

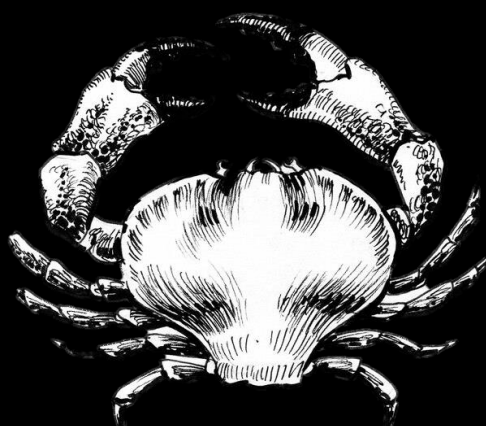
RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 06/09/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS DE BOTUCATU
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

Tese de Doutorado

**TAMANHO DO GENOMA DOS CRUSTÁCEOS (CARIDEA
E BRACHYURA). PARADIGMA OU PARADOXO?**



João Gabriel Barioto

Orientador: Antonio Leão Castilho

Botucatu

2024

**TAMANHO DO GENOMA DOS CRUSTÁCEOS
(CARIDEA E BRACHYURA). PARADIGMA OU
PARADOXO?**

JOÃO GABRIEL BARIOTO

Orientador: Prof. Dr. Antonio Leão Castilho

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação
em Ciências Biológicas – Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista – Unesp - *campus* de Botucatu,
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas –
Área de concentração: Zoologia.

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Barioto, João Gabriel.

Tamanho do genoma dos crustáceos (*Caridea* e *Brachyura*).
Paradigma ou paradoxo? / João Gabriel Barioto. - Botucatu,
2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Antonio Leão Castilho
Capes: 20400004

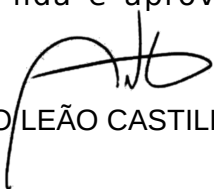
1. Água doce. 2. Tamanho do genoma. 3. Citometria de fluxo.
4. Decapoda (Crustacea).

Palavras-chave: Água doce; C-value; Citometria de fluxo;
Decapoda.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE JOÃO GABRIEL BARIOTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 06 dias do mês de março do ano de 2024, às 08:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de JOÃO GABRIEL BARIOTO, intitulada **Tamanho do genoma dos crustáceos (Caridea e Brachyura). Paradigma ou paradoxo?**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. ANTONIO LEÃO CASTILHO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biodiversidade e Bioestatística / Instituto de Biociências Unesp Câmpus de Botucatu, Pós doutoranda ISABELA RIBEIRO ROCHA DE MORAES (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biodiversidade e Bioestatística / Universidade Estadual Paulista - UNESP - campus Botucatu, Pesquisador GEORGE SHIGUEKI YASUI (Participação por Parecer Circunstanciado) do(a) Departamento de Reprodução Animal / Universidade de São Paulo, Profa. Dra. ARIÁDINE CRISTINE DE ALMEIDA (Participação Virtual) do(a) Instituto de Biologia / Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. ROGERIO CAETANO DA COSTA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Estadual Paulista - UNESP - campus Bauru. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. ANTONIO LEÃO CASTILHO



Documento assinado digitalmente

ANTONIO LEAO CASTILHO

Data: 12/03/2024 10:37:59-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico esta tese a todos aqueles que não desistiram de seus sonhos e mesmo diante das adversidades, escolheram lutar.

Dedico a minha mãe, meu maior exemplo de resiliência nesse mundo, e a meu pai, meu herói, que hoje assiste a conclusão desta etapa da minha vida lá do céu.

Ao **Prof. Dr. Antonio Leão Castilho** pela orientação desde o aperfeiçoamento até agora. Agradeço por me abrir as portas do laboratório desde sempre, por toda sua dedicação e confiança em mim depositada. Pelos teus conselhos, amizade, compreensão, puxões de orelha (e foram muitos, rs) e todo zelo e responsabilidade que teve comigo. Agradeço também por todos os conselhos e conversas em momentos científicos ou de descontração. Foram sempre de muita valia, e certamente os levarei para a vida toda. Muito obrigado!

Ao Ministério do Meio Ambiente - MMA, ao Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade - ICMBIO e ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO pela concessão da licença de coleta do material biológico analisado no presente estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos (CAPES nº 88887.509444/2020-00) durante o período do meu doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Zoologia **Roseli Aguiar, Flávio da Silva, e Hamilton Rodrigues** por todo o auxílio e disposição todas as vezes que eu precisei de algo. Um agradecimento especial ao **Silvio C. Almeida** por toda ajuda em campo e todas as conversas que compartilhamos nesse período.

Um agradecimento especial também ao funcionário da Fazenda Lageado **Dicão**. Por toda ajuda com as coletas e a descoberta de novos pontos e por todo ensinamento empírico que proporcionou a todos nós. Muito obrigado!

Aos amigos o LABIAQUA em especial **Renan (Greg), Isabela, Gabriel, Mateus, Isadora, Pedro (PH), Rafaela e Mariana (Magrela)**. Pela amizade, por toda a ajuda científica prestada e todos os momentos de descontração que tivemos durante estes

meus quatro anos em Botucatu. Apreendi muito com todos, e saibam que dentro desta tese existe um pouquinho de cada um de vocês. Muito obrigado, mesmo!

Agradecimentos especiais ainda à minha rede suporte “do lab pra fora do lab” **Gabriel, Renan (Greg) e Isabela**. Obrigado pelos momentos memoráveis nestes anos todos, pelos inúmeros e infalíveis jogos do parmera, os cafês, coletas, futs, cervejinha e desabafos. Obrigado por estarem comigo o tempo todo. Vocês foram primordiais.

