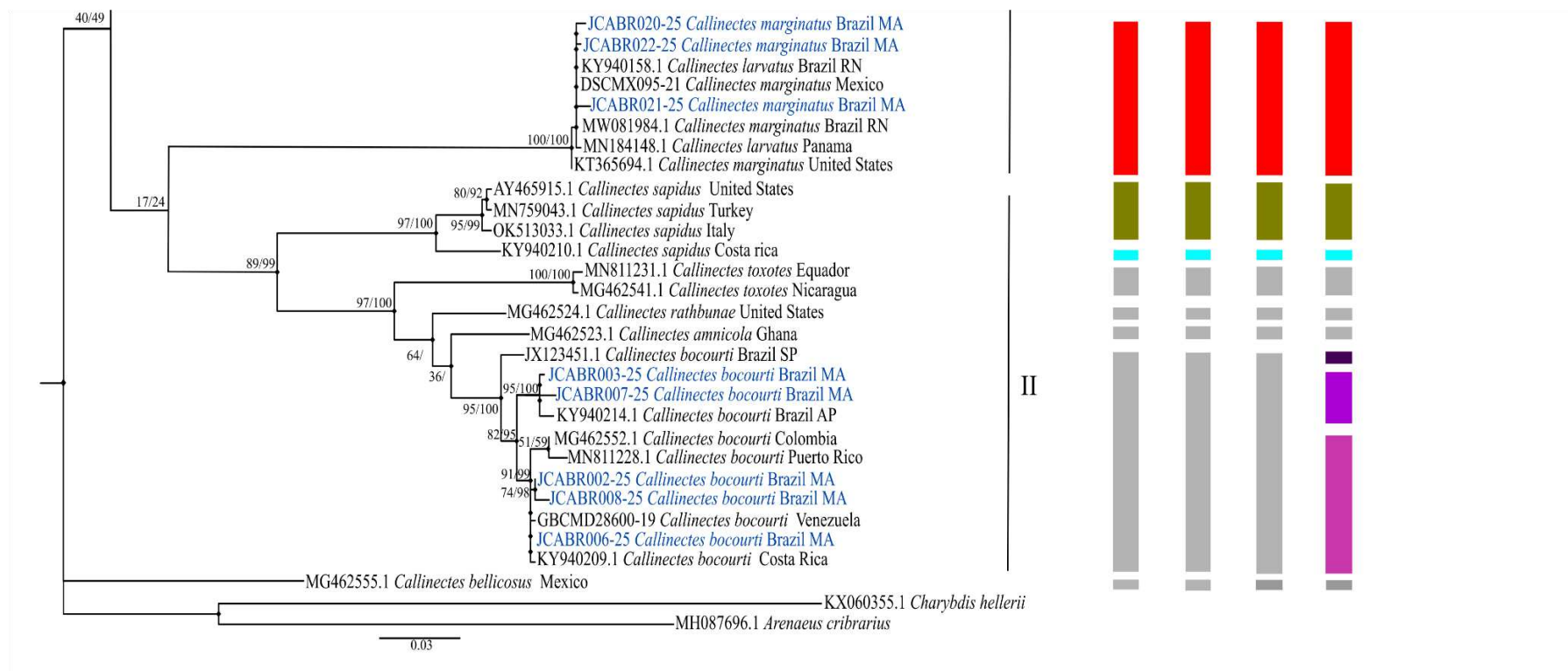


Fig. 3 Árvore filogenética combinada (*Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana*) construída a partir de sequências do gene Citocromo c oxidase subunidade I das espécies do gênero *Callinectes*. As barras laterais I e II representam as duas principais linhagens evolutivas de *Callinectes*; as barras coloridas demonstram os resultados dos métodos de delimitação de espécies (ABGD, ASAP, PTP, GMYC). Valores sobre os nós representam *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. A cor azul representa as sequências das espécies coletadas no Maranhão (costa Amazônica brasileira).

Tabela 3 Distâncias genéticas Kimura 2-parâmetros para o marcador COI das espécies de *Callinectes* que ocorrem no Maranhão (costa amazônica brasileira) e de outras retiradas do GenBank (MA: Maranhão; AP: Amapá; SP: São Paulo; RS: Rio Grande do Sul; RJ: Rio de Janeiro; SC: Santa Catarina; PA: Pará; CE: Ceará; PE: Pernambuco; BA: Bahia; AL: Alagoas; PR: Paraná; ES: Espírito Santo; RN: Rio Grande do Norte; SE: Sergipe). Na diagonal principal, em negrito, estão os valores de divergência intragrupo.

	1	2	3	4	5
1-C. bocourti Brazil MA	1,1				
2-C. danae Brazil MA	0,166	0,3			
3-C. exasperatus Brazil MA	0,170	0,137	1,0		
4-C. marginatus Brazil MA	0,161	0,159	0,182	0,6	
5-C. ornatus Brazil MA	0,180	0,122	0,179	0,182	3,2
<i>C. amnicola</i> Ghana	0,050	0,169	0,191	0,173	0,181
<i>C. arcuatus</i> Costa Rica	0,176	0,073	0,159	0,162	0,115
<i>C. arcuatus</i> Honduras	0,172	0,074	0,156	0,164	0,112
<i>C. arcuatus</i> Nicaragua	0,176	0,073	0,156	0,160	0,114
<i>C. bellicosus</i> Mexico	0,169	0,185	0,175	0,173	0,192
<i>C. bocourti</i> Brazil AP	0,014	0,163	0,167	0,152	0,180
<i>C. bocourti</i> Brazil SP	0,021	0,167	0,172	0,163	0,187
<i>C. bocourti</i> Venezuela	0,010	0,165	0,172	0,161	0,184
<i>C. bocourti</i> Colombia	0,008	0,167	0,167	0,159	0,186
<i>C. bocourti</i> Costa Rica	0,008	0,167	0,171	0,163	0,185
<i>C. bocourti</i> Puerto Rico	0,015	0,169	0,170	0,161	0,188
<i>C. danae</i> Brazil PA	0,166	0,003	0,138	0,157	0,121
<i>C. danae</i> Brazil AP	0,164	0,004	0,140	0,154	0,120
<i>C. danae</i> Brazil CE	0,169	0,004	0,140	0,159	0,124
<i>C. danae</i> Brazil BA	0,169	0,004	0,136	0,159	0,124
<i>C. danae</i> Brazil PE	0,169	0,004	0,140	0,154	0,120
<i>C. danae</i> Brazil RN	0,166	0,004	0,140	0,159	0,124
<i>C. danae</i> Brazil AL	0,166	0,002	0,138	0,157	0,122
<i>C. danae</i> Brazil ES	0,166	0,002	0,138	0,157	0,122
<i>C. danae</i> Brazil RJ	0,166	0,002	0,138	0,157	0,122
<i>C. danae</i> Brazil SP	0,163	0,002	0,135	0,157	0,124
<i>C. danae</i> Brazil PR	0,166	0,002	0,138	0,157	0,122
<i>C. danae</i> Brazil RS	0,168	0,005	0,142	0,161	0,121
<i>C. danae</i> Brazil SC	0,166	0,004	0,138	0,157	0,122
<i>C. danae</i> Colombia	0,166	0,002	0,138	0,157	0,122
<i>C. danae</i> Panama	0,165	0,004	0,140	0,159	0,124
<i>C. danae</i> Saint-Martin	0,166	0,002	0,138	0,157	0,122
<i>C. danae</i> United States	0,166	0,003	0,138	0,157	0,121
<i>C. exasperatus</i> Brazil SP	0,169	0,131	0,007	0,177	0,175

	1	2	3	4	5
<i>C. exasperatus</i> United States	0,169	0,135	0,008	0,182	0,179
<i>C. marginatus</i> Brazil RN	0,160	0,157	0,182	0,003	0,183
<i>C. larvatus</i> Panama	0,161	0,159	0,184	0,005	0,184
<i>C. marginatus</i> Brazil RN	0,160	0,157	0,182	0,003	0,183
<i>C. marginatus</i> Mexico	0,159	0,156	0,181	0,003	0,182
<i>C. marginatus</i> United States	0,158	0,155	0,180	0,005	0,185
<i>C. ornatus</i> Brazil PE	0,156	0,091	0,149	0,150	0,027
<i>C. ornatus</i> Brazil RN	0,154	0,093	0,148	0,148	0,025
<i>C. ornatus</i> Brazil SE	0,159	0,103	0,159	0,160	0,012
<i>C. ornatus</i> Brazil ES	0,165	0,107	0,163	0,163	0,012
<i>C. ornatus</i> Brazil RJ	0,162	0,105	0,159	0,160	0,010
<i>C. ornatus</i> Brazil SP	0,161	0,095	0,153	0,154	0,028
<i>C. ornatus</i> Brazil SC	0,165	0,104	0,161	0,163	0,010
<i>C. ornatus</i> Brazil RS	0,166	0,103	0,162	0,165	0,010
<i>C. ornatus</i> French Guiana	0,160	0,097	0,152	0,152	0,027
<i>C. ornatus</i> Saint-Martin	0,165	0,101	0,156	0,158	0,010
<i>C. ornatus</i> Trinidad and Tobago	0,168	0,108	0,165	0,164	0,079
<i>C. ornatus</i> Mexico	0,168	0,108	0,165	0,164	0,079
<i>C. ornatus</i> United States	0,168	0,108	0,165	0,164	0,079
<i>C. pallidus</i> Ghana	0,154	0,139	0,084	0,175	0,163
<i>C. rathbuanae</i> United States	0,051	0,171	0,175	0,176	0,185
<i>C. sapidus</i> Costa Rica	0,122	0,168	0,150	0,175	0,188
<i>C. sapidus</i> United States	0,122	0,152	0,151	0,172	0,194
<i>C. sapidus</i> Italy	0,122	0,154	0,153	0,177	0,196
<i>C. sapidus</i> Turkey	0,122	0,154	0,155	0,177	0,196
<i>C. similis</i> United States	0,169	0,017	0,148	0,152	0,121
<i>C. toxotes</i> Equador	0,097	0,199	0,173	0,183	0,198
<i>C. toxotes</i> Nicaragua	0,097	0,197	0,177	0,182	0,197
<i>Charybdis hellerii</i>	0,197	0,221	0,219	0,203	0,247
<i>Arenaeus cribrarius</i>	0,183	0,205	0,211	0,179	0,224

Citocromo b

Um alinhamento com comprimento de 330 pb foi gerado a partir de 12 sequências produzidas neste estudo (*C. bocourti*, *C. danae*, *C. exasperatus* e *C. ornatus*) e cinco do Genbank para outras espécies do gênero (*C. arcuatus*, *C. bellicosus* e *C. sapidus*). A árvore filogenética mostrou uma organização de clados com suporte estatístico alto correspondentes a cada espécie (Fig. 4), com a formação de grupos monofiléticos exclusivos para *C. exasperatus*, *C. ornatus* e *C. bocourti*.

No caso de *C. bocourti*, além da formação de um grupo monofilético com suporte elevado, foi observada a formação de dois subclados com suporte moderado e alto, a exemplo do que foi na árvore de COI, indicando a presença de diferentes linhagens dentro da espécie (2.6% de divergência). Esses dois subclados são formados por amostras de duas regiões diferentes: clado 1 é formado por amostras da Baía de São José e São Marcos; e clado 2 é formado apenas pela Baía de São José. Em termos populacionais, observou-se uma distância genética intragrupo de 1.8% e 0.3% entre as sequências que compõem, respectivamente, os dois clados de *C. bocourti* do Maranhão (Tabela 4), indicando a presença de divergência genética para esta espécie no Estado.

As distâncias genéticas entre as espécies coletadas no Maranhão variaram de 15% (*C. danae* x *C. exasperatus*) a 20% (*C. danae* x *C. bocourti*). As distâncias genéticas entre as espécies do Maranhão e as do México foram de 13% (*C. ornatus* x *C. arcuatus*) a 20% (*C. bocourti* x *C. arcuatus*) (Tabela 4).

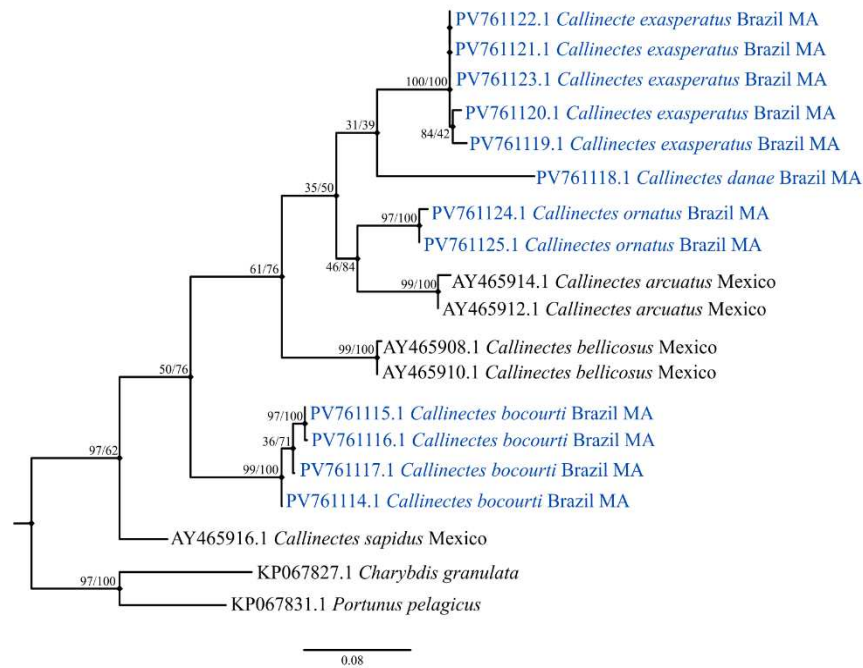


Fig. 4 Árvore filogenética combinada (*Máxima Verossimilhança* e *Inferência Bayesiana*) construída a partir de sequências do gene Citocromo b das espécies do gênero *Callinectes*. Valores sobre os nós representam *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. A cor azul representa as sequências das espécies coletadas no Maranhão (costa Amazônica brasileira).

Tabela 4 Distâncias genéticas Kimura 2-parâmetros para o Citocromo b das espécies de *Callinectes* que ocorrem na costa amazônica brasileira e de outras retiradas do GenBank. Na diagonal principal, em negrito, estão os valores de divergência intragrupo.

	1	2	2	3	4
1-C. bocourti Brazil MA 2	1,8				
2-C. bocourti Brazil MA 1	0,026	0,3			
3-C. danae Brazil MA	0,209	0,200	-		
4-C. exasperatus Brazil MA	0,211	0,202	0,155	1,4	
<i>C. ornatus</i> Brazil MA	0,197	0,181	0,184	0,1631	1,2
<i>C. arcuatus</i> Mexico	0,208	0,206	0,190	0,1822	0,132
<i>C. bellicosus</i> Mexico	0,178	0,165	0,181	0,1973	0,172
<i>C. sapidus</i> Mexico	0,157	0,147	0,162	0,1843	0,177
<i>Charybdis granulata</i>	0,217	0,212	0,210	0,2103	0,209
<i>Portunus pelagicus</i>	0,213	0,209	0,182	0,1921	0,210

16S rRNA

Para este marcador, um alinhamento com comprimento de 510 pb foi gerado a partir de oito sequências produzidas para as espécies do Maranhão (*C. bocourti*, *C. danae*, *C. exasperatus* e *C. marginatus*) e outras 41 disponíveis no banco de dados do Genbank para essas mesmas espécies e outras do gênero. A árvore filogenética do 16S também mostrou, a exemplo do COI, grupos monofiléticos com suportes moderados a altos correspondentes a cada espécie. A exceção foi o agrupamento de *C. marginatus* e *C. larvatus*, que, ao contrário das demais espécies, não formaram clados separados, mas sim um único grupo bem sustentado, a exemplo do que ocorreu na árvore de COI (Fig. 5).

Assim como o COI, a topologia da árvore indica a presença de duas linhagens principais, diferindo do COI pela presença de *C. bellicosus* no Grupo I e a ausência de sequências disponíveis para *C. pallidus* e *C. amnicola*. O Grupo I é formado por oito espécies: *C. danae*, *C. similis*, *C. arcuatus*, *C. ornatus*, *C. exasperatus*, *C. marginatus*, *C. larvatus*, *C. bellicosus*; o Grupo II é formado por quatro espécies: *C. sapidus*, *C. toxotes*, *C. rathbunae* e *C. bocourti*.

As distâncias genéticas entre as espécies coletadas no Maranhão variaram de 3.5% (*C. danae* x *C. exasperatus*) a 8.2% (*C. bocourti* x *C. marginatus*). As distâncias genéticas entre as espécies do Maranhão e as de outros locais no Brasil e exterior foram de 2% (*C. arcuatus* x *C. danae*) a 9 % (*C. sapidus* x *C. larvatus*) (Tabela 5). Nenhuma das espécies coletadas no Maranhão apresentou grande divergência nesse marcador quando suas populações são comparadas com outras de localidades no Brasil e no exterior (Tabela 5).

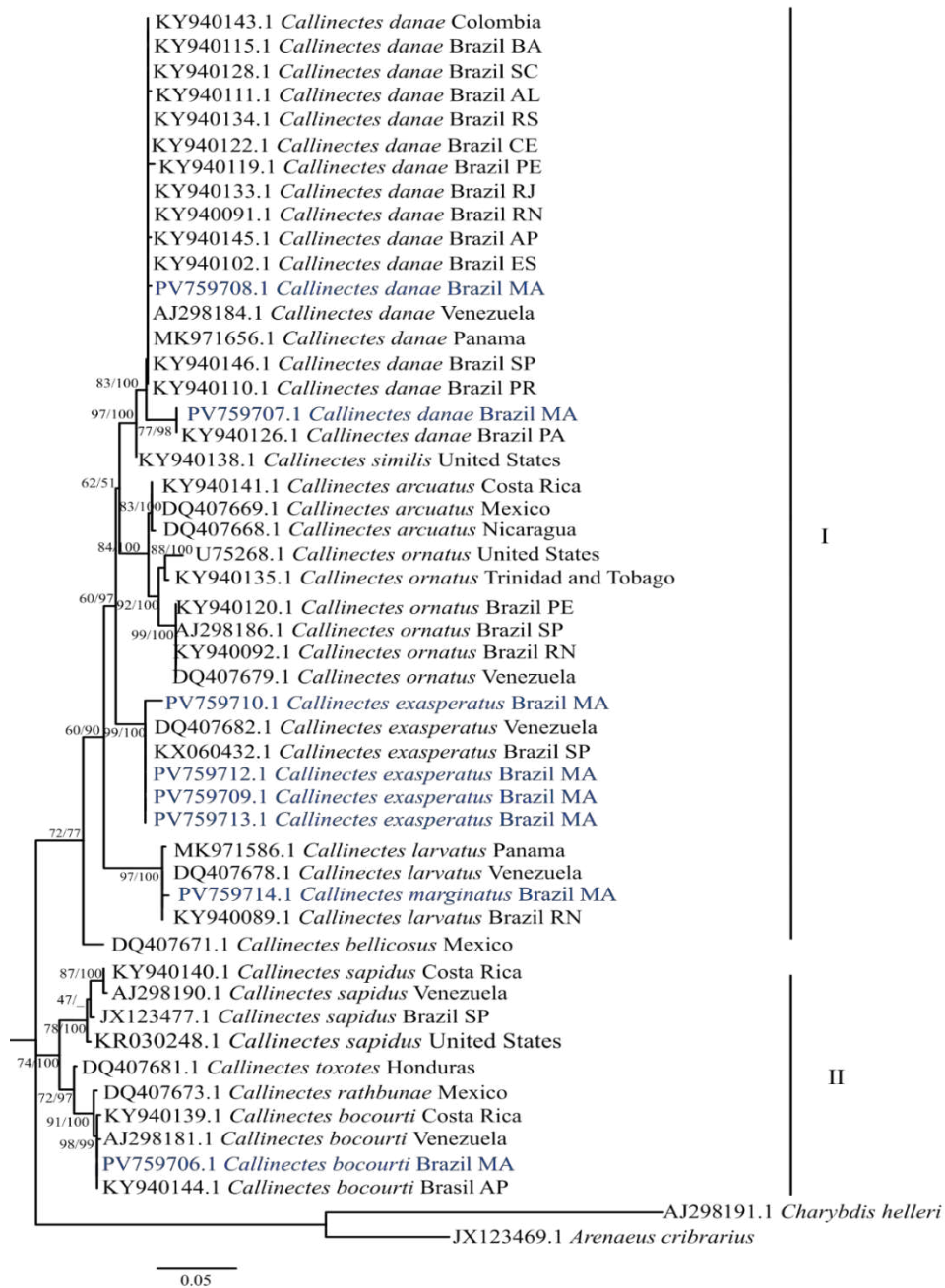


Fig. 5 Árvore filogenética combinada (*Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana*) construída a partir de sequências do gene 16S rRNA das espécies do gênero *Callinectes*. Valores sobre os nós representam *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. A cor azul representa as sequências das espécies coletadas na costa Amazônica brasileira.

