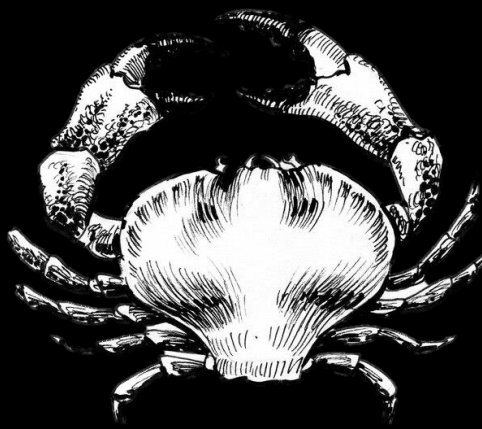


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS DE BOTUCATU
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

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

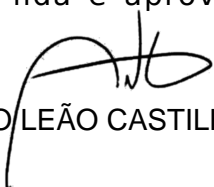
1. Água doce. 2. Tamanho do genoma. 3. Citometria de fluxo.
4. Decapoda (Crustacea).

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. Aprendi 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 cafés, 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 Romagnoli 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>	27
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>	44
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>	66
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.

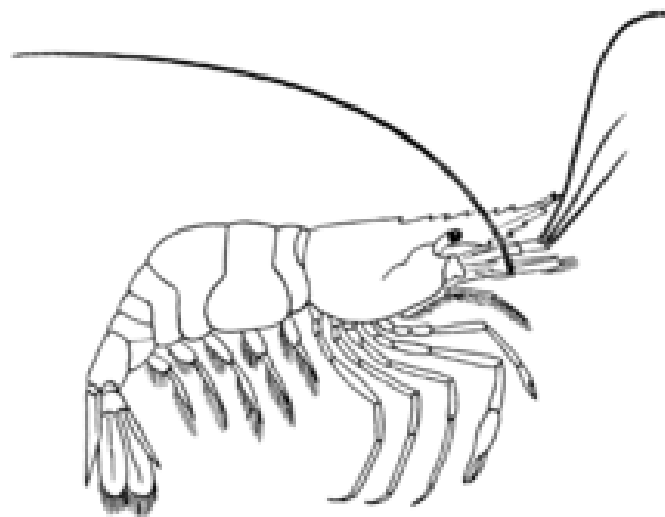
Palavras-chave: Água doce; citometria de fluxo; c-value; Decapoda.

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; Ahyong *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 decápodos 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 morfologicamente 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). Conseqüentemente, 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 (Suguió & 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).

OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto tem como objetivo principal elucidar de forma pioneira questões acerca do tamanho do genoma das espécies de crustáceos decápodes nas diversas localidades de coleta, uma vez que são organismos de grande importância em termos de equilíbrio ecológico à comunidade a qual pertencem. Os resultados obtidos contribuirão para conhecer o status ecológico e evolutivo em diferentes grupos, sob a perspectiva do tamanho do genoma.

Sendo assim, os objetivos específicos são:

a) Fornecer novos dados sobre o tamanho do genoma das espécies de caranguejo e camarão situadas nos mais diversos ambientes e com as mais diversas histórias de vida e características dentro dos territórios brasileiros;

- b) Analisar o padrão do tamanho do genoma dentro do gênero *Macrobrachium* (infraordem Caridea), utilizando como modelo animais coletados nas localidades e a base de dados da literatura;
- c) Analisar o padrão do tamanho do genoma dentro da infraordem Brachyura, comparando aos diferentes ambientes das espécies coletadas (água doce, manguezal e marinho) e traçando uma perspectiva evolutiva.

HIPÓTESES

As hipóteses nulas (H₀) a serem testadas na tese serão:

- a) O tamanho do genoma dentro de um mesmo táxon varia significativamente de acordo com o habitat em que a espécie está inserida (sendo considerado aqui o ambiente marinho, de água doce e estuarino/terrestre), sendo maior nas espécies de água doce;
- b) O tamanho do genoma varia significativamente de espécie para espécie dentro de um mesmo gênero, considerando diferentes tipos de desenvolvimento ontogenético, sendo maior quanto mais abreviada forem as fases larvais;
- c) Por apresentarem histórias evolutivas particulares, o tamanho do genoma se correlaciona com o tamanho do corpo quando comparado em diferentes espécies e infraordens.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, N.A. 2001. Litoral do Brasil – Brazilian Coast. Metalivros, São Paulo, 286p.
- AHYONG, S.T.; LAI, J.C.Y.; SHARKEY, D.; COLGAN, D.J.; NG, P.K.L. 2007. Phylogenetics of the brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda): the status of Podotremata based on small subunit nuclear ribosomal RNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45, 576-586p.