Um agradecimento especial ao amigo **Caio dos Santos Nogueira**, por todo o auxílio na identificação dos animais e nos pontos de coleta, por me receber em sua casa e pelos conselhos ao longo da escrita desta tese. Valeu, Caião!

Um agradecimento especial a amiga **Isabela Moraes** por todo o auxílio na estruturação da tese, toda a ajuda no processamento dos materiais e nas análises de tamanho do genoma. Muito obrigado, Xapéla!

A todas as pessoas que estiveram envolvidas nas análises de citometria de fluxo/tamanho do genoma. A **Prof. Dra. Graziela Romagnolli Castilho** pelo treinamento e condução dos experimentos, ao **Dr. George Yasui** por toda a disponibilidade em ajudar, fornecer material e aconselhar, e a **Dr. Larissa Ragozo** por todo o auxílio, aplicação das ferramentas e manuseio do citômetro. Muito obrigado a todos vocês.

A minha família, em especial aos meus pais **João Luiz e Maria Luisa**. Por tudo que fizeram por mim até hoje, pela atenção e carinho desde sempre, e por acreditarem e me apoiarem em todas as minhas decisões. Vocês contribuíram para a construção da minha educação e do meu caráter e se hoje eu alcanço mais um degrau na minha vida, tenham a plena certeza de que vocês estão entre os principais responsáveis. Serão sempre os meus exemplos mais bonitos a serem seguidos vida afora.

A minha amada namorada **Samantha** por todo o carinho, paciência e companheirismo. Pela compreensão em todas as vezes em que “tivemos” que trabalhar nos finais de semana, todas as vezes em que eu quase surtei (e não foram poucas,rs!) e todo o apoio nos bons e maus momentos. Obrigado por acreditar em mim, me apoiar e me reanimar sempre que eu perdi a esperança. E por estar ao meu lado durante esses quase três anos.

A todas as pessoas que, porventura, tenham contribuído ou me auxiliado de alguma forma e a memória não me deixe lembrá-los entre tantos agradecimentos. A todos que torceram por mim e que acreditam na ciência em meio aos tempos que vivemos hoje em dia. Muito obrigado!

Sumário

RESUMO GERAL.....	2
GENERAL ABSTRACT	3
PRÓLOGO.....	4
OBJETIVOS GERAIS	18
HIPÓTESES.....	19
REFERÊNCIAS.....	19
<i>Cap. 1 - A first report of the Genome Size for the freshwater brachyuran family Trichodactylidae (Malacostraca: Decapoda)</i>	<i>27</i>
INTRODUCTION.....	29
MATERIAL AND METHODS	31
RESULTS	35
DISCUSSION	37
REFERENCES.....	40
<i>Cap. 2 - Tamanho do genoma para caranguejos da infraordem Brachyura associados a diferentes tipos de ambientes</i>	<i>44</i>
Resumo.....	45
Abstract	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	49
RESULTADOS.....	55
DISCUSSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	62
<i>Cap. 3 - Padrões de variação do tamanho do genoma para camarões do gênero Macrobrachium Spence Bate, 1868: perspectivas a respeito do tipo de desenvolvimento e tamanho</i>	<i>66</i>
Resumo.....	67
Abstract	68
INTRODUÇÃO	69
MATERIAL E MÉTODOS	71
RESULTADOS.....	76
DISCUSSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	84
EPÍLOGO.....	87

RESUMO GERAL

O subfilo Crustacea representa um grupo de invertebrados muito interessante para se estudar por muitas razões, dentre as quais pode-se citar sua diversidade evolutiva e ecológica, e por viverem em uma ampla variedade de habitats. Em escala longitudinal, desde o abismo profundo do oceano até lagoas temporárias de água doce; e latitudinal, desde a região equatorial à polar em ambos os hemisférios. Estudos focados em ordens específicas de crustáceos demonstraram uma relação entre o tamanho do genoma e padrões ecológicos, fisiológicos ou morfológicos. O presente projeto tem como objetivo elucidar de forma pioneira questões acerca da história evolutiva e do tamanho do genoma da fauna de crustáceos decápodes de Botucatu, além de espécies de outras localidades e ambientes, uma vez que são organismos de grande importância ecológica. As regiões de estudo incluíram as cidades de Botucatu, Iacanga, Piratininga e Ubatuba, locais de grande importância ecológica e com cenários ambientais distintos. Os indivíduos coletados foram levados vivos ao laboratório e assim permaneceram até iniciar o processo de descrição do tamanho do genoma por meio da Análise de Citometria de Fluxo (ACF). O material utilizado foi proveniente do tecido muscular do quelípodo dos caranguejos e das brânquias dos camarões. Para estimar o conteúdo do DNA, todas as análises foram realizadas com uma amostra de esperma de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875), a qual foi utilizada como padrão de calibração. O tamanho do genoma variou de 1,62 a 9,63 pg nos caranguejos e de 4,41 a 24,68 pg nos camarões, apresentando diferenças estatísticas em relação ao ambiente (água doce) e em relação ao tipo de desenvolvimento (direto ou abreviado). Houve também uma relação positiva em relação ao tamanho. Dentre os estudos genéticos, o tamanho do genoma surge como um novo recurso para estudos populacionais, biogeográficos e evolutivos, uma vez que variando entre os organismos, representa uma informação essencial para estudos com uma perspectiva evolutiva. Os próximos passos em pesquisas subsequentes se apoiarão nas informações obtidas a partir de resultados delineados em estudos como o descrito, que abordam a importância do peso do DNA nuclear. Estas informações estabelecerão uma ligação valiosa dentro das informações biológicas básicas fundamentais, abrangendo diversas abordagens, o que contribuirá significativamente para a compreensão da evolução de diversas espécies em níveis taxonômicos distintos.