Tabela 5 Distâncias genéticas Kimura 2-parâmetros para o marcador rRNA 16S das espécies de *Callinectes* que ocorrem na costa amazônica brasileira e de outras retiradas do GenBank (MA: Maranhão; AP: Amapá; SP: São Paulo; RS: Rio Grande do Sul; RJ: Rio de Janeiro; SC: Santa Catarina; PA: Pará; CE: Ceará; PE: Pernambuco; BA: Bahia; AL: Alagoas; PR: Paraná; ES: Espírito Santo; RN: Rio Grande do Norte).

	1	2	3	4
1- <i>C. bocourti</i> Brazil MA				
2- <i>C. danae</i> Brazil MA	0,074			
3- <i>C. exasperatus</i> Brazil MA	0,073	0,037		
4- <i>C. marginatus</i> Brazil MA	0,081	0,060	0,055	
<i>C. arcuatus</i> Costa Rica	0,071	0,021	0,027	0,053
<i>C. arcuatus</i> Mexico	0,071	0,021	0,027	0,053
<i>C. arcuatus</i> Nicaragua	0,069	0,021	0,029	0,054
<i>C. bellicosus</i> Mexico	0,066	0,036	0,048	0,062
<i>C. bocourti</i> Brazil SP	0,000	0,074	0,073	0,081
<i>C. bocourti</i> Costa Rica	0,001	0,076	0,075	0,084
<i>C. bocourti</i> Venezuela	0,001	0,074	0,071	0,082
<i>C. danae</i> Brazil AP	0,072	0,004	0,039	0,057
<i>C. danae</i> Brazil PA	0,072	0,002	0,035	0,057
<i>C. danae</i> Brazil CE	0,075	0,002	0,037	0,059
<i>C. danae</i> Brazil BA	0,075	0,002	0,037	0,059
<i>C. danae</i> Brazil PE	0,072	0,006	0,041	0,064
<i>C. danae</i> Brazil RN	0,073	0,002	0,037	0,057
<i>C. danae</i> Brazil AL	0,077	0,004	0,039	0,061
<i>C. danae</i> Brazil ES	0,075	0,002	0,037	0,059
<i>C. danae</i> Brazil RJ	0,075	0,002	0,037	0,059
<i>C. danae</i> Brazil SP	0,075	0,001	0,037	0,059
<i>C. danae</i> Brazil PR	0,075	0,002	0,037	0,059
<i>C. danae</i> Brazil SC	0,075	0,002	0,037	0,059
<i>C. danae</i> Brazil RS	0,075	0,001	0,037	0,059
<i>C. danae</i> Colombia	0,075	0,002	0,037	0,059
<i>C. danae</i> Panama	0,075	0,002	0,037	0,059
<i>C. danae</i> Venezuela	0,073	0,002	0,037	0,057
<i>C. exasperatus</i> Brazil SP	0,079	0,038	0,003	0,053
<i>C. exasperatus</i> Venezuela	0,071	0,034	0,002	0,053
<i>C. larvatus</i> Brazil RN	0,077	0,055	0,051	0,003
<i>C. larvatus</i> Panama	0,077	0,055	0,051	0,005
<i>C. larvatus</i> Venezuela	0,077	0,055	0,051	0,003
<i>C. ornatus</i> Brazil PE	0,068	0,038	0,043	0,057
<i>C. ornatus</i> Brazil RN	0,068	0,038	0,043	0,057

	1	2	3	4
<i>C. ornatus</i> Brazil SP	0,068	0,038	0,043	0,057
<i>C. ornatus</i> Trinidad and Tobago	0,073	0,030	0,039	0,053
<i>C. ornatus</i> Venezuela	0,068	0,038	0,043	0,057
<i>C. ornatus</i> United States	0,085	0,040	0,050	0,063
<i>C. rathbunae</i> Mexico	0,007	0,070	0,066	0,082
<i>C. sapidus</i> Brazil SP	0,028	0,073	0,072	0,091
<i>C. sapidus</i> Venezuela	0,028	0,073	0,068	0,082
<i>C. sapidus</i> Costa Rica	0,030	0,071	0,070	0,084
<i>C. sapidus</i> United States	0,026	0,071	0,070	0,088
<i>C. similis</i> United States	0,073	0,008	0,031	0,057
<i>C. toxtes</i> Honduras	0,015	0,067	0,064	0,081
<i>Charybdis helleri</i>	0,171	0,166	0,165	0,169
<i>Arenaeus cribrarius</i>	0,136	0,148	0,148	0,142

12S rRNA

Um alinhamento com comprimento de 380 pb foi gerado a partir de duas sequências produzidas neste estudo para *C. exasperatus* e 17 extraídas do banco de dados Genbank para outras espécies do gênero. A árvore filogenética deste marcador não recuperou grupos monofiléticos para *C. bocourti*, *C. toxotes* e *C. sapidus* (Fig. 6). Apesar de *C. larvatus* formar um grupo monofilético, não foi possível avaliar se, também no 12S, *C. marginatus* e *C. larvatus* formam um único grupo monofilético, pois não há sequências de *C. marginatus* no GenBank para este marcador e não obtivemos sucesso no sequenciamento dessa espécie, bem como de outras espécies (*C. bocourti*, *C. danae* e *C. ornatus*) coletadas em nosso estudo.

Além disso, a árvore de 12S também evidenciou os mesmos dois grupos principais presentes na filogenia do COI, diferindo deste pela presença de *C. bellicosus* no Grupo I. O Grupo I é composto por sete espécies: *C. danae*, *C. similis*, *C. exasperatus*, *C. larvatus*, *C. arcuatus*, *C. ornatus* e *C. bellicosus*. O grupo II é formado por cinco espécies: *C. sapidus*, *C. bocourti*, *C. toxotes*, *C. rathbunae* e *C. affinis*.

As distâncias genéticas entre *C. exasperatus* do Maranhão e outras espécies do gênero variaram de 5.3% (*C. exasperatus* x *C. danae*) a 9 % (*C. exasperatus* x *C. bocourti*) (Tabela 6). As amostras de *C. exasperatus* do Maranhão formaram um grupo monofilético com amostra de *C. exasperatus* da Venezuela com alto suporte (Fig. 6). A distância genética entre as amostras do Maranhão e da Venezuela é pequena (Tabela 6)

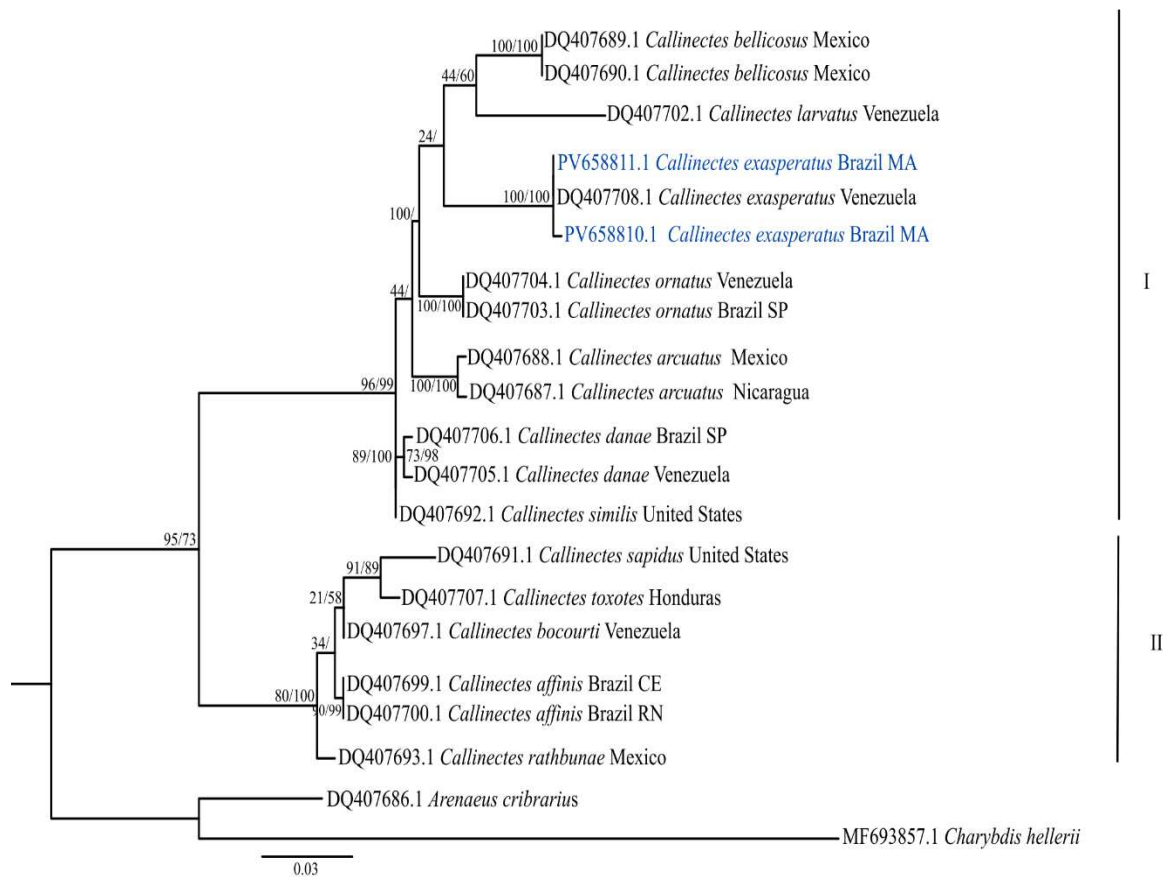


Fig. 6 Árvore filogenética combinada (*Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana*) construída a partir de sequências do gene 12S rRNA das espécies do gênero *Callinectes*. Valores sobre os nós representam *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. A cor azul representa as sequências das espécies coletadas no Maranhão (costa Amazônica brasileira).

Tabela 6 Distâncias genéticas Kimura 2-parâmetros para o marcador 12S rRNA das espécies de *Callinectes* que ocorrem no Maranhão (costa amazônica brasileira) e de outras retiradas do GenBank (MA: Maranhão; SP: São Paulo; RN: Rio Grande do Norte; CE: Ceará).

	1	2	3	4
1. <i>C. exasperatus</i> Brazil MA				
2. <i>C. affinis</i> Brazil CE	0,122			
3. <i>C. affinis</i> Brazil RN	0,122	0,000		
4. <i>C. arcuatus</i> Mexico	0,058	0,099	0,099	
<i>C. arcuatus</i> Nicaragua	0,060	0,099	0,099	0,005
<i>C. bellicosus</i> Mexico	0,051	0,090	0,090	0,046
<i>C. danae</i> Brazil SP	0,048	0,090	0,090	0,026
<i>C. danae</i> Venezuela	0,048	0,090	0,090	0,026
<i>C. exasperatus</i> Venezuela	0,001	0,123	0,123	0,058
<i>C. larvatus</i> Venezuela	0,072	0,099	0,099	0,057
<i>C. ornatus</i> Brazil SP	0,054	0,106	0,106	0,032
<i>C. ornatus</i> Venezuela	0,054	0,106	0,106	0,032
<i>C. rathbunae</i> Mexico	0,116	0,013	0,013	0,099
<i>C. sapidus</i> United States	0,125	0,029	0,029	0,112
<i>C. similis</i> United States	0,042	0,084	0,084	0,021
<i>C. toxotes</i> Honduras	0,125	0,021	0,021	0,106
<i>Charybdis hellerii</i>	0,200	0,169	0,169	0,203
<i>Arenaeus cribrarius</i>	0,130	0,121	0,121	0,143

ATP/ADP Translocase

Para este marcador, foi produzido um alinhamento com comprimento de 430 pb a partir de quatro sequências produzidas neste estudo (*C. danae*, *C. exasperatus* e *C. bocourti*) e seis extraídas do banco de dados Genbank para outras espécies. A árvore filogenética não conseguiu recuperar clados monofiléticos exclusivos para todas as espécies analisadas (Fig. 7). As sequências de *C. danae* e *C. exasperatus* do Maranhão agruparam-se em um clado (suporte moderado) com distâncias genéticas próximas de zero (Tabela 7). As distâncias genéticas entre as espécies do Maranhão variaram de 0.2% a 1.6%, enquanto para as amostras de *C. sapidus* e *C. similis* do México houve variação de 0.2% a 2.3% para este marcador.

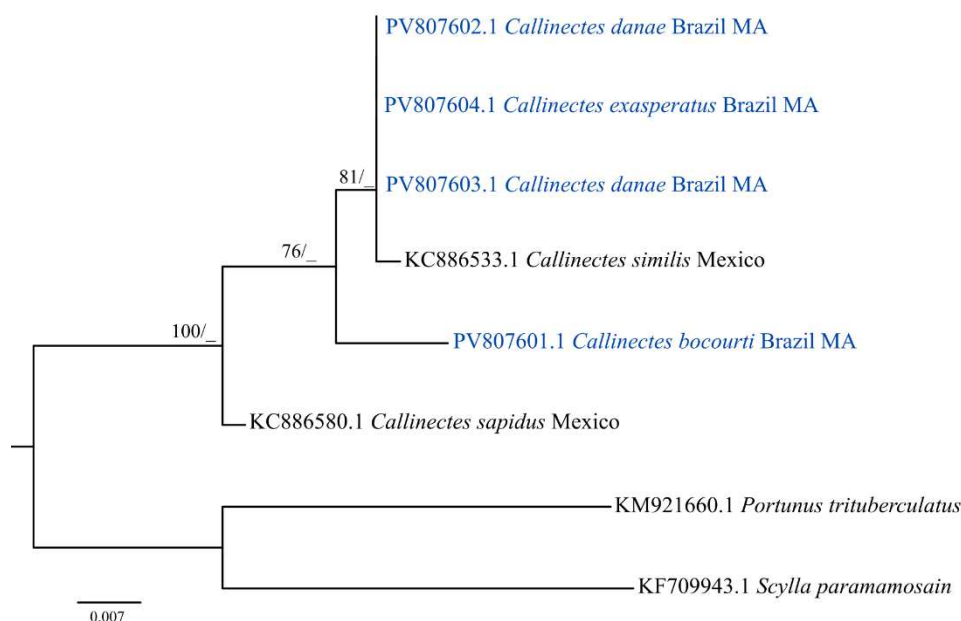


Fig. 7 Árvore filogenética combinada (*Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana*) construída a partir de sequências do gene ATP/ADP Translocase das espécies do gênero *Callinectes*. Valores sobre os nós representam *bootstrap* e a probabilidade posterior, respectivamente. Não foram exibidos probabilidade posterior com valores inferiores a 0.1. A cor azul representa as sequências das espécies coletadas no Maranhão (costa Amazônica brasileira).

Tabela 7 Distâncias genéticas Kimura 2-parâmetros para o gene ATP/ADP Translocase das espécies de *Callinectes* que ocorrem no Maranhão (costa amazônica brasileira) e de outras retiradas do GenBank.

	1	2	3
1-C. exasperatus MA			
2-C. bocourti MA	0,017		
3-C. danae MA	0,000	0,017	
<i>C. similis</i> México	0,003	0,020	0,003
<i>C. sapidus</i> México	0,015	0,023	0,015
<i>Portunus trituberculatus</i>	0,079	0,076	0,079
<i>Scylla paramamosain</i>	0,079	0,076	0,079

Métodos de delimitações de espécies

Os quatro métodos de delimitação de espécies (ABGD, ASAP, PTP e GMYC) mostraram resultados semelhantes (Fig. 3). Os modelos de delimitação baseados em matrizes de distância (ABGD e ASAP) recuperaram 14 MOTUs. Parte dessas MOTUs mostrou concordância com as análises morfológicas e com a identificação atribuída para as sequências extraídas dos bancos de dados.

No entanto, foram observadas incongruências em determinados táxons, como é o caso das amostras de *C. danae* e *C. marginatus*. *Callinectes danae* e *C. similis* foram recuperadas como uma única MOTU (1.7% de distância genética). O mesmo ocorreu para as amostras de *C. marginatus* e *C. larvatus* (0.3 e 0.5 % de distância genética). Além disso, as amostras de *C. ornatus* foram atribuídas a duas MOTUs (3% de distância genética), uma contendo, majoritariamente, amostras de diferentes localidades do Brasil (de Pernambuco ao Rio Grande do Sul), incluindo as amostras do Maranhão; e outra contendo amostras de países do Caribe e dos Estados Unidos.

Os modelos de delimitação baseados em árvores filogenéticas (PTP e GMYC) apresentaram resultados parecidos. O método PTP identificou 23 MOTUs, enquanto o GMYC recuperou 22 MOTUs (Fig. 3). Parte dessas unidades mostrou concordância com a análise morfológica e com a identificação atribuída para as sequências extraídas dos bancos de dados. De modo geral, os resultados observados nestes dois modelos coincidem com os obtidos pelos modelos baseados em distância genética (ABGD e ASAP), especialmente no que diz respeito às incongruências entre *Callinectes danae* e *C. similis* (detectadas apenas no método PTP), bem como entre *C. marginatus* e *C. larvatus* que também agruparam em uma única MOTU. No entanto, a configuração observada para *C. ornatus* foi diferente. Enquanto os modelos ABGD e ASAP recuperaram apenas duas MOTUs, o GMYC identificou apenas três,

enquanto o PTP se destacou identificando um total de dez MOTUs distintas, sendo que destas 9 MOTUs distintas foram detectadas no conjunto de amostras majoritariamente do Brasil (de Pernambuco ao Rio Grande do Sul).

O modelo GMYC foi o único a recuperar três MOTUs para *C. bocourti*. A primeira é formada por amostras do Maranhão e Amapá. A segunda inclui amostras do Maranhão, Colômbia, Porto Rico, Venezuela e Costa Rica. A terceira MOTUs é formada por apenas uma amostra de São Paulo. A divergência genética é de 3% entre a MOTUs 1 e 2, e varia de 2% e 4% da MOTU 3 em relação a 2 e 1, respectivamente.