- ALCIVAR-WARREN, A.; SONG, L.; MEEHAN-MEOLA, D.; XU, Z.; XIANG, J-H.; WARREN, W. 2007. Characterization and mapping of expressed sequence tags isolated from a subtracted cDNA library of *Litopenaeus vannamei* injected with white spot syndrome virus. *Journal of Shellfish Research* 26, 1247-1258p.
- ALVES, T.R.; FONSECA, R.C.B; ENGEL, V.L. 2012. Mamíferos de médio e grande porte e sua relação com o mosaico de habitats na cuesta de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Iheringia*, 102(2): 150-158p.
- AMARAL, A.C.Z.; JABLONSKI, S. 2005. Conservation of marine and coastal biodiversity in Brazil. *Conservation Biology*, 19(3), 625–631p.
- BELLUTA, I.; ALMEIDA, A.A.; COELHO, I.C.; NASCIMENTO, A.B.; SILVA, A.M.M. 2010. Avaliação temporal e espacial no córrego do Cintra (Botucatu – SP) frente aos defensivos agrícolas e parâmetros físico-químicos de qualidade da água – Um estudo de caso. *Energia na Agricultura*, 25: 54-73p.
- BENETTI, A.S. & NEGREIROS-FRANSOZO, M.L. 2003. Madurez sexual morfológica del cangrejo *Uca burgersi* Holthuis, 1967 (Brachyura, Ocypodidae) de una área de manglar subtropical de Brasil. *Universidad y Ciencia*, 19(37), 9–16p.
- BONNIVARD, E.; CATRICE, O.; RAVAUX, J.; BROWN, SC.; HIGUET, D. 2009. Survey of genome size in 28 hydrothermal vent species covering 10 families. *Genome* 52, 524-536p.
- BROLY, P.; DEVILLE, P.; MAILLET, S. 2013. The origin of terrestrial isopods (Crustacea: Isopoda: Oniscidea) *Evolutional Ecology* 27, 461-476p.
- BUSS, D.F.; BAPTISTA, D.F.; SILVEIRA, M.P.; NESSIMIAN, J.L. DORVILLÉ, L.F.M. 2002. Influence of water chemistry and environmental degradation on macroinvertebrate assemblages in a river basin in south-east Brazil. *Hydrobiologia* 481: 125-136p.

- CASTIGLIONI, D.S.; NEGREIROS-FRANZOZO, M.L. 2004. Comparative analysis of the relative growth of *Uca rapax* (Smith, 1870) (Crustacea Ocypodidae) from two mangroves in São Paulo Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21(1): 137–144p.
- CASTRO-FILHO, B.M., MIRANDA, L.B.; MYAO, S.Y. 1987. Condições hidrográficas na plataforma continental ao largo de Ubatuba: variações sazonais e em média escala. *Boletim do Instituto de Oceanografia*, 35: 135-151p.
- CAVALIER-SMITH, T. 1978. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *Journal of Cell Science*. 34(1): 247–278p.
- COSTA, R.C.; FRANZOZO, A.; MELO, G.A.S.; FREIRE, F.A.M. 2003. An illustrated key for Dendrobranchiata shrimps from the northern coast of São Paulo state, Brazil. *Biota Neotropica* 3(1):1–12p.
- CUNHA, A.R.; MARTINS, D. 2009. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. *Irriga* 14(1): 1-11p.
- DAHMS, H.U. 2000. Phylogenetic implications of the crustacean nauplius. *Hydrobiologia* 417, 91-99p.
- DAWKINS, R. 1976. *The selfish gene*. Oxford: Oxford University Press. 540p.
- 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.
- DEVARAJ, M. 2010. Fishery biology research: Glimpses on practices and application for genetic resource conservation. *Indian Journal of Animal Sciences*, 80(4), 78–84p.