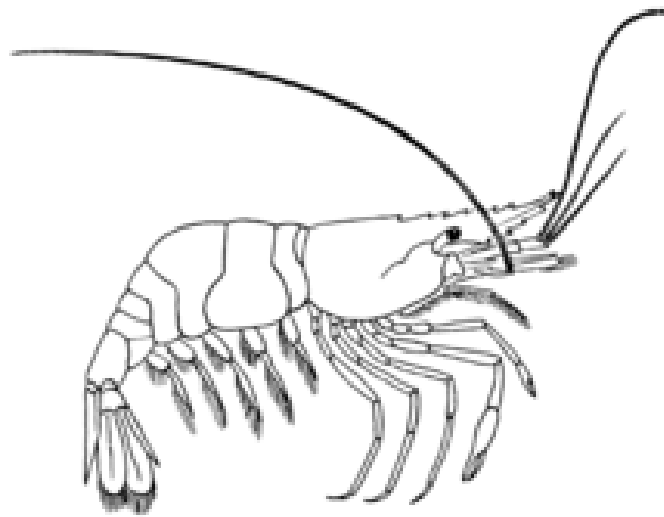
Palavras-chave: Água doce; citometria de fluxo; c-value; Decapoda.

GENERAL ABSTRACT

The subphylum Crustacea represents a very interesting group of invertebrates to study for various reasons, among which its evolutionary and ecological diversity can be highlighted. These organisms inhabit a wide range of habitats, i.e., in longitudinal gradient from the deep abyss of the ocean to temporary freshwater ponds, and latitudinal scales of equatorial until polar regions. Studies focused on specific orders of crustaceans have shown a relationship between genome size and ecological, physiological, or morphological patterns. The present project aims to pioneer the elucidation of questions regarding the evolutionary history and genome size of the decapod crustacean fauna in Botucatu, as well as species from other locations and environments. These organisms are of great ecological importance. The study areas included the cities of Botucatu, Iacanga, Piratininga, and Ubatuba, which are ecologically significant with distinct environmental scenarios. Collected individuals were brought alive to the laboratory and remained so until the genome size description process began using Flow Cytometry Analysis (FCA). The material used originated from the muscle tissue of crab chelae and the gills of shrimp. To estimate DNA content, all analyses were performed using a sperm sample of *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875), which served as a calibration standard. Genome size ranged from 1.62 to 9.63 pg in crabs and from 4.41 to 24.68 pg in shrimp, showing statistical differences related to the environment (freshwater) and the type of development (direct or abbreviated). There was also a positive relationship with size. Among genetic studies, genome size emerges as a new resource for population, biogeographic, and evolutionary studies, providing essential information for studies with an evolutionary perspective due to its variation among organisms. Subsequent research steps will build upon the information obtained from studies like the one described, emphasizing the importance of nuclear DNA weight. These insights will establish a valuable link within fundamental biological information, spanning various approaches, significantly contributing to the understanding of the evolution of various species at different taxonomic levels.

Keywords: Freshwater; flow cytometry; c-value; Decapoda

PRÓLOGO



História evolutiva

O clado que inclui os crustáceos e os hexápodes é conhecido como Pancrustacea. As classificações da vida são originadas de árvores filogenéticas ou evolutivas e, assim, geralmente incluem apenas os grupos monofiléticos (Brusca *et al.*, 2018). Dentro deste conceito, os crustáceos representam um grupo de invertebrados muito interessante para se estudar por muitas razões, dentre as quais pode-se destacar a sua diversidade evolutiva e ecológica. Ao todo são descritas em torno de 68.000 espécies, divididas em seis classes: Branchiopoda, Cephalocarida, Maxillopoda, Malacostraca, Ostracoda e Remipedia (Martin & Davis, 2001; Martin & Davis, 2006; Ah Yong *et al.*, 2011). Os crustáceos vivem em uma ampla variedade de habitats, com registros desde o abismo profundo do oceano até lagoas temporárias de água doce em regiões temperadas, tropicais e polares (Jeffery, 2015).

Além da grande diversidade de ambientes aquáticos em que são encontrados, ainda existem espécies terrestres e semiterrestres, o que demonstra também uma grande capacidade adaptativa no grupo (Welch & Eversole 2006; Lavery *et al.*, 1996; Broly *et al.*, 2013). Salienta-se ainda que tais animais exibem uma ampla variação de tamanho e disparidade morfológica, uma vez que são encontradas espécies muito pequenas como o ectoparasita *Stygotantulus stocki* Boxshall & Huys, 1989 (com tamanho menor que 0,1mm) e espécies muito grandes como o caranguejo aranha japonês *Macrocheira kaempferi* (Temminck, 1836), que chega a atingir uma envergadura (medida com as patas esticadas) de 3,8 m e um peso de 19 kg. Dentro do grupo ainda existe uma variedade de modos de desenvolvimento, incluindo desenvolvimento direto e indireto. Apesar do estágio larval plesiomórfico ser o nauplius, algumas espécies não possuem tal estágio e geram progênies que se desenvolvem diretamente em versões similares às formas adultas (Dahms, 2000; Jeffery, 2015).