Embora as amostras de *C. sapidus* não façam parte de nossa amostragem, as análises realizadas a partir de sequências disponíveis nos bancos de dados revelam que todos os modelos de delimitação (ABGD, ASAP, PTP e GMYC) recuperaram duas MOTUs: uma contendo amostras dos Estados Unidos, Itália e Turquia, e outra com amostras da Costa Rica (Fig. 3), apresentando divergência genética de 4% entre elas (Tabela 3).

As demais espécies analisadas, que também não fizeram parte da nossa amostragem, foram delimitadas como MOTUs exclusivas, mostrando concordância com a identificação atribuída às sequências extraídas nos bancos de dados. Dentre elas, *Callinectes arcuatus* Ordway e *Callinectes toxotes* Ordway foram recuperadas em suas respectivas MOTUs: a primeira recuperada com amostras da Nicarágua, Costa Rica e Honduras; e a segunda com amostras da Nicarágua e Equador (Fig. 3). As espécies *Callinectes pallidus* (de Rochebrune, 1883), *Callinectes amnicola* (de Rochebrune, 1883), *Callinectes rathbunae* Contreras, 1930, *Callinectes bellicosus* (Stimpson, 1859) também foram recuperadas em MOTUs exclusivas (Fig. 3), porém cada uma está representada por apenas uma sequência extraída dos bancos de dados.

Diversidade e divergência intraespecífica

Callinectes danae

A rede de haplótipos construída com 69 sequências do gene COI de *C. danae* revelou haplótipos distribuídos em uma topologia em forma de estrela (ou *star shape*) (Fig. 12). As amostras do Maranhão estão representadas tanto por haplótipos exclusivos quanto por haplótipos compartilhados com outras localidades brasileiras (Amapá ao Rio Grande do Sul) e de fora do Brasil (Panamá, Colômbia, Saint Martin e Estados Unidos), reforçando a ausência de estruturação genética e sugerindo alto fluxo gênico entre populações ao longo da sua distribuição (Fig. 12).

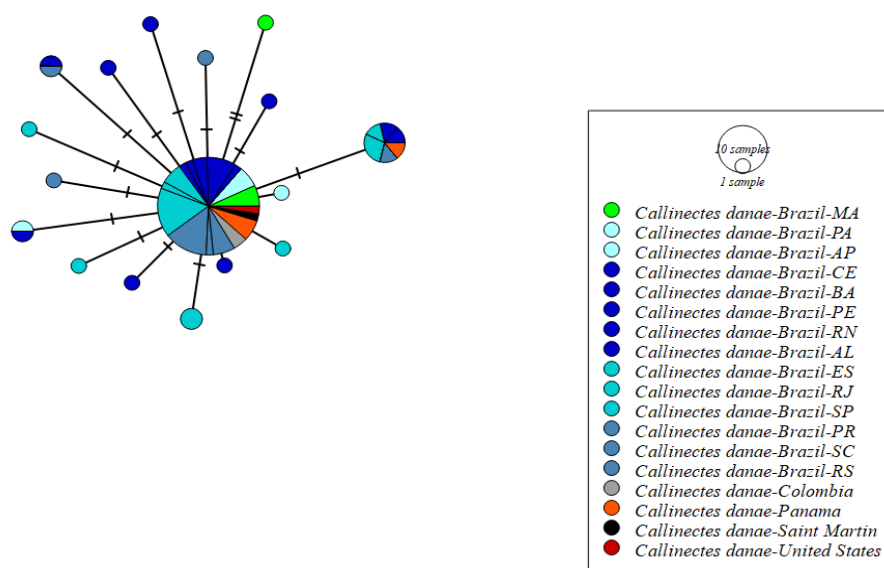


Fig. 12 Rede de haplótipos de *Callinectes danae* construída a partir de sequências do gene COI e calculada pelo método de median-joining. Os haplótipos são representados por cores de acordo com o local de origem das amostras: verde refere-se aos haplótipos do Maranhão, tons de azul representa diferentes localidades do Brasil e outras cores indicam amostras de outros países.

Callinectes exasperatus

A rede de haplótipos para *C. exasperatus* construída a partir de nove sequências do marcador COI apresentou um padrão no formato de estrela, revelando um total de sete haplótipos distintos (Fig. 12). As amostras do Maranhão estão representadas tanto por haplótipos exclusivos quanto por haplótipos compartilhados com outras regiões (São Paulo e Estados Unidos) mostrando conectividade com outras populações (Fig. 12). Porém, o número limitado de sequências disponíveis nos bancos de dados limita maiores inferências sobre a diversidade genética e divergência genética dentro desta espécie.

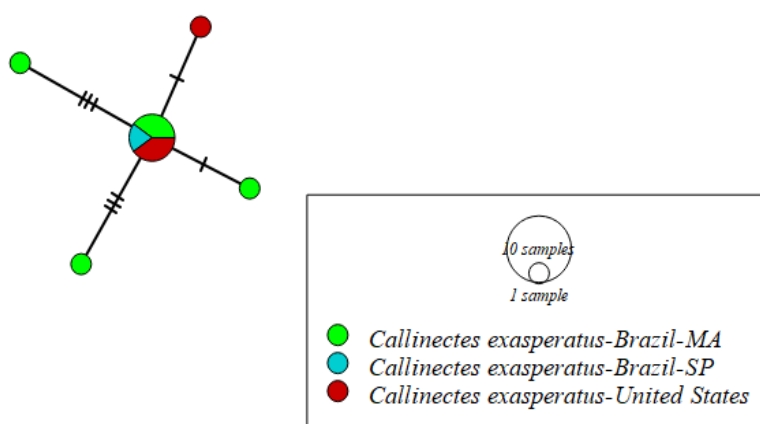


Fig. 12 Rede de haplótipos da espécie *Callinectes exasperatus* construída a partir de sequências do gene COI e calculada pelo método de median-joining. Os haplótipos são representados por cores de acordo com o local de origem das amostras: verde refere-se aos haplótipos do Maranhão, azul representa outra amostra do Brasil (São Paulo) e vermelho indica amostras dos Estados Unidos.

Callinectes marginatus/Callinectes larvatus

A rede de haplótipos construída utilizando 12 sequências do marcador COI, seis da espécie *C. marginatus* e seis da espécie *C. larvatus*, exibiu um padrão no formato de estrela (com amostras de ambas as espécies agrupadas no mesmo conjunto de haplótipos) (Fig. 13). A rede apresentou haplótipos distintos de diferentes localidades. Amostras de *C. marginatus* do Maranhão apresentaram três haplótipos exclusivos, que estão conectados ao haplótipo central por poucas mutações, cada um representado por uma única sequência, sugerindo alguma divergência genética intraespecífica. O haplótipo central abrange indivíduos de ambas as espécies de diferentes localidades (Brasil, Panamá e México) (Fig. 13).

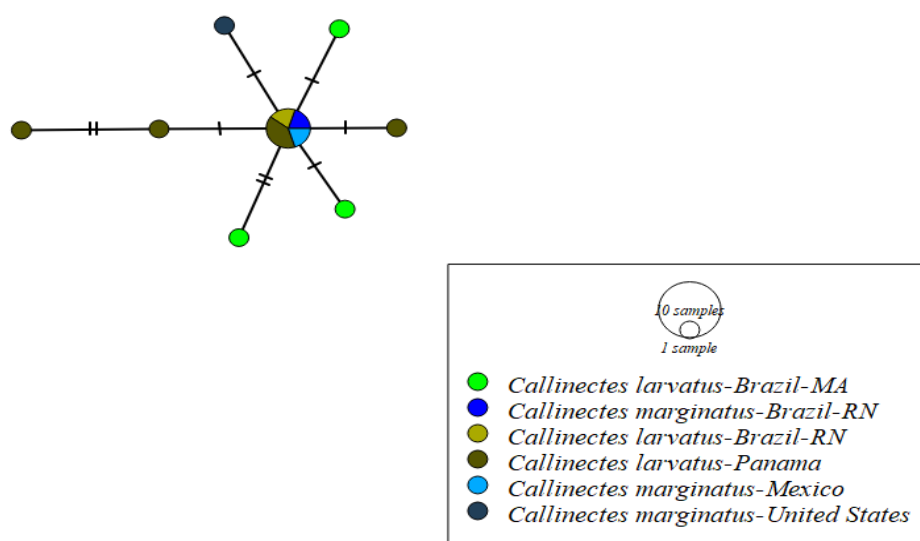


Fig. 13 Rede de haplótipos da espécie *Callinectes larvatus* construída a partir de sequências do gene COI e calculada pelo método de median-joining. Os haplótipos são representados por cores de acordo com a espécie e o local de origem das amostras: tons verdes referem-se aos haplótipos de *C. larvatus* do Maranhão e de outras localidades; haplótipos em tons azuis representam de *C. marginatus* do Brasil (Rio Grande do Norte) Estados Unidos e do México.

Callinectes bocourti

A rede de haplótipos construída a partir de 25 sequências do marcador COI de *C. bocourti* revelou haplótipos distintos de diferentes localidades (Fig. 14). As amostras do Maranhão formaram dois grupos bem definidos que não compartilham haplótipos entre si, separados por três passos mutacionais: um grupo representado por haplótipos do Maranhão e diferentes países caribenhos (Venezuela, Colômbia, Costa Rica e Porto Rico); um grupo representado por amostras do Maranhão compartilhando haplótipos com Colômbia e Porto Rico, e conectado com haplótipos do Amapá e São Paulo, ambos haplótipos exclusivos separados por quatro e oito passos mutacionais, respectivamente (Fig. 14).

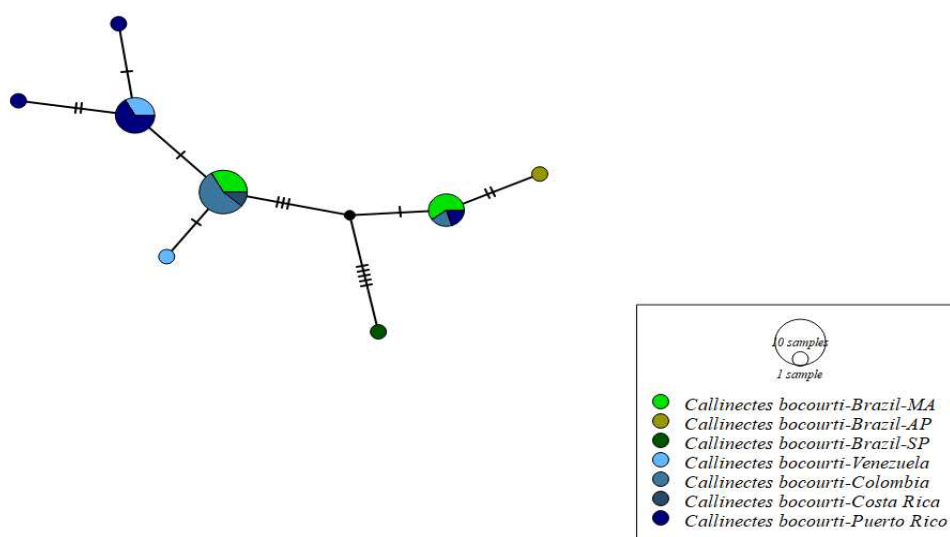


Fig. 14 Rede de haplótipos da espécie *Callinectes bocourti* construída a partir de sequências do gene COI e calculada pelo método de median-joining. Os haplótipos são representados por cores de acordo com o local de origem das amostras: tons verdes referem-se aos haplótipos do Maranhão, Amapá e São Paulo; tons azuis indicam amostras da Venezuela, Colômbia, Costa Rica e Porto Rico.

Callinectes ornatus

A rede de haplótipos construída a partir de 84 sequências do marcador COI de *C. ornatus* revelou haplótipos distintos de diferentes localidades. A rede resultante exibiu um padrão semelhante com o que foi observado na filogenia, evidenciando dois grupos bem definidos que não compartilham haplótipos entre si, separados por vários passos mutacionais. Um desses grupos (haplótipos nos tons azuis e verde) é formado por amostras do Maranhão junto com outros locais do Brasil – de Pernambuco ao Rio Grande do Sul – e do Caribe – Guiana Francesa e Saint Martin. O segundo grupo (haplótipos nos tons vermelho e laranja) é formado por amostras do Estados Unidos, Trinidad e Tobago, Saint Martin e México (Fig. 15).

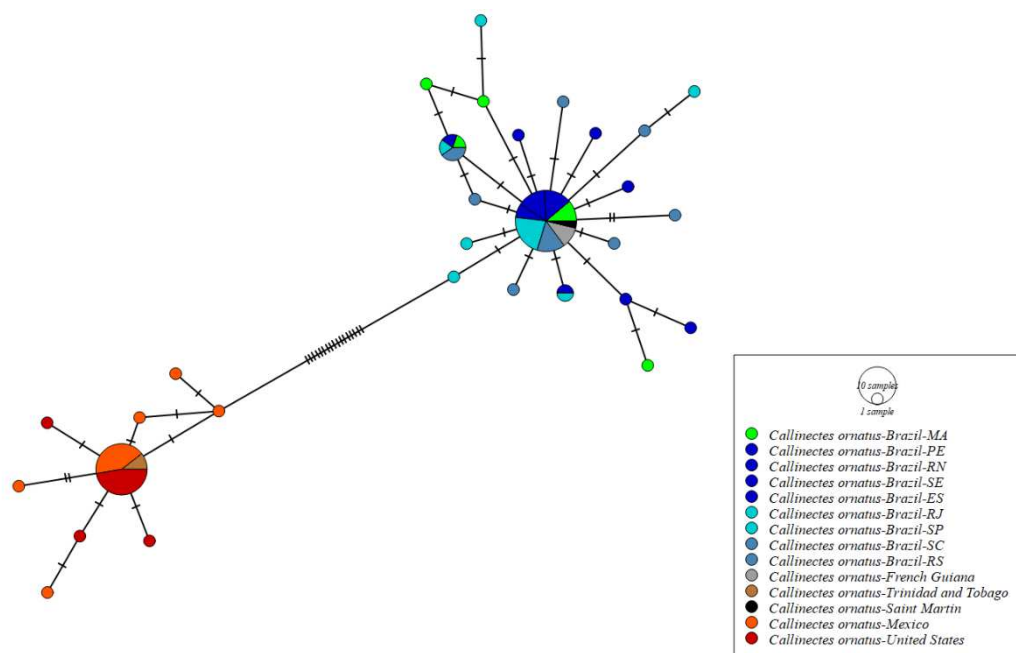


Fig. 15 Rede de haplótipos da espécie *Callinectes ornatus* construída a partir de sequências do gene COI calculadas pelo método de median-joining. Os haplótipos são representados por cores de acordo com a região de origem das amostras: verde refere-se aos haplótipos do Maranhão, tons de azul representa diferentes localidades do Brasil e outras cores indicam amostras de outros países

Rede de haplótipos do marcador Cyt b

A rede de haplótipos foi construída a partir de quatro sequências do marcador Cyt b de *C. bocourti* da Baía de São Marcos e Baía de São José revelou haplótipos distintos organizados em dois grupos (duas linhagens) conectados entre si por um haplótipo hipotético (Median vector) e separados por cinco passo mutacionais (Fig. 15)

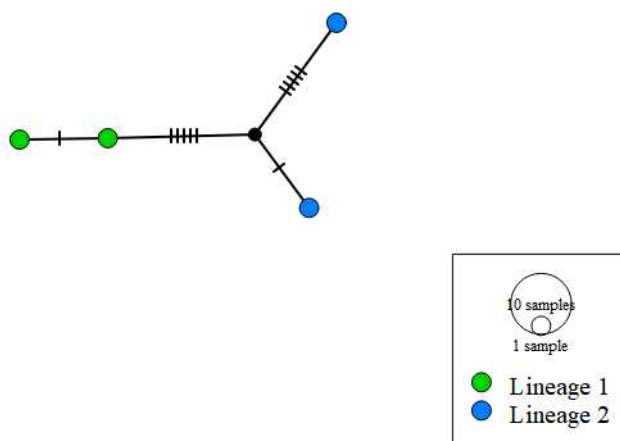


Fig. 15 Rede de haplótipos da espécie *Callinectes bocourti* construída a partir de sequências do gene Cyt b calculadas pelo método de median-joining. Os haplótipos são representados por cores de acordo com as duas linhagens presente na região do Maranhão: verde refere-se aos haplótipos da linhagem 1 e azul representa a linhagem 2.

Discussão

Este estudo mostra a ocorrência das seguintes espécies do gênero *Callinectes* na região mais oriental da costa Amazônica brasileira: *C. bocourti*, *C. danae*, *C. exasperatus*, *C. marginatus* e *C. ornatus*. Essas espécies foram confirmadas tanto pela identificação morfológica quanto pela identificação molecular, exceto *C. larvatus*, cuja identificação molecular apresentou divergência em relação à morfológica, pois a análise do gene COI indicou maior similaridade tanto com *C. larvatus* quanto com *C. marginatus*. Das espécies analisadas, apenas *C. bocourti* e *C. ornatus* apresentaram variações genéticas populacionais. Para *C. bocourti*, a divergência genética foi observada tanto entre populações das costas norte e sul do Brasil quanto em comparação com amostras provenientes do Caribe. Já em *C. ornatus*, a divergência foi detectada entre as amostras brasileiras e aquelas oriundas de países do Caribe e dos Estados Unidos.

Das cinco espécies que ocorrem no litoral maranhense, a única que não foi possível coletar exemplares foi *Callinectes sapidus*. De acordo com levantamentos anteriores da carcinofauna bêntica, a ocorrência dessa espécie em regiões estuarinas do litoral maranhense é considerada rara e esporádica (Sousa et al. 2015), o que, talvez, explique o insucesso de sua captura neste estudo, embora *C. sapidus* prefira áreas rasas de ambientes estuarinos (Ortega et al. 2020), ambiente que é abundante no litoral do Maranhão. Não se sabe se isso se repete em outras regiões da costa Amazônica brasileira, uma vez que, até o momento não há registro de *C. sapidus* neste litoral (Coelho et al. 2008; Mourão 2013). Fatores ecológicos que podem envolver competição com as outras espécies de *Callinectes* da região talvez estejam por trás dessa provável baixa densidade de *C. sapidus* na região, caso sua ocorrência ainda venha a ser confirmada. Outro fator que pode ter sido relevante é o fato de não termos realizado coletas em períodos possivelmente mais favoráveis à sua ocorrência.

Variação na coloração

Foram observadas variações de coloração em *C. bocourti* e *C. exasperatus*. *Callinectes exasperatus* apresentou coloração diferente daquela que é descrita na chave de identificação de Williams (1974) e Fransen (2014), que citam que o macho adulto apresenta coloração com tons variando do vermelho-arroxeadado, marrom e vermelho-alaranjado. Os exemplares na costa Amazônica maranhense apresentaram padrões diferentes, com tons predominantemente cinza-escuro e azul-escuro, distribuídos na carapaça, quelípodos e pernas de caminhada. Os exemplares de *C. bocourti* encontrados no litoral maranhense também apresentaram variações na coloração, sendo a maioria com coloração predominantemente marrom-escuro e cinza-escuro. Outros espécimes de *C. bocourti* da mesma região exibiram tons predominantes de vermelho-escuro e preto distribuídos na carapaça, quelípodos e pernas de caminhada.