Dentre os malacóstracos, encontra-se a ordem Decapoda, a qual tem sido assunto da maioria das pesquisas conduzidas com crustáceos, não somente pela grande importância comercial de seus representantes como também pela enorme diversidade e alta capacidade adaptativa (Martin & Davis, 2001). Atualmente, os decápodos contabilizam um montante aproximado de 14.750 espécies existentes, distribuídas entre 2.700 gêneros (De Grave *et al.*, 2009). Os decápodes habitam uma ampla variedade de habitats, incluindo águas oceânicas, fundos marinhos, recifes de corais, manguezais e estuários, áreas lamacentas e arenosas entre marés, riachos e lagos de água doce e até mesmo ecossistemas terrestres (Martin & Davis, 2001; De Grave *et al.*, 2009). Sua plasticidade ecológica se reflete em uma ampla gama de características adaptativas morfológicas, fisiológicas, reprodutivas e comportamentais. Tais características associadas à importância tanto socioeconômica quanto biológica, fazem dos Decapoda um interessante grupo modelo no estudo da evolução dos crustáceos, incluindo a evolução do tamanho e complexidade do genoma, além de um sequenciamento genético completo. Isso tem sido útil para estudar a resistência a doenças e padrões de crescimento, bem como entender a filogenia dos crustáceos como um todo (Alcivar-Warren *et al.*, 2007, Clark *et al.*, 2011, Parchem *et al.*, 2010, Zeng *et al.*, 2011).

Embora a maioria dos camarões carídeos habite ambientes marinhos, alguns podem ser encontrados em áreas de água doce e estuários, onde passam parte de suas vidas antes de retornar às regiões de água do mar para reprodução (Smaldon *et al.*, 1993). A diversidade e complexidade na biologia e ecologia desse grupo são provavelmente resultado de sua adaptação a uma variedade de ambientes ao longo da evolução (Pereira, 1997; Bauer, 2004). As espécies pertencentes ao gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 fazem parte desse conjunto, abrangendo aquelas que apresentam relevância econômica para atividades humanas, além de desempenharem um papel notável e essencial nos

ecossistemas de água doce e estuarinos em regiões tropicais e temperadas ao redor do mundo (Mantelatto & Barbosa, 2005). Existem mais de 7.000 espécies conhecidas de caranguejos verdadeiros pertencentes a quase 100 famílias que apresentam extrema diversidade morfológica (Ahyong *et al.* 2007, Tsang *et al.* 2014). Existem mais de 1.300 espécies de caranguejos inteiramente de água doce que passam por desenvolvimento direto em vez de terem estágios larvais, embora a maioria viva em habitats salobros ou marinhos (Tsang *et al.* 2014). A exploração comercial desenfreada e a captura de espécies não comerciais (capturas acessórias) pela pesca também afetam as comunidades bentônicas, uma vez que intensificam os desequilíbrios na cadeia alimentar e podem causar perturbações ambientais, tais como a sobre-exploração de recursos, a degradação da paisagem, a poluição ambiental (ar, água e sedimentos), a erosão e o processo de sedimentação das zonas costeiras marinhas (Severino-Rodrigues *et al.*, 2002; Worm *et al.*, 2009).

Estudos focados em ordens específicas de crustáceos demonstraram uma relação entre o tamanho do genoma associado a alguma característica, seja ela ecológica, fisiológica ou morfológica. Para os Amphipoda, Hessen & Persson (2009), Ritchie *et al.* (2017), Hultgren *et al.* (2018) e Hancock *et al.* (2021) relacionaram o tamanho do genoma ao tamanho do corpo, latitude, temperatura e profundidade da água. Para os Ostracoda e Cladocera, Hessen & Persson (2009) e Jeffery *et al.* (2017) relacionaram o tamanho do genoma ao tamanho corporal. Já para Copepoda, Gregory *et al.* (2000), Wyngaard *et al.* (2005) e Hultgren *et al.* (2018) relacionaram o tamanho do genoma com as taxas metabólicas e de desenvolvimento, tamanho corporal e latitude. Apesar da importância antes relatada da ordem Decapoda, um padrão de correlação consistente ainda não foi encontrado para tais indivíduos. A presente tese visa inclusive elucidar alguns pontos a respeito dessa problemática, comparando espécies em que o tamanho do genoma ainda

não foi descrito. Foram analisados e comparados animais com diferentes tipos de tamanho, desenvolvimento e habitat, e as informações obtidas contribuirão para o entendimento da história de vida e importância destas espécies. Foram coletados animais dulcícolas, sendo os caranguejos *Trichodactylus fluviatilis* Latreille, 1828 e *Trichodactylus petropolitanus* (Göldi, 1886) e os camarões do gênero *Macrobrachium* os representantes, animais de mangue/estuário sendo as espécies *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803), *Leptuca lepdodactyla* (Rathbun, 1898), *Minuca mordax* (Smith, 1870) e *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) e também indivíduos marinhos, consideradas aqui as espécies *Persephona punctata* (Linnaeus, 1758) e *Hepatus pudibundus* (Herbst, 1785).

Tamanho do genoma

Duas propriedades fundamentais de todos os sistemas vivos são seu tamanho físico e a quantidade de seu material genético (DNA) por célula (Greilhuber *et al.*, 2005). O tamanho do genoma, a quantidade em massa de DNA no genoma, refere-se ao conteúdo total de DNA contido em um único conjunto de cromossomo. Trata-se da “biomassa” das informações contidas nos genes e cromossomos dos eucariotos e é mensurado em picogramas (pg) do DNA por núcleo haploide (Gregory, 2005). Essa informação valiosa exibe uma variabilidade extremamente alta na Árvore da vida, intra e interespecificamente em vários níveis taxonômicos de animais e plantas (Gregory, 2021; Cavalier-Smith, 1978; Gregory, Hebert & Kolasa, 2000). Essa biomassa é interpretada a partir da constante denominada como “c-value” (ou valor de c) e derivada da denominação de Swift (1950), que se refere ao núcleo do DNA nuclear haploide mencionando que no caso de espécies haplóides, o “c-value” e “genome size” são intercambiáveis.

O padrão evolutivo e a modulação do tamanho do genoma em organismos é um enigma constante e os trabalhos futuros têm visualizado a resposta e interpretação destes valores correlacionados com a biologia e história de vida dos animais (Jeffery *et al.*, 2016; Hultgren *et al.*, 2018; Chak *et al.*, 2021). Apesar disso, a comparação de espécies taxonômicas válidas e o número de espécies que tiveram o tamanho do genoma descrito ainda é muito discrepante (Rees *et al.*, 2008).