Embora o padrão de cor seja considerado nas chaves de identificação, ele não é um fator determinante para identificação das espécies do gênero *Callinectes*. As chaves de identificação baseiam-se principalmente em aspectos do formato da carapaça, a estrutura dos quelípodos e, sobretudo, na disposição dos gonópodos dos machos adultos (Williams 1974; Melo 1997; Fransen 2014). Contudo, a coloração desempenha um papel relevante na compreensão da ecologia e fisiologia de diversos crustáceos decápodes, uma vez que também está relacionada ao comportamento críptico e termorregulatório (Wiese 2002; Stuart-Fox e Moussalli, 2008; Stevens et al. 2014; Watanabe et al. 2015). Em alguns casos, a coloração é utilizada como critério na diferenciação de espécies crípticas (ex: Gallardo-escárate et al. 2007).

Ainda que a coloração seja pré-determinada por fatores genéticos – muitos crustáceos podem mudar a sua cor por influência de estímulos endógenos e exógenos (Nery e Castrucci, 2002), sendo capazes de adaptar a sua coloração em relação ao ambiente em que se encontram

(Brown 1935; Robtson e Charlton 1973) É o caso, por exemplo, da espécie de caranguejo *Sirpus zariquieyi*, Gordon, 1953, que mimetiza o fundo do substrato, o que dificulta a sua predação (Llandres et al. 2013). No caso dos exemplares de *C. bocourti* e *C. exasperatus*, as variações observadas também podem estar associadas a fatores ambientais como o fundo de substrato, visto que as diferenças de coloração foram registradas em indivíduos coletados em diferentes micro-habitats da região oriental da costa Amazônica brasileira.

A variabilidade de coloração observada nos siris da costa Amazônica também pode estar relacionada à sua dieta. Na natureza, siris do gênero *Callinectes* são predadores vorazes com dieta diversificada, alimentando-se principalmente de organismos bentônicos, tais como moluscos, crustáceos e algas (Branco e Verani 1997; Olivier et al. 2006; Carvalho e Couto 2010). Muitos desses organismos são ricos em carotenóides – pigmento responsável por dar cor a carapaça de crustáceos (Katayama et al. 1971; Wade et al. 2017), que poderiam passar para os siris (ex. Tomas et al. 2020), o que explicaria as variações locais na coloração a depender dos pigmentos presentes em suas presas.

Além disso, os padrões de pigmentação exercem uma função relevante na sinalização e seleção sexual em diferentes grupos de animais (Price et al. 2008; Gomes; Silva; Cardoso, 2018), incluindo os crustáceos (Karplus et al. 2003; Cummings et al. 2008). Estudos como os de Sacchi et al. (2021) revelam que os machos da espécie de lagostim *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) exibem colorações vibrantes para atrair fêmeas no período reprodutivo. Comportamento semelhante é conhecido para *C. sapidus*, que também utiliza padrões de cor como critério na escolha de seus parceiros de acasalamento (Baldwin e Johnsen, 2012).

Em crustáceos, estudos sobre aspectos da variabilidade no padrão de cor dentro de uma população têm sido negligenciados e subexplorados (Sacchi et al. 2021). Diante desse

cenário, o registro das variações na coloração de espécies do gênero *Callinectes* ao longo de sua área de ocorrência, bem como experimentos que possam correlacioná-las com fatores ambientais e bióticos, podem ajudar a entender suas bases biológicas ou ambientais e se elas são consequência de processos adaptativos locais ou mera variação aleatória na característica. Embora este estudo não tenha investigado diretamente essa relação, esse fator pode ser considerado em estudos futuros para entender melhor a origem da variação observada.

Filogenia Molecular

Este é o primeiro trabalho a abordar a filogenia e a diversidade genética das espécies de *Callinectes* usando cinco marcadores moleculares dos genomas mitocondrial e nuclear. Este estudo produziu, pela primeira vez, sequências do gene ATP/ADP translocase e do gene mitocondrial do Citocromo b para *Callinectes bocourti*, *Callinectes danae*, *Callinectes exasperatus* e *Callinectes ornatus*. No caso dos marcadores mitocondriais 12S e COI, foram geradas as primeiras sequências para *C. exasperatus* da Costa Norte do Brasil; para o COI e 16S, foi produzida a primeira sequência para *C. marginatus* da Costa Norte Brasileira. Portanto, essas novas adições representam um avanço importante, pois ampliam os dados genéticos disponíveis que poderão auxiliar estudos futuros de filogenia molecular desse gênero. Além disso, as análises filogenéticas deste estudo foram complementadas por diferentes métodos de delimitação (ABGD, ASAP, PTP e GMYC), sendo este o primeiro estudo a empregar tais abordagens em análises do gênero *Callinectes*.

Um dos objetivos do nosso estudo foi avaliar a eficiência dos marcadores moleculares na recuperação das relações filogenéticas entre as espécies de *Callinectes* do litoral maranhense e outras populações conspecíficas. A conclusão mais geral que tivemos é que os marcadores, com maior ou menor precisão, conseguiram recuperar grupos monofiléticos (com suporte moderado e alto) para quase todas as espécies analisadas, sendo os genes

mitocondriais COI, Cyt b, 16S e 12S os que demonstraram maior eficiência na recuperação desses grupos. Contudo, somente os marcadores COI e 16S permitiram uma análise mais ampla devido ao maior número de sequências depositadas nos bancos de dados.

Estudos anteriores já utilizaram os genes mitocondriais em análises filogenéticas de *Callinectes* (ex. Schubart et al. 2000; Weber e Levy 2000; Pfeiler et al. 2005; Robles et al. 2007; Rodrigues et al. 2017; Peres et al. 2020; Robles et al. 2024). Embora o objetivo principal desses trabalhos não tenha sido avaliar formalmente a eficiência dos marcadores, as análises disponíveis permitem uma visão geral sobre o seu desempenho em estudos filogenéticos sobre o gênero.

Os genes mitocondriais codificadores de proteínas como COI e Cyt b, possuem elevada taxa evolutiva e são frequentemente usados em análise de níveis taxonômicos mais baixos (família, gênero, espécies e populações) (Hwang e Kim 1999). Em espécies de *Callinectes*, os marcadores mitocondriais COI e Cyt b demonstraram eficiência na detecção de linhagens evolutivas e diversidade genética (ex. Pfeiler et al. 2005; Rodrigues et al. 2017; Peres et al. 2020). Já os genes mitocondriais ribossomais 12S e 16S, apesar de possuírem taxas evolutivas mais lentas que os genes codificadores de proteínas, também foram capazes de recuperar grupos monofiléticos bem suportados para algumas espécies de *Callinectes* (ex. Robles et al. 2007), mostrando sua utilidade em análises filogenéticas do gênero.

Os genes nucleares geralmente são mais conservados e evoluem em taxas mais lentas do que os genes mitocondriais, o que os torna adequados em análises filogenéticas de níveis taxonômicos mais elevados (ordens, classes e filos) (Hwang e Kim 1999). O gene nuclear ATP/ADP translocase, embora já tivesse sido testado em estudos populacionais de *C. sapidus*, demonstrou-se eficiente na detecção de baixas divergências genéticas em populações geograficamente próximas (Yednock e Neigel 2014). Em nossas análises, não foi possível ter

uma visão definitiva sobre a eficiência deste marcador na recuperação de grupos monofiléticos devido ao número reduzido de sequências disponíveis para outras espécies e certa dificuldade no sequenciamento de algumas amostras. Apesar deste fator limitante, o ATP/ADP translocase mostrou potencial utilidade como marcador complementar em análise filogenética de *Callinectes*.

Os resultados para as espécies *C. bocourti*, *C. danae*, *C. exasperatus*, *C. marginatus* e *C. ornatus* para os marcadores 12S e 16S são semelhantes aos de Robles et al. (2006, 2024), que também utilizaram os mesmos marcadores. Esses autores definiram que o gênero *Callinectes* é um grupo monofilético dividido em duas grandes linhagens evolutivas principais: o “grupo *danae*”, composto por *C. arcuatus*, *C. bellicosus*, *C. danae*, *C. exasperatus*, *C. larvatus*, *C. marginatus*, *C. ornatus*, *C. pallidus*, *C. similis*; e o “grupo *bocourti*”, formado por *C. bocourti*, *C. affinis*, *C. rathbunae*, *C. sapidus*, e *C. amnicola*.

Nossos resultados para o marcador COI apresentaram uma configuração de linhagens parecida com a de Robles et al. (2024), ou seja, a presença das duas linhagens evolutivas principais com valores de suporte moderado, mas com algumas diferenças na composição dos grupos. Na linhagem correspondente ao “grupo *danae*”, além das espécies já mostradas no trabalho de Robles et al. (2024), a espécie *C. bellicosus* foi a única exceção, pois não se agrupou em nenhuma das linhagens dos grupos. O “grupo *bocourti*” também apresentou configuração semelhante com as identificadas por Robles et al. (2024), com exceção de *C. affinis*, cuja ausência de sequências disponíveis nos bancos de dados impossibilitou sua inclusão em nossa análise.

De modo geral, as espécies analisadas em nosso estudo (*C. bocourti*, *C. danae*, *C. exasperatus* e *C. ornatus*) conseguiram formar grupos monofiléticos na maioria dos marcadores analisados, com exceção das espécies *C. marginatus* e *C. larvatus*, que exibiram

um padrão de não monofiletismo. Os resultados indicam que as populações de *C. danae* correspondem a uma única linhagem evolutiva, apresentando monofiletismo (com suporte moderado e alto) na maioria dos marcadores analisados. A rede de haplótipos em forma de estrela indica ausência de estrutura genética ao longo de sua distribuição. Esse resultado corrobora com os achados de Peres et al. (2022) que identificou esse mesmo padrão em *C. danae* ao longo do litoral brasileiro. Embora o marcador 16S tenha revelado a formação de um subclado (com suporte moderado e alto) entre amostras do Maranhão e Pará, esse padrão, por si só, não é suficiente para caracterizar linhagens evolutivas distintas.

A espécie *C. exasperatus* também formou grupos monofiléticos (com suporte moderado e alto) consistentes em todos os marcadores moleculares analisados (COI, Cyt b, 12S, 16S). Essa consistência observada nos resultados de diferentes regiões genômicas sugere a presença de uma linhagem genética bem definida. A rede de haplótipos revelou um formato de estrela com amostras do Maranhão representadas tanto por haplótipos exclusivos quanto por haplótipos compartilhados com indivíduos de outras localidades (São Paulo e Estados Unidos), indicando conectividade com outras populações. No caso dos métodos de delimitação de espécie, todos os modelos analisados recuperaram uma única unidade taxonômica, sugerindo que as amostras pertencem a uma única linhagem evolutiva. Entretanto, a interpretação sobre uma aparente homogeneidade genética requer cautela devido ao número limitado de sequências depositadas para outras localidades que impossibilita uma visão mais ampla sobre a real estrutura populacional desta espécie, fato que reforça a necessidade de estudos futuros com maior número amostral distribuídos por localidades.

De forma geral, os métodos de delimitação, em alguns casos, mostraram resultados divergentes dos encontrados na filogenia. Um exemplo claro disso foi observado nas amostras de *C. danae* e *C. similis*, que na filogenia formaram grupos monofiléticos exclusivos para

cada espécie, mas na análise de delimitação alguns modelos (ABGD, ASAP e PTP) não foram capazes de recuperar essas duas espécies em MOTUs distintas. As inconsistências observadas entre diferentes métodos, neste caso, podem ser atribuídas a baixa distância genética que separam esses dois táxons (1.7%, no gene COI). Os modelos baseados em matrizes de distância genética ABGD e ASAP são conhecidos por serem limitados na detecção de MOTUs em um cenário de baixa diferença genética (ex. Puillandre et al. 2012; YU et al. 2017; Puillandre et al. 2021), e geralmente delimitam menos MOTUs que os métodos PTP e GMYC (Goulpeau et al. 2022). No caso do modelo PTP, embora não seja um padrão comum, por ser considerado um padrão menos conservador que os modelos baseados em distâncias (ABGD e ASAP), já que sua análise é baseada em comprimentos dos ramos da árvore filogenética, esse modelo também pode ser ineficiente na delimitação de unidades em contexto de baixa distância genética (ex. Ahrens et al. 2016). Em contrapartida, o modelo GMYC, considerado em alguns casos o modelo mais eficiente entre os métodos de delimitação utilizados (ex. Talavera et al. 2013; Tang et al. 2014) mostrou resultados consistentes com a filogenia, separando, neste caso, *C. danae* e *C. similis* em unidades evolutivas distintas.

Além disso, foram observadas diferenças entre os próprios métodos de delimitação. Um exemplo disso ocorreu na delimitação de *C. ornatus*. Enquanto os modelos ABGD e ASAP mostraram-se consistentes entre si e com a filogenia, os modelos PTP e GMYC mostraram configurações diferentes entre si. O modelo PTP, por exemplo, provavelmente superestimou a diversidade ao fragmentar um conjunto de amostras em várias MOTUs. O modelo GMYC, embora tenha gerado menos subdivisões em comparação ao método PTP, também pode ter superestimado o número de unidades.

Modelos de delimitação que utilizam árvores filogenéticas em suas inferências tendem a ser mais sensíveis às variações intraespecíficas e podem superestimar as divisões (Padula et al. 2016; Bravo et al. 2021; Goulpeau et al. 2022), e essa superestimação pode estar associada a diferentes fatores, tais como: a sensibilidade às altas taxas de substituição, número amostral desigual, quantidade de espécies analisadas, presença de *singletons* nas árvores e nós não resolvidos (Tang et al. 2014; Ahrens et al. 2016). Embora em alguns casos os métodos de delimitação de espécies possam apresentar resultados incongruentes, a junção de vários métodos pode ser útil para sustentar hipóteses de espécies crípticas (Guo e Kong 2022).

Callinectes marginatus e *Callinectes larvatus*

Ao contrário do que foi observado para as demais espécies de *Callinectes*, *C. marginatus* e *C. larvatus* foram as únicas que não formaram grupos monofiléticos exclusivos. Isso corrobora os resultados de Robles et al (2024). Os métodos de delimitação de espécie também indicam que essas duas espécies, do ponto de vista do molecular, ainda correspondem a uma única unidade evolutiva. Essas duas espécies-irmãs não puderam ser delimitadas pelo COI e 16S, provavelmente, porque derivam de uma especiação recente e ainda há polimorfismo ancestral circulando em ambas as espécies. As espécies começam a ser diferenciadas em seu DNA quando há tempo suficiente, desde a especiação, para que mutações aleatórias sejam fixadas por deriva em cada linhagem de forma independente. Nestes casos, alguns marcadores, dependendo da sua taxa de evolução, podem não ser eficientes para distinguir táxons derivados de especiação recente (Rubinoff et al. 2006). Além disso, como elas possuem distribuição simpátrica e não divergem geneticamente, não é possível excluir que eventos de hibridização também ocorram.

A história taxonômica de *C. marginatus* e *C. larvatus* passou por algumas mudanças em seu percurso. Estudos anteriores baseados em caracteres morfológicos de indivíduos

adultos classificaram *C. marginatus* e *C. larvatus* como espécies distintas (Manning e Holthuis, 1981). Embora Williams (1974) tenha considerado *C. marginatus* com distribuição anfiatlântica, Manning e Holthuis (1981) foram os primeiros a fornecer evidências da distribuição disjunta dessas espécies, considerando *C. marginatus* como espécie africana e *C. larvatus* como espécie americana.

Contudo, em 2008, as espécies foram consideradas sinônimas mesmo sem uma análise taxonômica formal que justificasse essa mudança (Ng et al. 2008). Recentemente, Koch et al. (2022) voltaram a listar *C. marginatus* e *C. larvatus* como espécies distintas. Em contrapartida, Muñoz et al. (2024) relatam que essa reclassificação deve ser interpretada com cautela, uma vez que marcadores mitocondriais como COI e 16S podem não apresentar divergências genéticas suficientes para delimitar espécies. No entanto, Robles et al. (2024) consideram que *C. marginatus* e *C. larvatus* estão dentro da faixa de distância genética considerada suficiente para delimitar espécies irmãs dentro do gênero *Callinectes*.

Diante desse cenário controverso, embora *C. marginatus* e *C. larvatus* sejam atualmente consideradas espécies distintas (Robles et al. 2024), sua história evolutiva ainda não está completamente esclarecida, pois as análises foram baseadas em marcadores mitocondriais (ex. Koch et al. 2023; Muñoz et al. 2024; Robles et al. 2024), e esses genes narram apenas um lado da história, o lado materno, que reflete apenas uma visão parcial das histórias evolutivas de *C. marginatus* e *C. larvatus*. Isso mostra a necessidade de uma análise mais abrangente incorporando mais fontes de dados, especialmente mais marcadores ou dados genômicos para compreender melhor os processos evolutivos que influenciaram o histórico dessas duas espécies.

Divergências intraespecíficas em *C. bocourti* e *C. ornatus*

Apesar do gênero *Callinectes* apresentar espécies com ampla distribuição geográfica, apenas *C. bocourti* e *C. ornatus* apresentaram divergência populacional. Os resultados obtidos para *C. bocourti* revelam a existência de diferentes linhagens evolutivas ao longo de sua área de distribuição. Os resultados para COI indicaram a presença de três linhagens distintas: um subclado formado por amostras do Maranhão e Amapá; um formado por amostras do Maranhão, Colômbia, Porto Rico e Costa Rica; e um subclado formado por uma única amostra de São Paulo. O modelo de delimitação GMYC corrobora essa configuração. Portanto, no Maranhão há duas linhagens simpátricas de *C. bocourti*, que diferem entre si em 1.1 %. O gene do citocromo b também detectou essas linhagens simpátricas, com distância genética de 2.6% entre elas.

Em *C. bocourti*, a rede de haplótipos revelou a presença de duas linhagens na costa amazônica brasileira, ambos presentes no Maranhão e também formadas por amostras oriundas do Caribe. Dessa forma, em *C. bocourti*, os indivíduos da Costa Norte são filogeneticamente mais próximos dos do Caribe do que aqueles do litoral do sudeste do Brasil. Essa proximidade genética entre as populações de *C. bocourti* do Maranhão e do Caribe pode ser explicada pela ação do Grande Sistema de Recifes da Amazônia (GARS), uma extensa faixa de recife de corais que possivelmente funcionou como um corredor ecológico, influenciando a dispersão larval e facilitando a conectividade entre as regiões do Brasil e Caribe, mesmo diante a barreira imposta pela Pluma Amazônia-Orinoco, de forma semelhante ao que foi observado por Rocha et al. (2002) em população de peixe.

As amostras das duas linhagens que existem no Maranhão foram coletadas em estuários próximos, sem a presença de barreiras geográficas evidentes, sugerindo que elas ocorrem em simpatria na região. Um padrão semelhante foi descrito por Rodrigues et al. (2017) para *C.*

sapidus, no qual foram identificadas duas linhagens – uma da América do Sul e a outra da América do Norte – para COI (2.7% de divergência entre elas), coexistindo em vários estuários do Brasil. A análise filogenética de Pfeiler et al. (2005) também identificou a presença de duas linhagens coexistentes de *C. bellicosus* em diferentes regiões no leste do Oceano Pacífico.