É fato que o tamanho do genoma mostra uma grande variabilidade entre e dentro de vários níveis taxonômicos de animais e plantas, e tais variações levaram a formulação de uma série de hipóteses relacionadas aos mecanismos que regulam o tamanho do genoma (Cavalier-Smith, 1978; Gregory, Hebert & Kolasa, 2000). Muito esforço tem sido empregado para explicar tais mecanismos e a quantidade abundantes de DNA não-codificante nos genomas, atribuindo a esse DNA não-codificante a denominação de “DNA egoísta” (Dawkins, 1976; Orgel & Crick, 1980), onde a codificação é puramente no gene ou no íntron. A outra grande hipótese seria da forte relação entre o tamanho do genoma e o tamanho celular, o que pode ser explicado já que células grandes necessitam de genomas grandes por razões meramente estruturais e para um transporte de RNAm mais eficiente para o citoplasma (Hessen & Persson, 2009).

Tais observações não são novas. Notavelmente, no final da década de 40 e início da década de 50 diferenças significativas no tamanho do genoma entre espécies morfológicamente semelhantes e a ocorrência de genomas relativamente maiores em organismos comparativamente simples foram descritos. Isso permaneceu suficientemente confuso durante anos, até ser apelidado de “paradoxo do valor de C” (Thomas, 1971). Contudo, a compreensão contemporânea da estrutura e função do genoma refutou a concepção do genoma como meras coleções lineares de genes, invalidando a interpretação da variação no tamanho do genoma como algo “paradoxal” (ainda que

diversos aspectos permaneçam perplexos). Como resultado, o termo “enigma do valor de C” surgiu e entende-se mais adequado (Gregory, 2000).

De fato, o mistério envolvendo o enigma do valor C não se trata de uma única questão, mas sim de três distintas. Qualquer resolução sugerida para desvendar esse quebra-cabeça deve abordar os seguintes aspectos (Gregory, 2002):

(1) a criação de uma ampla variedade de tamanho do genoma, que pode surgir através de processos contínuos ou quânticos;

(2) as distribuições de variação no tamanho do genoma que não seguem padrões aleatórios, incluindo grupos com variações significativas e outros com limitações aparentes;

e (3) a notável correlação positiva entre o valor C e os tamanhos nucleares e celulares, além da correlação negativa com as taxas de divisão celular.

A enorme variabilidade no tamanho do genoma citada anteriormente também pode ser encontrada no subfilo Crustacea, onde o tamanho do genoma observado varia mais de duas ordens de grandeza ($< 0,2$ a > 60 pg) (Gregory, 2008). Parte dessa variabilidade pode ser reflexo de processos evolutivos. Porém, táxons filogeneticamente próximos podem ter tamanhos de genoma amplamente diferentes (Hardie & Hebert, 2004; Rees *et al.*, 2007). Tais diferenças podem ser atribuídas também a adaptações evolutivas que refletem diferentes estratégias de ciclo de vida ou diferenças na complexidade corporal e nos ciclos de vida (White & McLaren, 2000; Gregory, 2002; Hessen *et al.*, 2008).

O conhecimento do tamanho do genoma torna-se útil e necessário quando partimos do pressuposto dele como estritamente atuante no desenvolvimento de muitos recursos genômicos. Dada a sua representatividade, os invertebrados marinhos atualmente são sub-representados em estudos com tal enfoque. O número atual de trabalhos sobre o tamanho do genoma é insignificante em comparação com o nível de diversificação de organismos marinhos como os Crustacea (Bonnivard *et al.*, 2009). Consequentemente, os padrões de variação do tamanho do genoma entre os táxons permanecem indefinidos e somente comparações amplas são possíveis.

Áreas de estudo

O município de Botucatu está localizado na porção central do estado de São Paulo, situado numa área com características geomorfológicas e climáticas particulares, denominada regionalmente de Cuesta de Botucatu (Uieda & Motta, 2004). O clima da região, baseado na classificação de Köppen é do tipo Cfa: Temperado (Mesotérmico), apresentando constante umidade e tendo quatro ou mais meses com temperaturas médias superiores a 22°C (Setzer, 1966; Fonseca & Rodrigues, 2000), podendo ser delimitadas duas estações com características marcantes: uma chuvosa e quente de setembro a março e outra seca e fria de abril a agosto (Cunha & Martins, 2009; Alves *et al.*, 2012).

A Fazenda Experimental Edgardia (22°49'S; 48°23'W; 577m de altitude) está dentro dos territórios do município e localizada na bacia do rio Capivara. Abrange cerca de 1200 hectares, pertencentes a Universidade Estadual Paulista - UNESP e situa-se entre o Fronte Oriental da Cuesta de Botucatu e a Baixada Serrana, em um gradiente latitudinal que varia de 800 a 500 metros e integra a Área de Proteção Ambiental (APA) Corumbataí, Botucatu e Tejubá (Ortega & Engel, 1992). Possui cinco fragmentos de vegetação natural com distintas tipologias, sendo predominante a floresta estacional semidecidual, além de

possuir áreas com diversos tipos de intervenção antrópica e ambientes de várzea e cerrado (Jorge & Sartori, 2002) (Fig 1).

Segundo Fonseca & Rodrigues (2000), a fazenda abriga nascentes e cursos d'água potencialmente importantes para o abastecimento local da população e está inserida numa área de recarga do Aquífero Guarani. Os corpos d'água da região de Botucatu ainda tem um significativo valor econômico, pois o turismo local atrai grande quantidade de pessoas para recreação nas cachoeiras (Belluta *et al.*, 2010).