Para explicar essa diferenciação populacional em *C. bocourti* algumas hipóteses podem ser consideradas. A divergência entre os animais do Maranhão e Amapá pode ser relacionada à ação de barreiras geográficas que impedem o fluxo gênico entre essas populações. Apesar de a costa maranhense receber influência direta da Corrente Norte do Brasil, responsável pela dispersão larval de diversos táxons na região, o efeito da Pluma Amazônica-Orinoco (POA) pode interferir nesse processo, servindo de barreira geográfica e, assim, impedindo uma maior conectividade genética entre as populações do Maranhão e Amapá. Devido a grande quantidade de água e sedimento lançado no oceano, a POA é conhecida por causar a descontinuidade genética de muitas espécies bentônicas costeiras da região brasileira e caribenha (Rocha, 2003; Martins et al. 2022).

A divergência entre as populações de *C. bocourti* das costas norte e sudeste do Brasil também pode ser influenciada pela dinâmica das diferentes correntes marinhas prevalentes nesses dois locais. Contudo, a comparação entre populações de *C. danae* ao longo da costa brasileira e do Caribe não apontou diferenças genéticas (a exemplo de Peres et al. 2020), mostrando que, além da influência das correntes marinhas gerando barreiras ao fluxo gênico deve haver outros fatores que podem estar favorecendo ou desfavorecendo o fluxo gênico entre as populações das espécies de *Callinectes* na costa brasileira.

Rodrigues et al. (2017) explicam que, embora as duas linhagens de *C. sapidus* ocorram em simpatria nos estuários do sul do Brasil, elas apresentam histórias evolutivas distintas.

Segundo os autores, uma das linhagens possui origem mais antiga, provavelmente resultante de um processo antigo de isolamento populacional associado às mudanças geológicas (fechamento do istmo do Panamá) e climáticas (oscilação do nível do mar durante o Pleistoceno). Por outro lado, a outra linhagem pode ter origem mais recente, associada à dispersão larval facilitada pelas correntes oceânicas ou pelo transporte marítimo através da água de lastro. De forma semelhante, Pfeiler et al. (2005) também associaram a coexistência entre linhagens de *C. bellicosus* a um evento histórico de vicariância causado por variações no nível do mar durante o Pleistoceno.

Outro fator que pode influenciar diretamente as diferenças populacionais de *C. bocourti* do Maranhão são as distâncias geográficas. Keskin e Atar (2012), em seu estudo utilizando o marcador COI, observaram a formação de diferentes populações de *C. sapidus* ao longo do Mar Mediterrâneo, e essas diferenças estavam intimamente relacionadas às distâncias geográficas. Além disso, em alguns casos, a diversidade genética também pode ser impulsionada por variações nos gradientes ambientais (comuns em regiões estuarinas) (Smith et al. 2024), o que poderia explicar a distância intraespecífica encontrada entre amostras de *C. bocourti* coletadas na costa Amazônica maranhense.

As divergências observadas em nosso estudo para o gene mitocondrial COI (1.1 a 2.3%), em alguns casos, são próximas do limite mínimo de 2% a 3% considerado para diferenciação entre espécies de animais (Hebert et al. 2003b), embora esse valor possa variar de acordo com o grupo taxonômico. Em decápodes, por exemplo, a distância genética entre espécies do mesmo gênero (congêneres) pode ser, em média, de 17% no marcador COI (Costa et al. 2008). No entanto, existem casos em que essa diferença pode ser ainda menor, como é o caso das espécies de caranguejos do gênero *Chionoecetes*, nas quais as distâncias entre os

congêneres variam abaixo de 4.9% (Costa et al. 2008). No caso de *Callinectes*, no marcador COI, a distância mínima e máxima que separa espécies varia de 0.03 a 19%, respectivamente.

Em uma perspectiva mais conservadora, essas três linhagens de *C. bocourti* representam populações divergentes que experimentam pouco ou nenhum fluxo gênico entre si. Contudo, estudos morfológicos e ecológicos futuros podem também testar a hipótese, menos conservadora, de que essas linhagens podem ser três novas espécies do gênero. Como as duas linhagens que coexistem na Costa Norte e no Caribe ocorrem em simpatria (inclusive no Maranhão), isso pode sugerir que há pouco ou nenhum fluxo gênico entre elas, fortalecendo a hipótese de que elas podem ser espécies distintas.

O outro caso de divergência intraespecífica ocorreu para *C. ornatus* que apresenta diferenças entre linhagens ainda mais pronunciadas do que *C. bocourti*. A rede de haplótipos mostra dois grandes grupos, sem haplótipos compartilhados, entre localidades do Brasil (Maranhão ao Rio Grande do Sul) + Caribe (Guiana Francesa e Saint Martin) e Estados Unidos, Trinidad e Tobago, Saint Martin e México. As diferenças genéticas entre essas linhagens (3%) são maiores do que aquelas entre algumas espécies do gênero (ex: *Callinectes danae* e *Callinectes similis*; *Callinectes marginatus* e *Callinectes larvatus*). Esse padrão foi inicialmente descrito por Peres et al. (2023) e aparenta ser influenciado fortemente pela barreira imposta pela Pluma Amazônia-Orinoco (POA). Neste caso, a hipótese de que uma dessas linhagens corresponda a uma nova espécie ganha bastante força, tendo em vista que as análises de delimitação de espécies também apontam nessa direção.

Essas divergências genéticas reveladas para *C. bocourti* e *C. ornatus* podem ter implicações na área da ecotoxicologia. Isso porque as espécies do gênero *Callinectes*, especialmente *C. bocourti* e *C. ornatus*, são amplamente utilizadas como organismos bioindicadores em análises de toxicidade ambiental (Pereira Righi et al. 2022; Arouche-Lima

et al. 2024). Quando populações (ou talvez espécies crípticas) geneticamente distintas são tratadas como uma única unidade biológica pressupõem-se, equivocadamente, que apresentarão a mesma sensibilidade aos contaminantes (Rocha-Olivares et al. 2004). No entanto, estudos recentes em populações de *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) mostram que diversidade genética intraespecífica influencia diretamente nas respostas aos estressores ambientais (Raffalli et al. 2024).

No caso específico de *C. bocourti*, a presença de diferentes linhagens evolutivas coexistindo em simpatria sugere que essas populações podem apresentar sensibilidades ecológicas distintas, podendo subestimar ou superestimar as respostas ecotoxicológicas, e podendo fornecer dados pouco representativos para programas de monitoramento ambiental. Isso reforça a importância de compreender a diversidade críptica, uma vez que a sua descoberta pode implicar em diferentes estratégias de manejo e conservação e de monitoramento ambiental.

Os resultados para *C. bocourti* e *C. ornatus* apontam para a necessidade de uma nova revisão taxonômica que possa definir se essas linhagens se qualificam como novas espécies ou não. Independentemente disso, a singularidade evolutiva dessas linhagens está estabelecida e deve ser levada em conta em decisões que afetem o uso econômico desses recursos pesqueiros e medidas voltadas para sua conservação. As constantes ameaças antrópicas que os ambientes estuarinos local vem sofrendo (ex. construções de portos, poluição e outras intervenções antrópicas) reforçam a necessidade de medidas de manejo e conservação para mitigar esse problema. Compreender a dinâmica evolutiva de uma população/espécie pode servir como forte aliada para tomadas de decisão neste processo. Diante do que foi apresentado, nossos resultados não só preenchem uma lacuna histórica sobre o conhecimento dos *Callinectes* no litoral Amazônico, mas também fornecem fundamentos para pesquisas

futuras, além de servir de subsídios para estratégias de manejo e conservação desse importante grupo de portunídeos.

Agradecimentos

Agradecemos ao governo brasileiro por meio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido à bolsa de estudos de BSC e ao seu projeto de pesquisa. Também agradecemos aos pescadores Josadaque (município de Paço do Lumiar), Leilson Nascimento (Tutoia), Rodrigo (Cururupu), Marciano (Raposa) e Isac (comunidade do Cajueiro, São Luís). Agradecemos ainda a Eduardo Costa, Marcelo Lemos e Kaio Bandeira pela contribuição nas atividades de campo; a Maira Gonçalves, pelo auxílio na identificação morfológica de alguns espécimes; a Michele Batista pelas fotografias dos exemplares; ao Prof. Fernando Luis Medina Mantelatto que gentilmente cedeu amostras para este estudo; ao Laboratório de Biodiversidade Molecular da Universidade Federal do Maranhão, pelo suporte técnico e científico; a Universidade Estadual do Maranhão, e ao curso Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade

Referências

- Ahrens D, Fujisawa T, Krammer H-J, Eberle J, Vogler AP (2016) Rarity and Incomplete Sampling in DNA-Based Species Delimitation. *Syst Biol* 65:478–494. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw002>
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Anacleto A, Santos HC, Rosário LS, Silva RC (2024) Pesca de siri com gaiolas no litoral paranaense: entre novas e velhas aprendizagens. *Cuadernos de Educación y Desarrollo* 16:01–16. <https://doi.org/10.55905/cuadv16n1-001>
- Arouche-Lima IM, Linhares ES, Sousa BBG, Ribeiro EB (2024) Biomarcadores em *Callinectes bocourti* indicam estresse ambiental em manguezais de uma área portuária da

costa amazônica brasileira. Observatório de la Economía Latinoamericana 22:8282. <https://doi.org/10.55905/oelv22n12-168>

Baldwin J, Johnsen S (2012) The male blue crab, *Callinectes sapidus*, uses both chromatic and achromatic cues during mate choice. Journal of Experimental Biology 215:1184–1191. <https://doi.org/10.1242/jeb.067512>

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16:37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>

Braga AA, Oliveira ACM, Zappes CA (2021) Caracterização da pesca e importância dos crustáceos a partir da percepção de pescadores artesanais do sul do Espírito Santo, Brasil. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais 16:59–71. <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v16i1.208>

Branco JO, Fracasso HAA (2004) Ocorrência e abundância da carcinofauna acompanhante na pesca do camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* Heller (Crustacea, Decapoda), na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. Rev Bras Zool 21:295–301. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752004000200022>

Branco JO, Masunari S (2000) Reproductive ecology of the blue crab, *Callinectes danae* Smith, 1869 in the Conceição Lagoon system, Santa Catarina Isle, Brazil. Rev Bras Biol 60:17–27. <https://doi.org/10.1590/S0034-71082000000100004>

Branco JO, Verani JR (1997) Dinâmica da alimentação natural de *Callinectes danae* Smith (Decapoda, Portunidae) na Lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Rev Bras Zool 14:1003–1018. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751997000400014>

Bravo H, Cheng CLY, Iannucci A, Natali C, Quadros A, Rhodes M, Yip MML, Cannicci S, Fratini S (2021) A DNA barcode library for mangrove gastropods and crabs of Hong Kong and the Greater Bay Area reveals an unexpected faunal diversity associated with the intertidal forests of Southern China. BMC Ecology and Evolution 21:180. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01914-6>

Brown Jr. FA (1935) Color changes in *Palaemonetes*. Journal of Morphology 57:317–333. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050570202>

Caldart ET, Mata H, Canal WC, Ravazzolo PA (2016) Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. Acta Scientiae Veterinariae 44:1–20

Carvalho FL, Couto ECG (2010) Dieta do siri *Callinectes exasperatus* (Decapoda, Portunidae) no estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia. UNICIÊNCIAS 14. <https://doi.org/10.17921/1415-5141.2010v14n2p%p>

- Costa FO, Waard JR, Boutillier J, Ratnasingham S (2007) Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Can J Fish Aquat Sci* 64:272–295. <https://doi.org/10.1139/f07-008>
- Cummings ME, Jordão JM, Cronin TW, Oliveira RF (2008) Visual ecology of the fiddler crab, *Uca tangeri*: effects of sex, viewer and background on conspicuousness. *Animal Behaviour* 75:175–188. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.04.016>
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- De Grave S, Decock W, Dekeyzer S, et al (2023) Benchmarking global biodiversity of decapod crustaceans (Crustacea: Decapoda). *Journal of Crustacean Biology* 43:ruad042. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruad042>
- Edler D, Klein J, Antonelli A, Silvestro D (2021) raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution* 12:373–377. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13512>
- Felsenstein J (1973) Maximum Likelihood and Minimum-Steps Methods for Estimating Evolutionary Trees from Data on Discrete Characters. *Systematic Zoology* 22:240–249. <https://doi.org/10.2307/2412304>
- Feng X, Williams EP, Place AR (2017) High Genetic Diversity and Implications for Determining Population Structure in the Blue Crab *Callinectes sapidus*. *shre* 36:231–242. <https://doi.org/10.2983/035.036.0126>
- 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. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294–299
- Fransen C. 2014. True Crabs. In: Carpenter KE, De Angelis N, editors. *The living marine resources of the Eastern Central Atlantic. Volume 1: Introduction, crustaceans, chitons, and cephalopods*. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. Rome: FAO. p. 249–358
- Gallardo-Escárate C, Goldstein-Vasquez J, Thiel M (2007) Individual Identification of Decapod Crustaceans I: Color Patterns in Rock Shrimp (Rhynchocinetes Typus). *Journal of Crustacean Biology* 27:393–398. <https://doi.org/10.1651/S-2773.1>
- Goulpeau A, Penel B, Maggia M-E, et al (2022) OTU Delimitation with Earthworm DNA Barcodes: A Comparison of Methods. *Diversity* 14:866. <https://doi.org/10.3390/d14100866>

- Guo B, Kong L (2022) Comparing the Efficiency of Single-Locus Species Delimitation Methods within Trochoidea (Gastropoda: Vetigastropoda). *Genes* (Basel) 13:2273. <https://doi.org/10.3390/genes13122273>
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symp. Ser* 41:95–98.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 270:313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci* 270 Suppl 1:S96–99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Hwang U-W, Kim W (1999) General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J Parasito* 37:215–228. <https://doi.org/10.3347/kjp.1999.37.4.215>
- Kaur J, Sharma D (2020) Inferring evolutionary distance using kimura's two parameter method. *IJRES* 2320–9356
- Keskin E, Atar HH (2012) TÜRKİYE'NİN AKDENİZ KIYISINDAKİ MAVİ YENGEÇ (*Callinectes sapidus*) POPULASYONLARI ARASINDAKİ GENETİK FARKLILIGIN COI GEN DİZİLERİ KULLANILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ *J. Fish. Sci* 6:125–131
- Katayama T, Hirata, Chichester C (1971) The Biosynthesis of Astaxanthin—IV. The Carotenoids in the Prawn, *Penaeus Japonicus* Bate (Part 1). *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 37:614–620. <https://doi.org/10.2331/suisan.37.614>
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Koch M, Spiridonov VA, Ďuriš Z (2023) Revision of the generic system for the swimming crab subfamily Portuninae (Decapoda: Brachyura: Portunidae) based on molecular and morphological analyses. *Zoological Journal of the Linnean Society* 197:127–175. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlac017>
- Lane-Medeiros L, Moraes SASN, Alencar CERD, et al (2021) As variações da forma do corpo ajudam a diminuir a incerteza da taxonomia em juvenis de caranguejo *nadador*

Callinectes Stimpson, 1860. Zoologischer Anzeiger 295:89–98.
<https://doi.org/10.1016/j.jcz.2021.09.009>

Lee BB, Schott EJ, Behringer DC, Bojko J, Kough A, Plough LV (2020) Rapid Genetic Identification of the Blue Crab *Callinectes sapidus* and Other *Callinectes* spp. Using Restriction Enzyme Digestion and High Resolution Melt (HRM) Assays. Front Mar Sci 7:.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00633>

Leigh JW, Bryant D (2015) popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution 6:1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>

Llandres AL, Figon F, Christidès J-P, Mandon N, Casas J (2013) Environmental and hormonal factors controlling reversible colour change in crab spiders. Journal of Experimental Biology 216:3886–3895. <https://doi.org/10.1242/jeb.086470>

Mancinelli G, Chainho P, Cilenti L, et al (2017) The Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* in southern European coastal waters: Distribution, impact and prospective invasion management strategies. Marine Pollution Bulletin 119:5–11.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.050>

Manning RB, Holthuis LB (1981) West African Brachyuran Crabs (Crustacea: Decapoda). Smithsonian contributions to zoology 306:1–379

Mantelatto FLM, Fransozo A (1999) Characterization of the physical and chemical parameters of Ubatuba Bay, Northern Coast of São Paulo State, Brazil. Rev Bras Biol 59:23–31.
<https://doi.org/10.1590/S0034-71081999000100004>

Marco-Herrero E, Cuesta JA, González-Gordillo JI (2021) DNA barcoding allows identification of undescribed crab megalopas from the open sea. Sci Rep 11:20573.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-99486-4>

Martins NT, Macagnan LB, Cassano V, Gurgel CFD (2022) Brazilian marine phylogeography: A literature synthesis and analysis of barriers. Molecular Ecology 31:5423–5439. <https://doi.org/10.1111/mec.16684>

Melo GAS (1996) Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Ed. Plêiade. São Paulo

Merritt TJ, Shi L, Chase MC, Rex MA, Etter RJ, Quattro JM (1998) Universal cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. Mol Mar Biol Biotechnol 7:7–11

Muñoz I, García-Raso JE, Abelló P, Cuesta JA (2024) Marine Crabs of Guinea-Bissau, with Emphasis on the Deep Fauna, Supported by an Integrative Taxonomy. Diversity 16:93.
<https://doi.org/10.3390/d16020093>

Nery LEM, Castrucci AML (2002) Crustacean Chromatophore: Endocrine Regulation and Intracellular Signalling Systems. In: Wiese K (ed) The Crustacean Nervous System. Springer, Berlin, Heidelberg 98–112. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-04843-6>

Ng PKL, Guinot D, Davie PJF (2008) Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. Raffles Bull. Zool. (Suppl.) 17:1–286

Oliveir A, Pinto TK, Santos DPD, D’Incao F (2006) Dieta natural do siri-azul *Callinectes sapidus* (Decapoda, Portunidae) na região estuarina da Lagoa dos Patos, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, Sér Zool 96:305–313. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212006000300006>

Padula V, Bahia J, Stöger I, et al (2016) A test of color-based taxonomy in nudibranchs: Molecular phylogeny and species delimitation of the *Felimida clenchi* (Mollusca: Chromodorididae) species complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 103:215–229. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.07.019>

Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 25:547–572. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.25.110194.002555>.

Pereira Righi BD, Abujamara LD, Barcarolli IF, et al (2022) Response of biomarkers to metals, hydrocarbons and organochlorine pesticides contamination in crabs (*Callinectes ornatus* and *C. bocourti*) from two tropical estuaries (São José and São Marcos bays) of the Maranhão State (northeastern Brazil). Chemosphere 288:132649. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132649>

Peres PA, Bracken-Grissom H, Timm LE, Mantelatto FL (2022) Genomic Analyses Implicate the Amazon–Orinoco Plume as the Driver of Cryptic Speciation in a Swimming Crab. Genes 13:2263. <https://doi.org/10.3390/genes13122263>

Peres PA, Lopes M, Negri M, Robles R, Rannieri C, Santos M, Mantelatto FL (2020) Lack of population genetic structure among Brazilian populations of *Callinectes danae* (Brachyura: Portunidae): implication for management and conservation. Regional Studies in Marine Science 37:101336. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101336>

Pestana SS, Viana ARC, Diniz ALC, Sousa DB (2020) Comparação entre a produção pesqueira do camarão branco e a fauna de siris do gênero *Callinectes* na pesca de zangaria no Município de Raposa, Maranhão – Brasil. Brazilian Journal of Development 6:7732–7749. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n2-178>

Pfeiler E, Hurtado LA, Knowles LL, Torres J (2005) Population genetics of the swimming crab *Callinectes bellicosus* (Brachyura: Portunidae) from the eastern Pacific Ocean. Marine Biology 146:559–569. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1463-y>

- Pita JB, Rodrigues ES, Lopes R da G, Coeho JAP (1985) Observações Bioecológicas sobre o sirí *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustácea, Portunidae), no complexo Baía-estuário de Santos, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca 12:35–43
- Price AC, Weadick CJ, Shim J, Rodd FH (2008) Pigments, Patterns, and Fish Behavior. Zebrafish 5:297–307. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0551>
- Puillandre N, Brouillet S, Achaz G (2021) ASAP: assemble species by automatic partitioning. Molecular Ecology Resources 21:609–620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. Molecular Ecology 21:1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Raffalli M-C, Bojórquez-Sánchez AM, Lignot J-H, Martínez-Alarcón D (2024) Population-specific responses to pollution exposure suggest local adaptation of invasive red swamp crayfish *Procambarus clarkii* along the Mediterranean French coastline. Environ Sci Pollut Res 31:42314–42329. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33775-z>
- Rambaut A. 2018. Figtree version 1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. Available from: <https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut A, Suchard M, Xie D, Drummond A. 2014. Tracer v1.6. Computer program and documentation distributed by the author. Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Robison Jr. WG, Charlton JS (1973) Microtubules, microfilaments, and pigment movement in the chromatophores of *Palaemonetes vulgaris* (Crustacea). Journal of Experimental Zoology 186:279–304. <https://doi.org/10.1002/jez.1401860307>
- Robles R, Schubart CD, Conde JE, Carmona-Suárez C (2007) Molecular phylogeny of the American *Callinectes* Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae), based on two partial mitochondrial genes. Mar Biol 150:1265–1274. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0437-7>
- Robles R, Schubart CD, Felder DL (2024) Molecular phylogenetic reassessment of eastern Atlantic *Callinectes* (Brachyura, Portunidae). <https://doi.org/10.1163/15685403-bja10416>
- Rocha LA (2003) Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. Journal of Biogeography 30:1161–1171. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2003.00900.x>
- Rocha LA, Bass AL, Robertson DR, Bowen BW (2002) Adult habitat preferences, larval dispersal and the comparative phylo geography of three Atlantic Acanthurus (Teleostei: Acanthuridae). Molecular Ecology 11:243–252. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01431.x>

- Rocha-Olivares A, Fleegeer JW, Foltz DW (2004) Differential tolerance among cryptic species: A potential cause of pollutant-related reductions in genetic diversity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:2132–2137. <https://doi.org/10.1897/03-512>
- Rodrigues M, Dumont LFC, Santos CRM, et al (2017) Two distinct mtDNA lineages of the blue crab reveal large-scale population structure in its native Atlantic distribution. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 197:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.08.004>
- Rodríguez BD (1982) Los cangrejos de la familia Portunidae (Decapoda: Brachyura) del Caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 12. <https://doi.org/10.25268/bimc.invenmar.1982.12.0.501>
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Liberato P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-García A (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution* 34:3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Rubioff D, Cameron S, Will K (2006) A Genomic Perspective on the Shortcomings of Mitochondrial DNA for “Barcoding” Identification. *Journal of Heredity* 97:581–594. <https://doi.org/10.1093/jhered/esl036>
- Sacchi R, Cancian S, Ghia D, Fea D, Coladonato A (2021) Color variation in signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Current Zoology* 67:35–43. <https://doi.org/10.1093/cz/zoaa031>
- Schubart C, Neigel J, Felder D (2000) The use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and biogeographic studies of Crustacea. *Crustac Issues* 12:817–30
- Severino-Rodrigues E, Musiello-Fernandes J, Moura ÁAS, Branco GMP (2012) Biologia reprodutiva de fêmeas de *Callinectes danae* (Decapoda, Portunidae) no complexo estuarino-lagunar de Iguape e Cananéia (SP). *Boletim do Instituto de Pesca* 38:31–41
- Smith L, Long RA, Cannizzaro AG, Sawicki TR (2024) Vicariance and cryptic diversity revealed by molecular phylogenetic analyses of estuarine *Gammarus* species (Crustacea: Amphipoda) due to formation of the Labrador Current. *invs* 38:. <https://doi.org/10.1071/IS24003>
- Sousa DB, Santos NB, Oliveira VM, et al (2015) Carcinofauna benthica estuarina de dois manguezais da costa amazônica maranhense, Brasil. *Iheringia, Sér Zool* 105:339–347. <https://doi.org/10.1590/1678-476620151053339347>
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

- Stevens M, Lown AE, Wood LE (2014) Color change and camouflage in juvenile shore crabs *Carcinus maenas*. *Front Ecol Evol*. <https://doi.org/10.3389/fevo.2014.00014>
- Stuart-Fox D, Moussalli A (2008) Camouflage, communication and thermoregulation: lessons from colour changing organisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364:463–470. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0254>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Fillipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tang CQ, Humphreys AM, Fontaneto D, Fontaneto D, Barraclough TG, Paradis E (2014) Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data. *Methods Ecol Evol* 5:1086–1094. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12246>
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids* 22:4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tomas AL, Sganga DE, Marciano A, López Greco LS (2020) Effect of diets on carotenoid content, body coloration, biochemical composition and spermatophore quality in the “red cherry” shrimp *Neocaridina davidi* (Caridea, Atyidae). *Aquaculture Nutrition* 26:1198–1210. <https://doi.org/10.1111/anu.13076>
- Varela C, Golightly C, Timm LE, Wilkins B, Frank T, Fenolio D, Collins SB, Bracken-Grisson HD (2021) DNA barcoding enhances large-scale biodiversity initiatives for deep-pelagic crustaceans within the Gulf of Mexico and adjacent waters. *Journal of Crustacean Biology* 41:ruab005. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruab005>
- Venables WN, Smith DM, R Core Team. 2021. *R version 4.1.0 Patched*. R: A Programming Environment for Data Analysis and Graphics. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Wade NM, Gabaudan J, Glencross BD (2017) A review of carotenoid utilisation and function in crustacean aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 9:141–156. <https://doi.org/10.1111/raq.12109>
- Watanabe TT, Sant’Anna BS, Hattori GY, Zara FJ (2014) Population biology and distribution of the portunid crab *Callinectes ornatus* (Decapoda: Brachyura) in an estuary-bay complex of southern Brazil. *Zoologia (Curitiba)* 31:329–336. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702014000400004>

Weber LI, Levy JA (2000) Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia* 420:203–210. <https://doi.org/10.1023/A:1003992630229>

Weber LI, Levy JA (2000) Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia* 420:203–210. <https://doi.org/10.1023/A:1003992630229>

Wiese K (2013) *The Crustacean Nervous System*. Springer Science & Business Media

Williams AB (1974) The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). *Fish Bull* 72: 685–798.

Yednock BK, Neigel JE (2014) An investigation of genetic population structure in blue crabs, *Callinectes sapidus*, using nuclear gene sequences. *Mar Biol* 161:871–886. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2387-1>

Yu G, Rao D, Matsui M, Yang J (2017) Coalescent-based delimitation outperforms distance-based methods for delineating less divergent species: the case of *Kurixalus odontotarsus* species group. *Sci Rep* 7:16124. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16309-1>

Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A (2013) A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29:2869–2876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>

Contribuições dos autores

LFCC, BSC e JPS realizaram o trabalho de campo e a coleta das amostras. BSC e JPS conduziram os procedimentos laboratoriais relacionados à extração e amplificação dos marcadores. A análise morfológica foi realizada por BSC. A análise dos dados foi conduzida por BSC e LFCC. O primeiro rascunho do manuscrito foi elaborado por LFCC e BSC. Todos os autores contribuíram com comentários às versões anteriores do manuscrito e aprovaram a versão final submetida

Disponibilidade dos Dados

As sequências de DNA geradas por este estudo estão disponíveis nos Sistemas BOLD e NCBI-GenBank. Os números de acesso estão na Tabela Suplementar 1.

Declarações**Conflitos de interesse**

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

Aprovação ética

Este estudo focou em siris, portanto, não foi necessária aprovação ética.

Tabela S1: Informações sobre as sequências dos bancos de dados GenBank e Bold usadas neste estudo.

Espécie	Localidade	Código – GENBANK E BOLD				
		COI	16S	12S	CYT B	ATP/ADP
<i>Callinectes affinis</i>	Brazil (CE)			DQ407699.1		
<i>Callinectes affinis</i>	Brazil (RN)			DQ407700.1		
<i>Callinectes amnicola</i>	Ghana	MG462523.1				
<i>Callinectes amnicola</i>	Costa Rica					
<i>Callinectes arcuatus</i>	Costa Rica	KY940211.1	KY940141.1			KC886533.1
<i>Callinectes arcuatus</i>	Honduras	MG462539.1				
<i>Callinectes arcuatus</i>	Nicaragua	MG462538.1	DQ407668.1	DQ407687.1		
<i>Callinectes arcuatus</i>	Mexico	MG462555.1	DQ407669.1	DQ407688.1	AY465910.1	
<i>Callinectes arcuatus</i>	Mexico				AY465914.1	
<i>Callinectes bellicosus</i>	Mexico	MG462555.1	DQ407671.1	DQ407690.1/ DQ407689.1		
<i>Callinectes bocourti</i>	Brazil (MA)	JCABR002-25	PV759706.1			PV807601.1
<i>Callinectes bocourti</i>	Brazil (MA)	JCABR003-25				
<i>Callinectes bocourti</i>	Brazil (MA)	JCABR006-25				
<i>Callinectes bocourti</i>	Brazil (MA)	JCABR007-25				
<i>Callinectes bocourti</i>	Brazil (MA)	JCABR008-25				
<i>Callinectes bocourti</i>	Brazil (AP)	KY940214.1	KY940144.1			

Espécie	Localidade	Código – GENBANK E BOLD				
		COI	16S	12S	CYT B	ATP/ADP
<i>Callinectes bocourti</i>	Brazil (SP)	JX123451.1				
<i>Callinectes bocourti</i>	Venezuela	MG462540.1	AJ298181.1	DQ407697.1		
<i>Callinectes bocourti</i>	Costa Rica	KY940209.1	KY940139.1			
<i>Callinectes bocourti</i>	Colombia	MG462552.1				
<i>Callinectes bocourti</i>	Puerto Rico	MN811228.1				
<i>Callinectes bocourti</i>	United States					
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (MA)	JCABR009-25	PV759707.1			PV807602.1
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (MA)	JCABR010-25	PV759708.1			PV807603.1
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (MA)	JCABR012-25				
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (PA)	KY940195.1	KY940126.1			
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (AP)	KY940215.1	KY940145.1			
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (CE)	KY940191.1	KY940122.1			
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (BA)	KY940184.1	KY940115.1			
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (PE)	KY940188.1	KY940119.1			
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (SE)					
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (RN)	KY940160.1	KY940091.1			
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (AL)	KY940180.1	KY940111.1			
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (ES)	KY940171.1	KY940102.1			

Espécie	Localidade	Código – GENBANK E BOLD				
		COI	16S	12S	CYT B	ATP/ADP
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (RJ)	KY940202.1	KY940133.1			
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (SP)	KY940216.1	KY940146.1	DQ407706.1		
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (PR)	KY940179.1	KY940110.1			
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (RS)	KY940203.1	KY940134.1			
<i>Callinectes danae</i>	Brazil (SC)	KY940197.1	KY940128.1			
<i>Callinectes danae</i>	Colombia	KY940213.1	KY940143.1			
<i>Callinectes danae</i>	Saint-Martin					
<i>Callinectes danae</i>	Panama	MN184215.1	MK971656.1			
<i>Callinectes danae</i>	Saint Lucia					
<i>Callinectes danae</i>	Trinidad and Tobago					
<i>Callinectes danae</i>	Venezuela			DQ407705.1		
<i>Callinectes danae</i>	United States	MT272190.1				
<i>Callinectes exasperatus</i>	Brazil (MA)	JCABR013-25	PV759709.1	PV658810.1		PV807604.1
<i>Callinectes exasperatus</i>	Brazil (MA)	JCABR014-25	PV759710.1	PV658811.1		
<i>Callinectes exasperatus</i>	Brazil (MA)	JCABR015-25	PV759712.1			
<i>Callinectes exasperatus</i>	Brazil (MA)	JCABR016-25	PV759713.1			
<i>Callinectes exasperatus</i>	Brazil (MA)	JCABR017-25				
<i>Callinectes exasperatus</i>	Brazil (SP)	KX060222.1	KX060432.1			

Espécie	Localidade	Código – GENBANK E BOLD				
		COI	16S	12S	CYT B	ATP/ADP
<i>Callinectes exasperatus</i>	Venezuela		DQ407682.1	DQ407708.1		
<i>Callinectes exasperatus</i>	United States	MG462545.1				
<i>Callinectes larvatus</i>	Brazil (RN)	KY940158.1	KY940089.1			
<i>Callinectes larvatus</i>	Panama	MN184148.1	MK971586.1			
<i>Callinectes larvatus</i>	Saint Lucia					
<i>Callinectes larvatus</i>	Venezuela		DQ407678.1	DQ407702.1		
<i>Callinectes larvatus</i>	United States					
<i>Callinectes marginatus</i>	Brazil (MA)	JCABR020-25	PV759714.1			
<i>Callinectes marginatus</i>	Brazil (MA)	JCABR021-25				
<i>Callinectes marginatus</i>	Brazil (MA)	JCABR022-25				
<i>Callinectes marginatus</i>	Brazil (RN)	MW081984.1				
<i>Callinectes marginatus</i>	United States	KT365694.1				
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (MA)	JCABR001-25				
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (MA)	JCABR018-25				
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (MA)	OP817089.1				
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (PE)	KY940189.1	KY940120.1			
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (SE)	MT272163.1				

Espécie	Localidade	Código – GENBANK E BOLD				
		COI	16S	12S	CYT B	ATP/ADP
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (RN)	KY940161.1	KY940092.1			
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (ES)	MT272169.1				
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (RJ)	MT272152.1				
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (SP)	MT272168.1	AJ298186.1	DQ407703.1		
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (RS)	MT272170.1				
<i>Callinectes ornatus</i>	Brazil (SC)	MT272151.1				
<i>Callinectes ornatus</i>	French guiana	MN811215.1				
<i>Callinectes ornatus</i>	Saint-Martin	MT272158.1				
<i>Callinectes ornatus</i>	Trinidad and Tobago	KY940204.1	KY940135.1			
<i>Callinectes ornatus</i>	Venezuela		DQ407679.1	DQ407704.1		
<i>Callinectes ornatus</i>	Mexico	BACQ374-16				
<i>Callinectes ornatus</i>	United States	MK308332.1	U75268.1			
<i>Callinectes pallidus</i>	Ghana	MG462536.1				
<i>Callinectes rathbunae</i>	Mexico		DQ407673.1	DQ407693.1		
<i>Callinectes rathbunae</i>	United States	MG462524.1				
<i>Callinectes sapidus</i>	Brasil (SP)		JX123477.1			
<i>Callinectes sapidus</i>	Brasil (RS)					
<i>Callinectes sapidus</i>	Costa Rica	KY940210.1	KY940140.1			

Espécie	Localidade	Código – GENBANK E BOLD				
		COI	16S	12S	CYT B	ATP/ADP
<i>Callinectes sapidus</i>	Saint Lucia					
<i>Callinectes sapidus</i>	Mexico				AY465916.1	KC886580.1
<i>Callinectes sapidus</i>	United States	AY465915.1	KR030248.1	DQ407691.1		
<i>Callinectes sapidus</i>	Italy	OK513033.1				
<i>Callinectes sapidus</i>	Turkey	MN759043.1				
<i>Callinectes similis</i>	Mexico					KC886533.1
<i>Callinectes similis</i>	United States	KU905928.1	KY940138.1	DQ407692.1		
<i>Callinectes similis</i>	United States	KY940205.1				
<i>Callinectes similis</i>	United States	KY940208.1				
<i>Callinectes toxotes</i>	Nicaragua	MG462541.1				
<i>Callinectes toxotes</i>	Equador	MN811231.1				
<i>Callinectes toxotes</i>	Honduras		DQ407681.1			
<i>Arenaeus cribrarius</i>		MH087696.1	JX123469.1	DQ407686.1		
<i>Charybdis helleri</i>		MG462541.1	AJ298191.1	MF693857.1		
<i>Charybdis granulata</i>						
<i>Portunus pelagicus</i>						
<i>Portunus trituberculatus</i>						KM921660.1
<i>Scylla paramamosain</i>						KF709943.1

CAPÍTULO II

**Primeiro registro do siri-azul *Callinectes marginatus* (A. Milne-Edwards, 1861)
(Decapoda, Portunidae) para o estado do Maranhão, Norte do Brasil**

Este manuscrito foi escrito nas normas da revista Acta Amazônica

Print version ISSN 0044-5967 | On-line version ISSN 1809-4392

Primeiro registro do siri-azul *Callinectes marginatus* (A. Milne-Edwards, 1861)

(Crustacea, Portunidae) para o Estado do Maranhão, Norte do Brasil

Bianca dos Santos COSTA¹, Maira Wilson Paiva GONÇALVES¹, Jaqueline Pereira SÁ¹,

Marina Bezerra FIGUEIREDO² Luis Fernando CARVALHO-COSTA^{3*}

1. Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, São Luís, Maranhão, Brazil.

3. Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Departamento de Engenharia de Pesca, São Luís, Maranhão, Brazil.

2. Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Departamento de Biologia, São Luís, Maranhão, Brazil.

Autor correspondente: Luis Fernando Carvalho-Costa*

E-mail: luis.costa@ufma.br

Agradecimentos

Agradecemos ao governo brasileiro (CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos a Bianca S. Costa e pelo apoio financeiro ao seu projeto de pesquisa; agradecemos também ao Marcelo Lemos e Kaio Bandeira pela contribuição nas atividades de campo.

Disponibilidade de dados

Os dados que apoiam os resultados deste estudo estão disponíveis da seguinte forma: as fotografias estão disponíveis nesta breve comunicação; e a sequência de DNA está depositada no BOLD Systems (Barcode of Life Data System) com o código de identificação JCABR020-25; JCABR021-25, JCABR022-25.

Primeiro registro do siri-azul *Callinectes marginatus* (A. Milne-Edwards, 1861)

(Crustacea, Portunidae) para o Estado do Maranhão, Norte do Brasil

Abstract

This study presents the first record of *Callinectes marginatus* (A. Milne-Edwards, 1861) on the Brazilian Amazon coast. The specimens were collected in the municipalities of São José de Ribamar and Paulino Neves, Maranhão State (Northeastern Brazil). Specimen identification was done through morphology and DNA analysis. Although the molecular data were inconclusive regarding the taxonomic identity of the specimens, the morphological identification points to *C. marginatus*. This new record updates the occurrence map of *C. marginatus* on the Brazilian coast and expands the diversity of species of the genus *Callinectes* present on the Brazilian Amazon coast.

Key words: Crustaceans; Decapod; New occurrence; Diversity of species

Primeiro registro do siri-azul *Callinectes marginatus* (A. Milne-Edwards, 1861) na costa amazônica brasileira

Resumo

Este estudo apresenta o primeiro registro de *Callinectes marginatus* (A. Milne-Edwards, 1861) na costa amazônica brasileira. Os espécimes foram coletados nos municípios de São José de Ribamar e Paulino Neves, Maranhão (Norte do Brasil). A identificação dos espécimes foi feita através da morfologia e análise do DNA. Embora os dados moleculares tenham sido inconclusivos quanto à identidade taxonômica dos espécimes, a identificação morfológica aponta para *C. marginatus*. Este novo registro atualiza o mapa de ocorrência de *C. marginatus* no litoral brasileiro e amplia a diversidade de espécies do gênero *Callinectes* presentes no litoral amazônico brasileiro.