Os estuários representam áreas onde a água doce, proveniente da drenagem continental, encontra-se e mistura-se com a água salgada dos mares, constituindo um dos ecossistemas mais produtivos do planeta (Robertson, 1991). Tal ambiente é habitado por diversos animais, desde formas microscópicas até grandes vertebrados, como peixes, aves e mamíferos. Essa fauna tem procedência a partir dos ambientes marinhos, terrestre e água doce, podendo permanecer nos manguezais por toda sua vida como residentes, ou, apenas parte dela, na condição de semi-residentes, visitantes regulares ou oportunistas (Leitão, 1995).

O manguezal representa um dos maiores ecossistemas litorâneos do mundo e uma das áreas de maior fertilidade do planeta, sendo o berço de desenvolvimento e a moradia de muitas espécies animais e vegetais, (Castiglioni, 2006). O manguezal da Praia Dura (Fig. 2), escolhido como localidade de coleta, é formado pela confluência dos rios Comprido e Escuro, formando um ambiente heterogêneo em relação às suas características físicas, com ampla diversidade de microhabitats (Leme, 2002). Segundo Benetti & Negreiros-Fransozo (2003), a vegetação típica é composta principalmente por *Avicennia schaueriana* Stapf e Leechman ex Moldenke, *Rhizophora mangle* L., *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn., *Hibiscus tiliaceus* L., *Acrostichum aureum* L. e *Spartina sp.* Schreb. O manguezal de Ubatumirim é composto pelas plantas vasculares

A. shaueriana, *L. racemosa* e *R. mangle*, e grande número de plantas do gênero *Hibiscus*. O estuário apresenta um teor de matéria orgânica baixo, e seu sedimento arenoso é fino ou muito fino (Castiglioni & Negreiros-Fransozo, 2005; Mortari & Negreiros-Fransozo, 2007).

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sofrido significativas alterações devido a múltiplos impactos ambientais resultantes ou não da influência do homem. O resultado destas alterações é representado pela queda acentuada da biodiversidade aquática, em função da desestruturação do ambiente físico, químico e alterações na dinâmica e estrutura das comunidades biológicas (Goulart & Callisto, 2003). Por esta razão existe um crescente interesse por conhecer e proteger os ecossistemas fluviais e estuarinos e entender sua relação com a fauna e a flora dos ambientes, desenvolvendo critérios físicos, químicos e biológicos que possibilitem diagnosticar o efeito e a magnitude das intervenções humanas (Norris & Hawkins, 2000).

As intensas atividades agrícolas, pastoris e urbanas levam a degradação de grandes extensões de mananciais hídricos. Esta degradação traz consigo não somente prejuízos à qualidade da água, mas também prejudica consideravelmente as comunidades de invertebrados que habitam estes ambientes (Wetzel, 1993). Resíduos gerados por este tipo de atividade podem acarretar alterações na concentração de compostos químicos da água dos quais a fauna é dependente, como por exemplo oxigênio dissolvido, nutrientes (nitrogênio e fósforo), condutividade elétrica e pH (Buzz *et al.*, 2002; Zalidis *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2006; MacGregor & Warren, 2006; Silveira *et al.*, 2006; Niyogi *et al.*, 2007).

A baía de Ubatuba está localizada na cidade de Ubatuba, no litoral norte do estado de São Paulo. A região está posicionada sobre um escudo continental irregular causado pelos esporões terminais da Serra do Mar, território onde as encostas montanhosas

acompanham grande parte do litoral do estado, fazendo com que as praias apresentem diferentes características geológicas e morfológicas, além de possuírem aspectos únicos de cada local (Suguio & Martin, 1978; Ab'Sáber, 2001). A região de Ubatuba é influenciada por três massas de água: Água Central do Atlântico Sul (ACAS), Água Costeira (AC) e Água Tropical (AT). No verão ocorre uma estratificação acentuada das massas de água, onde a ACAS é predominante, enquanto na camada sub-superficial a AC e AT se misturam. No inverno, AC é mais intrusiva nas proximidades da costa enquanto AT é nas regiões mais afastadas (Castro-Filho *et al.* 1987). A ação sazonal dessas massas de água altera a temperatura da água, salinidade e oferta de nutrientes, interferindo na dinâmica e distribuição das comunidades bentônicas (De Léo & Pires-Vanin, 2006). Ubatuba é considerada um “hotspot” de biodiversidade de crustáceos devido a sua riqueza de espécies, o que tem impulsionado o enfoque científico e diversas ações visando o uso sustentável da região (Costa *et al.*, 2003; Mantelatto *et al.*, 2018). Diante do cenário exploratório que ocorreu principalmente na década de 90, algumas medidas foram e estão sendo consideradas para combater a sobrepesca e a superexploração, como a exigência de licenças, controle do tamanho e número de embarcações de pesca e turismo, regulamentação da malha tamanho das redes de pesca, tamanho mínimo para captura de espécies exploradas comercialmente, períodos de defeso de espécies altamente capturadas e, mais recentemente, o uso de mecanismos de fuga para a fauna acompanhante e criação de reservas marinhas (Amaral & Jablonski, 2005; Devaraj, 2010).



Figura 1. Fazenda Experimental Edgardia, Botucatu-SP. Local onde foram coletadas algumas das espécies utilizadas no presente trabalho. Foto: João G.



Figura 2. Praia Dura, Ubatuba-SP, evidenciando o manguezal onde foram coletadas algumas das espécies utilizadas no presente trabalho.

Foto: Isabela R. R. Moraes; João G. Barioto.