Palavras-chave: Crustáceos; Decápodes; Nova ocorrência; Diversidade de espécies

Os siris-azuis do gênero *Callinectes* Stimpson, 1860 são conhecidos por sua importância ecológica, pois atuam como estabilizadores da cadeia alimentar, influenciando diretamente a abundância de espécies locais e contribuindo para a ciclagem de nutrientes por meio da bioturbação (Braga et al. 2021; Farrell et al. 2024). O gênero é composto por 15 espécies reconhecidas (Robles et al. 2024), com oito ocorrendo ao longo da costa brasileira (Melo, 1996; Coelho et al. 2008; Boos et al. 2012). No estado do Maranhão, costa Amazônica brasileira, quatro espécies foram documentadas: *Callinectes danae*, Smith 1869; *Callinectes bocourti* A. Milne-Edwards, 1878; *Callinectes ornatus* Ordway, 1863; e *Callinectes exasperatus*, Gerstaecker, 1856 (Coelho e Ramos-Porto 1980; Sousa et al. 2015). Este artigo relata a primeira ocorrência de *Callinectes marginatus* (A. Milne-Edwards, 1861) no estado do Maranhão, litoral norte do Brasil

O litoral norte brasileiro (do estado do Amapá ao Maranhão) possui numerosos estuários, baías e enseadas, sendo fortemente influenciado pelo Delta do Rio Amazonas (Rosa Filho et al., 2018). O litoral maranhense é parte fundamental dessa região, atuando como zona de transição entre duas regiões biogeográficas: a Guianense e a Brasileira (Coelho e Ramos-Porto, 1980), e abriga a maior extensão contínua de manguezais do mundo (Nascimento et al., 2013). Esse habitat abriga diversos organismos bentônicos, incluindo caranguejos do gênero *Callinectes*.

Três espécimes de *C. marginatus* foram coletados no Estado do Maranhão: dois foram capturados em uma poça de maré rochosa na Praia do Barro Vermelho, no município de Paulino Neves (2°39'17"S 42°36'31"W); e um foi adquirido em um mercado local no município de São José de Ribamar (02°31'48.41"S 44°05'04.70"W) (Figura 1). Os caranguejos foram eutanasiados por resfriamento em gelo e transportados para o laboratório.

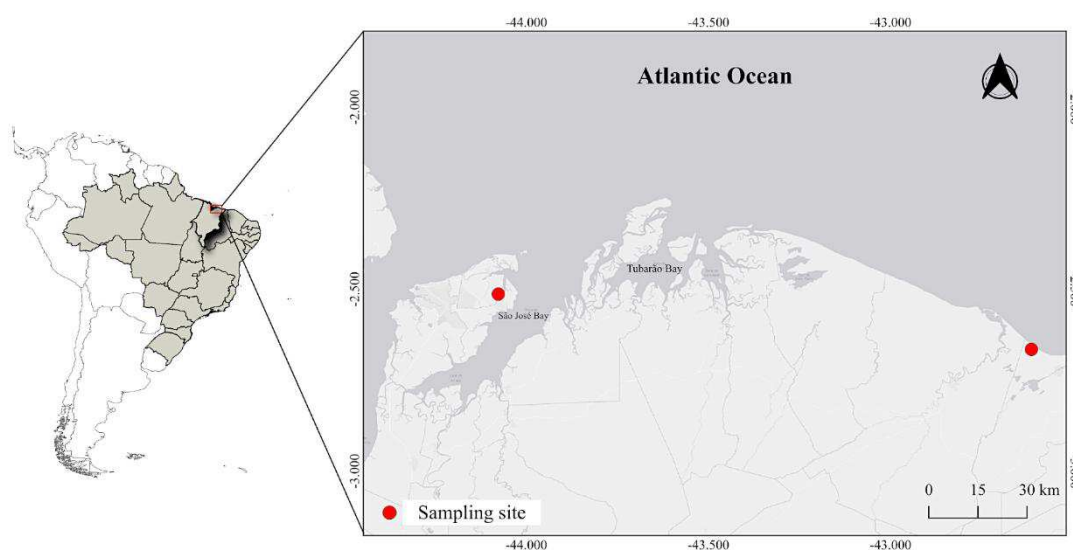


Figura 1. Mapa de distribuição da espécie *Callinectes marginatus*. Os pontos vermelhos representam os locais de coleta das amostras.

A identificação morfológica foi baseada em Fransen (2014), Rodriguez (1982) e Manning e Holthuis (1981). Após a remoção de tecido muscular fresco para análise de DNA, os espécimes foram fixados em formalina a 10%, preservados em etanol a 70% e depositados na coleção biológica do CoFauMa (Coleção de Tecidos e DNA da Fauna Maranhense) da Universidade Estadual do Maranhão (número de registro: CFMCR075; CFMVR110; CFMCR111).

A extração de DNA seguiu o método de Aljanabi e Martinez (1997). Um fragmento do gene mitocondrial COI (Citocromo c oxidase subunidade) foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando os primers LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994) e COL6b/COH6 (Schubart e Huber, 2006). As amplificações foram realizadas em 35 ciclos: desnaturação a 94 °C por 5 minutos, anelamento a 45 °C e 50 °C, respectivamente, por 40

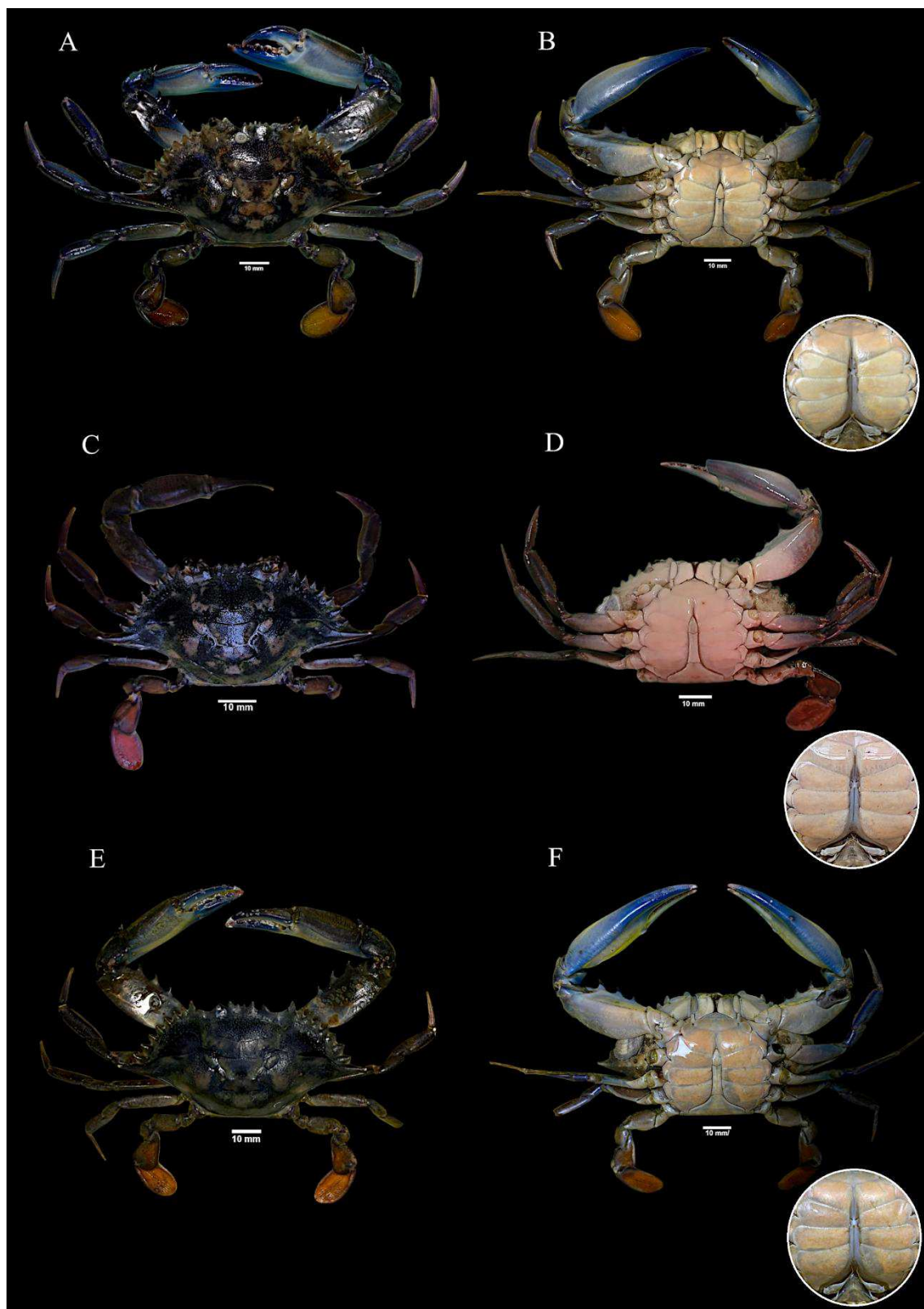
segundos, e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após a purificação, os produtos de PCR foram sequenciados (sequenciamento Sanger) por um serviço terceirizado. As sequências geradas (BOLD: JCABR020-25; CABR021-25, JCABR022-25) foram comparadas com as sequências da mesma espécie disponíveis nos bancos de dados públicos BOLD Systems (Barcode of Life Data Systems) e Genbank para confirmar o status taxonômico dos espécimes.

A identificação morfológica dos três espécimes apontou para *C. marginatus*. Todos os três espécimes eram machos adultos com larguras de carapaça variando de 84 a 87 mm e pesos úmidos variando de 13,5 a 37,5 g. A descrição a seguir é adaptada de Rodrigues (1982): carapaça grosseiramente granulada; frente com quatro dentes frontais, com o par medial tendo menos da metade do comprimento do par lateral; oito dentes laterais distintos (incluindo os orbitais externos) direcionados para frente e seguidos por um forte espinho lateral; coloração da carapaça predominantemente marrom-claro e preto formando um padrão marmorizado em toda a superfície; quelípedes variando de azul-escuro a azul-acinzentado-claro (Figura 2 a, c, e). Os gonópodes eram curtos e separados uns dos outros (Figura 2 b, d,f).

A identificação do DNA foi inconclusiva, pois os índices de similaridade foram altos para *C. marginatus* (98,88%) e *C. larvatus* (99,84%). Esses resultados corroboram a árvore filogenética de Robles et al. (2024) com base nos genes ribossomais mitocondriais 12S e 16S, mostrando que ambas as espécies formam um único clado. Isso indica que *C. marginatus* e *C. larvatus* são espécies irmãs, provavelmente derivadas de um processo de especiação recente. Assim, o nível de polimorfismo do COI não permite diferenciar essas espécies com esse marcador, portanto, outros marcadores com melhor resolução devem ser testados.

Apesar dessa limitação molecular, Manning e Holthuis (1981) já haviam demonstrado diferenças morfológicas entre *C. marginatus* e *C. larvatus*. Contudo, houve mudança na

108 história taxonômica destes indivíduos, por um período, alguns autores consideraram essas
109 espécies como sinônimas (ex. Ng et al. 2008; Coelho et al. 2008; Silva et al. 2020).
110 Entretanto, a proposta de sinonímia, posteriormente foi questionada por Robles et al (2024),
111 devido à ausência de uma análise taxonômica formal que a sustentasse. Embora a nossa
112 análise molecular não tenha sido conclusiva sobre a identidade taxonômica, avaliação
113 morfológica demonstrou de forma consistente de que os espécimes pertencem a *C. marginatus*.
114 Assim, este estudo apresenta o primeiro registro de ocorrência da espécie *C. marginatus* no
115 estado do Maranhão, litoral norte do Brasil, atualizando seu mapa de distribuição na costa
116 brasileira e ampliando a diversidade de espécies do gênero *Callinectes* conhecidas para a
117 costa Amazônica brasileira.



118 Figura 2. Fotografia de espécimes de *Callinectes marginatus*. A, C, E - Vista dorsal. B, D, F -
 119 Vista ventral (o zoom indica os gonópodes dos machos).

REFERÊNCIAS

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Barros MP, Pimentel FR, Silva SB (1997) Novos registros de Brachyura (Crustacea, Decapoda) para o litoral do Estado do Pará, Brasil. *Nauplius* 5: 153–154.
- Braga AA, Oliveira ACM, Zappes CA (2021) Caracterização da pesca e importância dos crustáceos a partir da percepção de pescadores artesanais do sul do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais* 16: 59–71. <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v16i1.208>
- Boos H, Buckup GB, Buckup L, Araujo PB, Magalhães C, Almerão MP, Santos RA, Mantelatto FLM (2012) Checklist of the Crustacea from the state of Santa Catarina, Brazil. *Check List* 8: 1020–1046. <https://doi.org/10.15560/8.6.1020>
- Coelho PA, Ramos-Porto M (1980) Crustáceos decápodos da costa do Maranhão, Brasil. *Boletim do Instituto Oceanográfico* 29: 135–138.
- Coelho PA, Almeida AOD, Bezerra LEA (2008) Checklist of the marine and estuarine Brachyura (Crustacea: Decapoda) of northern and northeastern Brazil. *Zootaxa* 1956: 1–58.
- Farrell EM, Neumann A, Beermann J, Wrede A (2024) Raised water temperature enhances benthopelagic links via intensified bioturbation and benthos-mediated nutrient cycling. *PeerJ* 12: 17047. <https://doi.org/10.7717/peerj.17047>

- 140 Folmer O, Black MB, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification
141 of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.
142 *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.
- 143 Fransen C (2014) True Crabs. Em: Carpenter KE, De Angelis N (Eds.). *The living marine*
144 *resources of the Eastern Central Atlantic. Vol. 1.: Introduction, crustaceans, chitons, and*
145 *cephalopods*. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes, Rome. p.249–358.
- 146 Manning RB, Holthuis LB (1981) West African Brachyuran Crabs (Crustacea: Decapoda).
147 *Smithsonian contributions to zoology* 306: 1–379. <http://dx.doi.org/10.5479/si.00810282.306>
- 148 Melo GAS (1996) Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do litoral
149 brasileiro, Editora Plêiade, São Paulo, 317p.
- 150 Nascimento WR, Souza-Filho PWM, Proisy C, Lucas RM, Rosenqvist A (2013) Mapping
151 changes in the largest continuous Amazonian mangrove belt using object-based classification
152 of multisensor satellite imagery. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 117: 83–93.
153 <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.10.005>
- 154 Ng PKL, Guinot D, Davie PJF (2008) Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist
155 of extant brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin Of Zoology* 17: 1–286.
- 156 Robles R, Schubart CD, Felder DL (2024) Molecular Phylogenetic Reassessment of Eastern
157 Atlantic *Callinectes* (Brachyura, Portunidae). *Crustaceana* 97: 865–874.
158 <https://doi.org/10.1163/15685403-bja10416>
- 159 Rodríguez BD (1982) Los cangrejos de la familia Portunidae (Decapoda: Brachyura) del
160 Caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 12: 137–184.
161 <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.1982.12.0.501>

- 162 Rosa Filho JS, Pereira LCC, Aviz D, Braga CF, Monteiro MC, da Costa RAM, Asp NE,
 163 Beasley CR (2018) Benthic Estuarine Assemblages of the Brazilian North Coast (Amazonia
 164 Ecoregion). In: Lana P, da C Bernardino AF (Eds.), *Brazilian Estuaries: A Benthic*
 165 *Perspective*, Springer International Publishing, Cham, p.39–74.
- 166 Schubart CD, Huber MGJ (2006) Genetic comparisons of german populations of the stone
 167 crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Astacidae). *Bulletin français de la pêche*
 168 *et de la pisciculture* 380-381: 1019–1028. <http://dx.doi.org/10.1051/kmae:2006008>
- 169 Silva KCA, Cintra IHA, Ramos-Porto M, Viana GFS, Abrunhosa FA, Cruz R (2020) Update
 170 on crustaceans known from the Amazonian continental shelf and adjacent oceanic areas.
 171 *Crustaceana* 93: 687–701. <http://dx.doi.org/10.1163/15685403-bjal.0062>
- 172 Sousa DB, Santos NB, Oliveira VM, Carvalho-Neta RNF, Almeida ZS (2015) Carcinofauna
 173 bêmica estuarina de dois manguezais da costa amazônica maranhense, Brasil. *Iheringia. Série*
 174 *Zoologia* 105: 339–347. <https://doi.org/10.1590/1678-476620151053339347>

CAPÍTULO III

**Primeiro registro de canibalismo no caranguejo azul *Callinectes ornatus* Ordway, 1863
(Decapoda: Portunidae) observado na costa Amazônica Maranhense**

Este manuscrito foi escrito nas normas da revista Acta Biológica Colombiana

Print version ISSN: 0120-548X (print) | On-line version ISSN: 1900-164

FORMATO ÚNICO DE SOMETIMIENTO DE MANUSCRITOS A LA REVISTA
ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA

Bianca dos Santos COSTA¹, Jaqueline Pereira SÁ¹, Luis Fernando CARVALHO-COSTA²

PRIMEIRO REGISTRO DE CANIBALISMO NO CARANGUEJO-AZUL *Callinectes*
ornatus **ORDWAY, 1863 (DECAPODA: PORTUNIDAE)**

PRIMER REGISTRO DE CANIBALISMO EN EL CANGREJO NATADOR AZUL
Callinectes ornatus **ORDWAY, 1863 (DECAPODA: PORTUNIDAE)**

RESUMO

Relatamos um caso de canibalismo não induzido em *Callinectes ornatus* Ordway, 1863, na costa Amazônica brasileira. O estágio inicial de desenvolvimento da presa e sua ecdise recente podem ter aumentado suas chances de predação; além disso, o aumento da densidade populacional na poça de maré durante a maré baixa também pode ter facilitado a interação alimentar. Esta descoberta contribui para uma melhor compreensão da ecologia populacional de *C. ornatus*, esclarecendo um mecanismo envolvido em sua regulação populacional.

Palavras-chaves: Ecologia de crustáceos, ecdise, predação intraespecífica, regulação populacional

RESUMEN

Reportamos un caso de canibalismo no inducido en *Callinectes ornatus* Ordway, 1863, en la costa amazónica brasileña. El desarrollo temprano de la presa y su reciente ecdisis podrían haber aumentado sus posibilidades de depredación; además, la mayor densidad poblacional en la poza de marea durante la marea baja también podría haber facilitado las interacciones

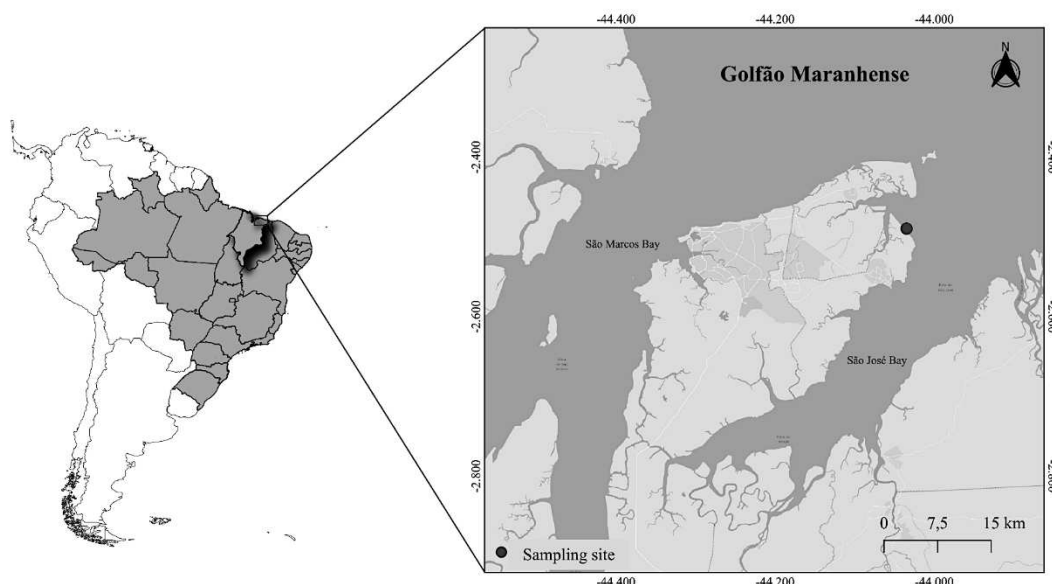
alimentarias. Este hallazgo contribuye a una mejor comprensión de la ecología poblacional de *C. ornatus*, aclarando un mecanismo involucrado en su regulación poblacional.