As coletas dos animais foram realizadas nas cidades de Botucatu, Iacanga, Piratininga e Ubatuba, abrangendo grande parte dos fragmentos de floresta nativa dos locais bem como as áreas com maior ação antrópica. Para os animais foram considerados dois métodos de captura: um deles envolveu o uso de armadilhas iscadas ou não que foram colocadas aleatoriamente no riacho no final do período da tarde de um dia e inspecionadas na manhã do dia seguinte (coleta passiva); o outro envolveu a utilização de peneiras para capturar os indivíduos associados a vegetação marginal ou escondidos em rochas no leito do riacho, além da busca ativa padronizada para os animais semiterrestres. O emprego destes métodos de captura visa otimizar os resultados no sentido de amostrar espécimes que ocupam diferentes microhábitats e/ou que são mais ativos em períodos distintos do dia (Rocha & Bueno, 2004).

Os indivíduos foram identificados até o nível de espécie com o auxílio de chaves dicotômicas disponíveis na literatura atual. Para a sexagem foram utilizadas duas estratégias: nos camarões foi feita pela observação, sob estereomicroscópio óptico (Zeiss Stemi 2000C), da morfologia do segundo par de pleópodos, evidenciando a presença do apêndice masculino (Valenti, 1998; García-Dávila *et al.*, 2000; Mantelatto & Barbosa, 2005); nos caranguejos foi observado a presença de pleópodos e a morfologia do abdome, sendo triangular nos machos e circular nas fêmeas.

A análise do DNA nuclear foi realizada com o objetivo de investigar se há distanciamento genético para indivíduos de famílias e infraordens distintas em Decapoda por citometria de fluxo. As vantagens da citometria de fluxo são: a relativa facilidade e a rapidez da preparação das amostras, a possibilidade de análise de muitos núcleos, o que permite que praticamente qualquer tecido seja utilizado, e em pequenas quantidades, e a possibilidade de detecção de pequenas diferenças na quantidade de DNA (Schifino-Wittmann, 2001). Os animais coletados foram colocados em caixas térmica e conduzidos

ao laboratório, onde permaneceram aclimatados em aquários até o início das análises. Inicialmente, os indivíduos foram previamente anestesiados por indução hipotérmica. Uma pequena porção do tecido muscular foi extraída cuidadosamente dos quelípodos. A posterior Análise por Citometria de Fluxo (FCA) foi conduzida de acordo com os procedimentos de Xavier *et al* (2017) para *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) (Characiformes: Characidae) com algumas modificações. A análise genética foi realizada no departamento de Microbiologia e Imunologia (IBB, UNESP) utilizando do citômetro de fluxo FACSCantoTMII (BD Biosciences). Os resultados foram analisados no software FlowJo, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.) e expressos em intensidade mediana de fluorescência (MFI).

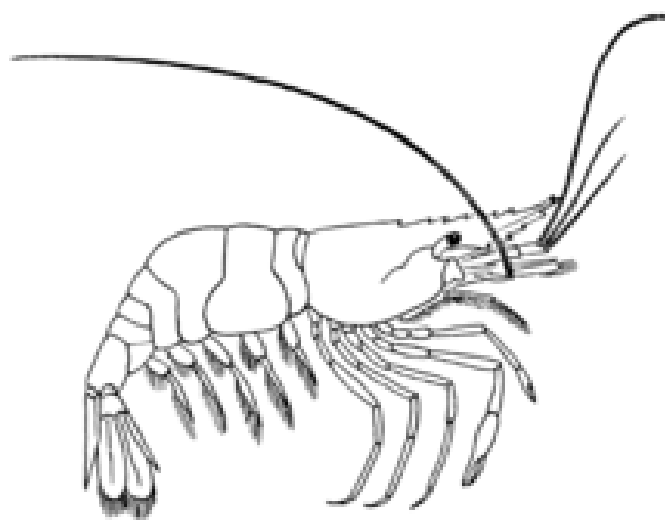
REFERÊNCIAS

- BAUER, R.T. 2004. Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the carideans. Norman, University of Oklahoma Press, 316p.
- BUENO, S.L.S.; RODRIGUES, S.A. 1995. Abbreviated larval development of the freshwater prawn, *Macrobrachium iheringi* (Ortman, 1897) (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. *Crustaceana*, 68 (6): 665-686p.
- DE GRAVE, S.; PENTCHEFF, N.D.; AHYONG, S.T.; CHAN, T.Y.; CRANDALL, K.A.; DWORSCHAK, P.C.; FELDER, D.L.; FELDMANN, R.M.; FRANSEN, C.H.J.M.; GOULDING, L.Y.D.; LEMAITRE, R.; LOW, M.E.Y.; MARTIN, J.W.; NG, P.K.L.; SCHWEITZER, C.E.; TAN, S.H.; TSHUDY, D.; WETZER, R. 2009 A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology* (Supplement) 21, 1-109p.
- FERRARI, J.A.; RAI, K.S. 1989. Phenotypic correlates of genome size variation in *Aedes albopictus*. *Evolution* 43, 895–899p.
- FINSTON, T.L.; HERBERT, P.D.; FOOTIT, R.B. 1995. Genome size variation in aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25:189-196p.
- GARCÍA-DÁVILA, C.R.; ALCÁNTARA, F.B.; VASQUEZ, E.R.; CHUJANDAMAS, M. 2000. Biologia Reprodutiva do camarão *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) em Igarapés de Terra Firme da Amazônia Peruana. *Acta Amazonica*, 30: 653-664p.
- GREGORY, T.R. 2000. Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals. *Genome* 43: 895–901p.
- GREGORY, T.R. 2002. Genome size and developmental complexity. *Genetica* 115, 131-146p.

- GREGORY, T.R. 2005. Genome size evolution in animals. In *The Evolution of the Genome*. Edited by TR Gregory. Elsevier Academic Press, San Diego CA. 87p.
- HESSEN, D.O.; PERSSON, J. 2009. Genome size as a determinant of growth and life-history traits in crustaceans. *Biological Journal of Linnean Society* 98, 393–399p.
- HOLTHUIS, L.B. 1952. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. Subfamily Palaemonidae. *Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation* 12: 1-396p.
- HOLTHUIS, L.B. 1980. *FAO Species Catalogue, Vol. 1. Shrimps and Prawns of the World. An Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries*. FAO Fisheries Synopsis 1(125): 1-261p.
- HULTGREN, K.M.; DUFFY, J.E. 2010. Sponge host characteristics shape the community structure of their shrimp associates. *Marine Ecology Progress Series* 407, 1-12p.
- LIBERTINI, A.; TRISOLINI, R.; RAMPIN, M. 2008. Chromosome number, karyotype morphology, heterochromatin distribution and nuclear DNA content of some talitroidean amphipods (Crustacea: Gammaridea). *European Journal of Entomology* 105, 53-58p.
- MACEY, M.G. 2010. Principles of flow cytometry. *Flow cytometry: principles and applications* In: Macey MG, ed. Totowa (NJ): Humana Press, 1–15p.
- McLaren IA, Seigney JM, Corkett CJ (1988) Body sizes, development rates, and genome sizes among *Calanus* species. *Hydrobiologia* 167–168:275–284p.
- MORAES, I.R.R.; PARDO, L.M.; ARAYA-JAIME, C.; WOLF, M.R.; YASUI, G.S.; SOLANO-IGUARAN, J.J.; ROMAGNOLI, G.G.; ALEVI, K.C.C.; CASTILHO, A.L. 2022. Patterns of genome size variation in caridean shrimps: new estimates for non-gambarelloides *Synalpheus* species. *Genome* 65(8): 459-468p.

- ORTEGA, V.R.; ENGEL, V.L. 1992. Conservação da biodiversidade de remanescentes de Mata Atlântica na região de Botucatu, SP. Revista do Instituto Florestal, 4: 834-852p.
- PILLEGGI, L.A.G. 2009. Sistemática filogenética dos camarões do gênero *Macrobrachium* - Análises morfológicas e moleculares. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. 236p
- PILEGGI, Leonardo G.; MANTELATTO, Fernando L. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. Invertebrate Systematics, v. 24, n. 2, p. 194-208, 2010.
- REES, D.J.; BELZILE, C.; GLÉMET, H.; DUFRESNE, F. 2008. Large genomes among caridean shrimp. Genome 51, 159-163p.
- REES, D.J.; DUFRESNE, F.; GLÉMET, H.; BELZILE, C. 2007. Amphipod genome sizes: First estimates for Arctic species reveal genomic giants. Genome 50, 151–158p.
- ROCHA, S.S.; BUENO, S.L.S. 2004. Crustáceos decápodes de água doce com ocorrência no Vale do Ribeira de Iguape e rios costeiros adjacentes, São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, 21(4): 1001-1010p.
- SWIFT, H. 1950. The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. Physiological Zoology 23: 169–198p.
- VALENTI, W.C. 1998. Carcinicultura de água doce: tecnologia para a produção de camarões. IBAMA/FAPESP, 383p.
- XAVIER, P.L.P.; SENHORINI, J.A.; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SHIMODA, E.; SILVA, L.A.; SANTOS, S.A.; YASUI, G.S. 2017. A flow cytometry protocol to estimate DNA content in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. Frontiers in Genetics. 8, 1–8p.

ΕΠΙΛΟΓΟ



A variação no tamanho do genoma entre as espécies, em resposta ao ambiente, revela uma significativa descoberta quando se analisam os crustáceos pertencentes à ordem Decapoda. É provável que essa variável seja um dos importantes fatores que conduzem a evolução do tamanho do genoma das espécies, uma vez que também apresenta uma relação com o tipo de desenvolvimento destes animais. Porém, a ordem ainda é muito pouco estudada em comparação aos outros grupos de animais, o que nos remete a possíveis novas pesquisas levando em consideração esse tipo de abordagem também especificamente entre os gêneros.

O primeiro registro para um caranguejo de água doce brasileiro, assim como para a superfamília Potamoidea, representa um avanço crucial neste cenário, onde informações como o tamanho do genoma em relação ao nível de diversificação desse grupo de animais ainda são escassas.

Os primeiros registros referentes às espécies de camarões de águas continentais brasileiras representam um marco significativo dentro de um contexto ao qual detalhes como a relação entre o tamanho do genoma em comparação ao nível de diversidade desse conjunto de organismos ainda é insignificante. Os camarões do gênero *Macrobrachium* constituem ainda importantes componentes dos ecossistemas de água doce e estuarinos, e muitas espécies despertam grande interesse comercial devido ao seu tamanho, e são bastante utilizadas para o consumo humano.

Portanto, conceitos e ferramentas sobre ciências básicas como listas de espécies, biologia populacional, fecundidade e todas as informações sobre as espécies na literatura são agora tão importantes nesses estudos mais aplicáveis a perspectivas evolutivas. O resultado referente ao aumento do tamanho do genoma associado aos padrões de desenvolvimento levanta o ponto de que as estratégias que tais animais adotam para a

reprodução parece desempenhar um papel determinante na modelação das características genéticas.

Apresentamos um método inovador recentemente aplicado para uma análise mais abrangente do genoma dos animais, explorando perspectivas adicionais como o peso molecular do DNA em contrapartida às análises tradicionais da genética clássica. A evolução do tamanho do genoma dentro de dois dos maiores grupos de crustáceos decápodes ainda tende a ser paradoxal.

Os próximos passos para um entendimento evolutivo mais completo dentro da ordem é a descrição de cada vez mais “c-values” em conjunto com a evolução do conhecimento das ciências básicas, comportamental e biológica, de forma que tais resultados poderão corroborar cada vez mais com as hipóteses que aqui foram discutidas.