Palabras clave: Ecología de crustáceos, ecdisis, depredación intraespecífica, regulación poblacional

O canibalismo é comum entre crustáceos decápodes (caranguejos, lagostas e lagostins) (Houghton et al., 2017; Romano e Zeng, 2016; Crane e O'Connor, 2021). No entanto, a maioria dos estudos é conduzida em cativeiro ou na natureza por algum método induzido (por exemplo, amarração) (ex. Peery, 1989; Ryer et al., 1997; Romano e Zeng, 2016). Além disso, muitos registros não são observações diretas (ex. Marshall et al., 2005). Em caranguejos-nadadores-azuis do gênero *Callinectes* Stimpson, 1860, os registros são restritos a *Callinectes sapidus* Rathbun, 1869 em cativeiro ou na natureza por amarração (Hines e Ruiz, 1995; Ryer et al., 1997; Moir e Weissburg, 2009; Bromilow e Lipcius, 2017). Experimentos de amarração podem alterar o comportamento natural dos indivíduos, deixando-os mais vulneráveis a ataques de predadores ou prejudicando sua capacidade de escapar e buscar abrigo (Ryer et al., 1997); portanto, os resultados podem não refletir interações naturais. Aqui, relatamos o primeiro registro de canibalismo em *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 na natureza sem amarração.

Os dois espécimes machos de *C. ornatus* foram observados fortuitamente sob uma rocha em uma poça de maré na praia de Panaquatira (02°28'18.51"S 44°03'25.15"W) no estado do Maranhão (Costa Amazônica Brasileira) em 5 de outubro de 2024 (15:00) no pico da maré baixa (Fig. 1). O comportamento foi registrado em fotos e vídeo. Os indivíduos foram eutanasiados em gelo e identificados seguindo Williams (1974) e Melo (1996). Tecidos musculares de quelípodos foram armazenados em etanol 100% para análise de DNA. Os espécimes foram fixados em formalina 10%, preservados em etanol 70% e depositados em

47 uma coleção biológica (Vouchers: CFMCR114/CFMCR115; CoFauMa, Universidade
48 Estadual do Maranhão).



49
50 Fig. 1 Localização da Praia de Panaquatira, Estado do Maranhão (Costa Amazônica
51 Brasileira), onde ocorreu o registro de canibalismo em *Callinectes ornatus*.

52 O DNA foi extraído seguindo Aljanabi & Martinez (1997). Um fragmento do gene
53 Citocromo c oxidase subunidade I foi amplificado pelo método de reação em cadeia da
54 polimerase (PCR) usando os primers LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994) como segue:
55 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos iniciando 94 °C por 30 segundos, 45 °C por 40 segundos e 72
56 °C por 1 minuto; 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram sequenciados e a
57 sequência produzida (BOLD Systems: JCABR001-25) foi comparada com aquelas
58 disponíveis nos bancos de dados BOLD Systems (Barcode of Life Data System) e Genbank
59 (National Center for Biotechnology Information) para confirmar o status taxonômico.

A identificação morfológica só foi possível para o predador (Fig. 2a-b) porque a carapaça da presa estava muito danificada (Fig. 2c). No entanto, o DNA confirmou a presa como *C. ornatus* (índice de similaridade de 99,81% no BOLD e 99,76% no GenBank). O predador também foi identificado como *C. ornatus* seguindo a descrição adaptada por Melo (1996): carapaça com quatro dentes frontais de tamanhos desiguais, em que o par lateral é mais proeminente que o mediano – às vezes rudimentar; dois espinhos laterais de comprimento moderado na carapaça; margens anterolaterais da carapaça com dentes extensivamente arqueados (exceto os orbitais externos e os espinhos laterais); a superfície da carapaça tem granulações maiores na metade anterior e menores nas regiões cardíaca e metagástrica; o carpo do quelípede é quase liso (Fig. 2a); os gonópodes do macho são curtos, quase alcançando a sutura entre os esternitos torácicos VI e VII (segmentos do exoesqueleto na região ventral), cruzando-se próximo à base, mas divergindo distalmente (Fig. 2b).

Os indivíduos diferiam em tamanho, estágio de desenvolvimento e integridade corporal. O predador tinha um comprimento de carapaça e largura medindo 31 e 66 mm, respectivamente. Todos os pereiópodes estavam intactos, exceto por um quelípede direito ausente (pinça) (Fig. 2a-b). A presa tinha um comprimento de carapaça e largura medindo 27 e 45 mm, respectivamente. Metade da parte dorsal da carapaça estava danificada, alguns pereiópodes estavam ausentes e outros estavam parcialmente amputados (possivelmente pelo predador), um dos quais o predador estava se alimentando. Um dos pereiópodes era mole e pouco desenvolvido, mostrando que este macho havia passado recentemente por uma muda (ecdise) (Fig. 2c-d). A presa também mostrou uma aderência do pleon (seção abdominal), uma indicação de seu estágio inicial de desenvolvimento em comparação com o predador (Fig. 2c-d). Durante a predação, a presa permaneceu imóvel, não demonstrando nenhuma tentativa de defesa, possivelmente morta (veja o Vídeo em <https://youtu.be/In4Ud9htAr8>).

Este é o primeiro registro de canibalismo em uma espécie de *Callinectes* na natureza sem condições de amarração. Em condições induzidas na natureza ou em cativeiro, esse comportamento já foi relatado para *C. sapidus* (Peery, 1989; Ryer et al., 1997; Bromilow e Lipcius, 2017). Em condições de amarração, os indivíduos são capturados e monitorados (ex. Peery, 1989; Ryer et al., 1997; Ferner e Chang, 2005); portanto, os resultados podem não refletir as condições naturais que poderiam diminuir o risco de predação, como a presença de refúgios (Peery, 1989, Ryer et al., 1997, Ferner e Chang, 2005).

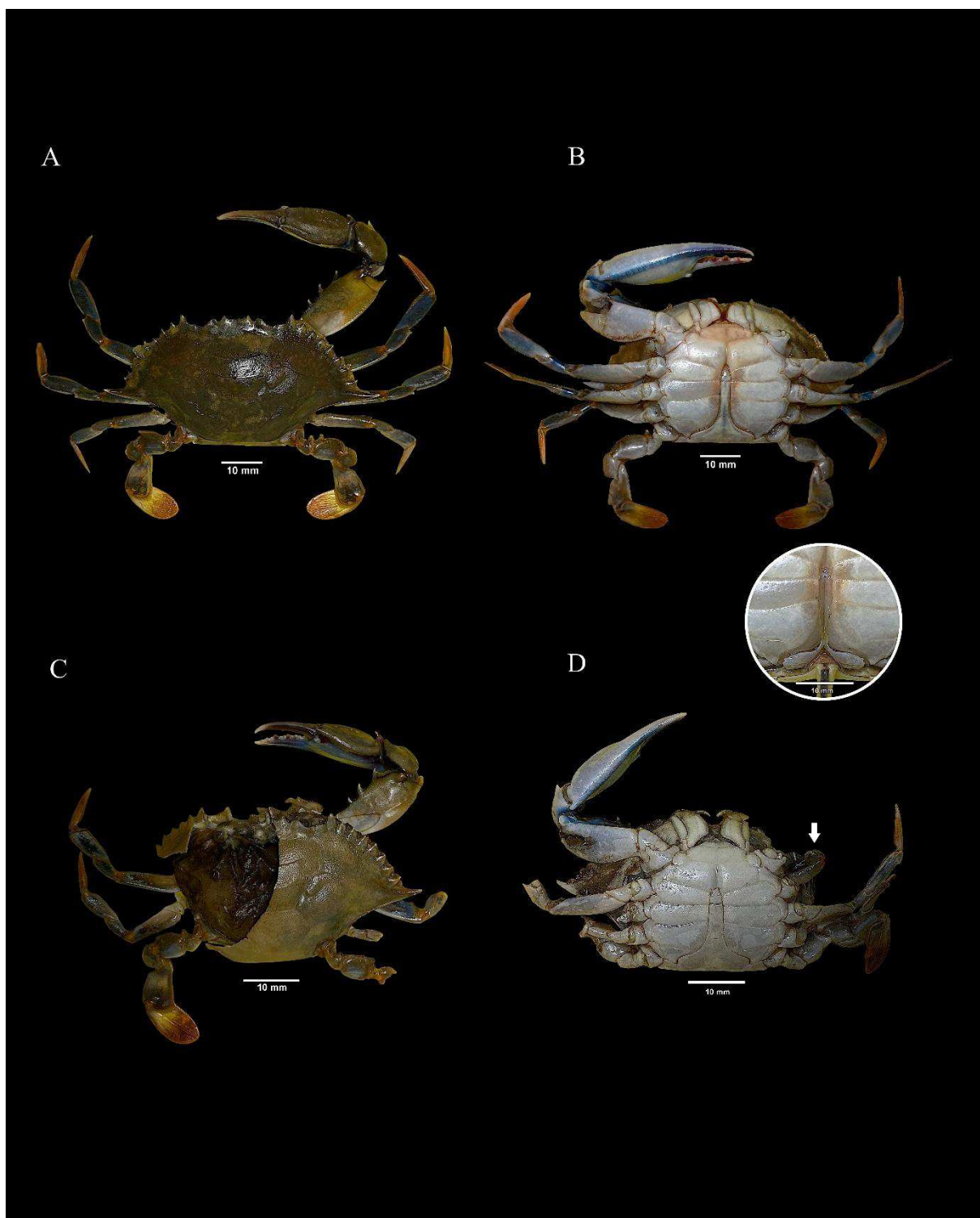
A disponibilidade de refúgios pode diminuir a vulnerabilidade ao canibalismo (Marshall et al., 2005). No caso relatado, o comportamento foi observado sob uma rocha em uma poça de maré cheia de refúgios rochosos; no entanto, a presença de refúgios não garante segurança contra predadores, uma vez que a alta densidade populacional nesses ambientes pode facilitar interações agressivas (Mansour e Lipcius, 1991; Clark et al., 1999). A observação foi feita durante a maré baixa, quando o tamanho e a profundidade das poças de maré estavam em seu mínimo, o que pode ter aumentado a densidade de *C. ornatus* e contribuído para o avistamento e o ataque. É também na maré baixa que os intestinos desses animais estão majoritariamente vazios, o que também pode estimular o canibalismo em contextos de alta densidade populacional (Ryer, 1987).

Os diferentes estágios de desenvolvimento de predador e presa também podem ter sido decisivos, uma vez que o maior estava predando o menor. O mesmo ocorreu para *C. sapidus*, no qual foi demonstrada uma relação entre tamanho corporal e predação intraespecífica (Peery, 1989; Bromilow e Lipcius, 2017). Uma dinâmica hierárquica baseada no tamanho corporal parece ser responsável pelo comportamento agressivo comum das espécies de *Callinectes*, em que indivíduos maiores tendem a ser mais agressivos com os menores (Clark et al., 1999), aumentando o risco destes últimos serem canibalizados. Indivíduos de *C.*

sapidus com tamanhos corporais maiores têm maior sobrevivência (Bromilow e Lipcius, 2017). Em outro caranguejo-azul, *Portunus pelagicus* Linnaeus, 1758, indivíduos menores também são mais vulneráveis ao canibalismo (Marshall et al., 2005). A mortalidade por predação é menor em indivíduos maiores de *Callinectes* porque sua carapaça mais dura e espinhos mais proeminentes dificultam sua captura e manipulação; além disso, indivíduos maiores tendem a ser mais agressivos e combativos na presença de um predador em potencial (Hines e Ruiz, 1995).

Outro fator relevante para o evento de canibalismo relatado aqui é que a presa havia passado por ecdise recentemente. Durante a ecdise, os crustáceos perdem seu antigo exoesqueleto para permitir o crescimento, mas o novo exoesqueleto, inicialmente macio, aumenta a vulnerabilidade à predação (Ryer et al., 1997). Por exemplo, *C. sapidus* é mais vulnerável ao canibalismo durante a ecdise (Ryer et al., 1997); o mesmo ocorre com *P. pelagicus* (Marshall et al., 2005). Além de seu exoesqueleto macio, os indivíduos em muda liberam substâncias químicas na água que podem ser detectadas por predadores (Zi et al., 2023).

O canibalismo pode ser uma importante fonte de regulação do tamanho populacional em espécies de *Callinectes* (Hines e Ruiz, 1995). Em *C. sapidus*, é uma causa de mortalidade ainda mais dominante do que a predação interespecífica (Hines e Ruiz, 1995; Bromilow e Lipcius, 2017). Nosso estudo contribui para uma melhor compreensão da ecologia do gênero *Callinectes* em condições naturais, lançando luz sobre um possível mecanismo fundamental de regulação de suas populações.



130

131 Fig. 2 Fotografia dos espécimes de *Callinectes ornatus* envolvidos no canibalismo. a - Vista
 132 dorsal do predador. b - Vista ventral do predador (zoom do gonópode macho). c - Vista dorsal
 133 da presa. d - Vista ventral da presa (a seta branca indica um pereiópode mole e pouco
 134 desenvolvido).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao governo brasileiro (CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos a Bianca S. Costa e pelo apoio financeiro ao seu projeto de pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- Aljanabi, S.M and Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* , 25(22), 4692–4693. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>.
- Bromilow, A.M. and Lipcius, R.N. (2017) Mechanisms governing ontogenetic habitat shifts: role of trade-offs, predation, and cannibalism for the blue crab. *Marine Ecology Progress Series*, 584: 145–159. Doi: <https://doi.org/10.3354/meps12405>.
- Clark, M.E., Wolcott, T.G., Wolcott, D.L., Hines, A.H. (1999). Intraspecific interference among foraging blue crabs *Callinectes sapidus*: interactive effects of predator density and prey patch distribution. *Marine Ecology Progress Series*, 178: 69–78. Doi: <https://doi.org/10.3354/meps178069>.
- Crane, L.C. and O’connor, N.J. (2021). Cannibalism as a potential factor affecting recruitment of the invasive Asian shore crab *Hemigrapsus sanguineus*. *Marine Biology*, 168: 46.168: 46. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00227-021-03849-4>.

- 155 Ferner, M.C., Smee, D.L., Chang, Y.P. (2005). Cannibalistic crabs respond to the scent of
 156 injured conspecifics: danger or dinner?. *Marine Ecology Progress Series*, 300: 193–200. Doi:
 157 <https://doi.org/10.3354/meps300193>.
- 158 Folmer, O., Black, M.B., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for
 159 amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan
 160 invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*. 3(5), 294–299.
- 161 Hines, A.H. and Ruiz, G.M. (1995). Temporal variation in juvenile mortality: blue crabs,
 162 nearshore shallows, and cannibalism in Chesapeake Bay. *Bulletin of Marine Science*. 57(3),
 163 884–901.
- 164 Houghton, R.J., Wood, C., Lambin, X. (2017). Size-mediated, density-dependent cannibalism
 165 in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) (Decapoda, Astacidea), an
 166 invasive crayfish in Britain. *Crustaceana*, 90 (4), 417–435.
- 167 Mansour, R.A. and Lipcius, R.N. (1991). Density-dependent foraging and mutual interference
 168 in blue crabs preying upon infaunal clams. *Marine Ecology Progress Series*, 72: 239–246.
 169 Doi: <https://doi.org/10.3354/meps072239>.
- 170 Marshall, S., Warburton, K., Paterson, B., Mann, D. (2005). Cannibalism in juvenile blue-
 171 swimmer crabs *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1766): effects of body size, moult stage and
 172 refuge availability. *Applied Animal Behaviour Science*, 90 (1), 65–82. Doi:
 173 <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.07.007>.
- 174 Melo, G.A.S. Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do litoral
 175 brasileiro. São Paulo:Editora Plêiade, 1996. p. 312 -317.

- 176 Moir, F. and Weissburg, M.J. (2009). Cautious cannibals: Behavioral responses of juvenile
177 and adult blue crabs to the odor of injured conspecifics. *Journal of Experimental Marine*
178 *Biology and Ecology*, 369 (2), 87–92. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.10.026>.
- 179 Peery, C.A. Cannibalism Experiments with the Blue Crab (*Callinectes sapidus* Rathbun):
180 Potential Effects of Size and Abundance. M.S. Thesis. College of William and Mary-Virginia
181 Institute of Marine Science, United States, 1989. Doi: [https://dx.doi.org/doi:10.25773/v5-](https://dx.doi.org/doi:10.25773/v5-etbg-bx65)
182 [etbg-bx65](https://dx.doi.org/doi:10.25773/v5-etbg-bx65)
- 183 Romano, N. and Zeng, C. (2016). Cannibalism of Decapod Crustaceans and Implications for
184 Their Aquaculture: A Review of its Prevalence, Influencing Factors, and Mitigating Methods.
185 *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 25 (1), 42–69. Doi:
186 <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1221379>
- 187 Ryer, C.H. (1987). Temporal patterns of feeding by blue crabs (*Callinectes sapidus*) in a tidal-
188 marsh creek and adjacent seagrass meadow in the lower Chesapeake Bay. *Estuaries and*
189 *Coasts*, 10(2), 136–140. Doi: <https://doi.org/10.2307/1352178>.
- 190 Ryer, C.H., Montfrans, J.V., Moody K.E. (1997) Cannibalism, refugia and the molting blue
191 crab. *Marine Ecology Progress Series*, **147**: 77–85. Doi: <https://doi.org/10.3354/meps147077>
- 192 Williams, A.B. The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). *Fish*
193 *Bull* 1974; **72**: 685–798.
- 194 Zi, X., Li, Y., Li, G., Jia, B., Jeppesen, E., Zeng, Q., Gu, X. (2023). A molting chemical cue
195 (*N*-acetylglucosamine-6-phosphate) contributes to cannibalism of Chinese mitten crab
196 *Eriocheir sinensis*. *Aquatic Toxicology* 2023; **263**: 106666.



Emitido em 03/08/2026

RESUMO DE TRABALHO Nº 6/2026

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 03/08/2026 20:56)

RONALD SILVA DIAS

CHEFE DIVISAO

839738

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sis.sig.uema.br/documentos/> informando seu número:

6, ano: **2026**, tipo: **RESUMO DE TRABALHO**, data de emissão: **03/08/2026** e o código de verificação:

5b00f73367