- FONSECA, R.C.B.; RODRIGUES, R.R. 2000. Análise estrutural e aspectos do mosaico sucessional de uma floresta semidecídua em Botucatu-SP. *Scientia Forestalis*, 57: 27-43p.
- GARCÍA-DÁVILA, C.R.; ALCÁNTARA, F.B.; VASQUEZ, E.R.; CHUJANDAMAS, M. 2000. Biología 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.
- GREGORY, T.R., HEBERT, P.D., AND KOLASA, J. 2000. Evolutionary implications of the relationship between genome size and body size in flatworms and copepods. *Heredity*, 84: 201–208p.
- GOULART, M.; CALLISTO, M. 2003. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *FAPAM*. 2:153–164p.
- GREILHUBER, J.; DOLEŽEL, J.; LYSÁK, M.A.; BENNETT, M.D. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘genome size’ and ‘C-value’ to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* 95, 255-260p.
- HANCOCK, Z.B.; HARDIN, F.O.; MURTHY, A.; HILLHOUSE, A.; JOHNSTON, J. S. 2021. Rapid genomic expansion and purging associated with habitat transitions in a clade of beach crustaceans (Amphipoda: Haustoriidae). *Journal of Crustacean Biology* 41:42. doi: 10.1093/jcbiol/ruab042.

- HARDIE, D.C.; AND HEBERT, P.D.N. 2004. Genome-size evolution in fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 61, 1636–1646. doi: 10.1139/f04-106p.
- HESSEN, D.O.; PERSSON, J. 2009. Genome size as a determinant of growth and life-history traits in crustaceans. *Biological Journal of the Linnean Society* 98, 393–399p.
- 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.
- JEFFERY, N.W. 2015. *Genome Size Diversity and Evolution in the Crustacea*. Thesis PhD. The Faculty of Graduate Studies of The University of Guelph. 274p.
- JEFFERY, N.W.; HULTGREN, K.; CHAK, S.T.C.; GREGORY, T.R.; RUBENSTEIN, D.R. 2016. Patterns of genome size variation in snapping shrimp. *Genome* 59: 393–402p.
- JEFFERY, N.W.; ELLIS, E.A.; OAKLEY, T.H.; GREGORY, T.R. 2017. The genome sizes of ostracod crustaceans correlate with body size and evolutionary history, but not environment. *Journal of Heredity* 108, 701–706p.
- JORGE, L.A.B.; SARTORI, M.S. 2002. Uso do solo e análise temporal da ocorrência de vegetação natural na Fazenda Experimental Edgárdia, em Botucatu-SP. *Revista Árvore* 26(5): 582-592p.
- LAVERY, S.; MORITZ, C.; FIELDER, D.R. 1996. Indo-Pacific population structure and evolutionary history of the coconut crab *Birgus latro*. *Molecular Ecology* 5, 557-570p.
- LEITÃO, S.N. 1995. A fauna do manguezal. In: Schaeffer-Novelli, Y. Manguezal, Ecossistema entre a terra e o mar. *Caribbean Ecological Research*. 64p.
- LEME, M.H.A. 2002. A comparative analysis of the population biology of the mangrove crabs *Aratus pisonii* and *Sesarma rectum* (Brachyura, Grapsidae) from the north coast of São Paulo State, Brazil. *Journal of Crustacean Biology* 22(3): 553-557p.

- MACGREGOR, C.J.; WARREN, C.R. 2006. Adopting sustainable farm management practices within a Nitrate Vulnerable Zone in Scotland: the view from the farm. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113: 108-119p.
- MANTELATTO, F.L.M.; BARBOSA, L.R. 2005. Population structure and relative growth of freshwater prawn *Macrobrachium brasiliense* (Decapoda, Palaemonidae) from São Paulo State, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 17: 245-255p.
- MANTELATTO, F.L.; TEROSSI, M.; NEGRI, M.; BURANELLI, R.C.; ROBLES, R.; MAGALHÃES, T.; TAMBURUS, A.F.; ROSSI, N.; MIYAZAKI, M.J. 2018. DNA sequence database as a tool to identify decapod crustaceans on the São Paulo coastline. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 29(5), 805–815p.
- MARTIN, J.W.; DAVIS, G.E. 2001 An updated classification of the recent Crustacea. Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series 39.
- MARTIN, J.W.; DAVIS, G.E. 2006 Historical trends in crustacean systematics. *Crustaceana* 79, 1347-1368p.
- MORTARI, R.C.; PRALON, B.G.N.; NEGREIROS-FRANSOZO, M.L. 2010. Reproductive biology of *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871) (Crustacea, Decapoda, Caridea) from two estuaries in southeastern Brazil. *Invertebrate Reproduction and Development* 53(4): 223-232p.
- NIYOGI, D.K.; KOREN, M.; ARBUCKLE, C.J.; TOWNSEND, C.R. 2007. Stream community along a catchment land-use gradient: subsidy-stress responses to pastoral development. *Environmental Management* 39: 213-225p.
- NORRIS, R.H.; HAWKINS, C.P. 2000. Monitoring river health. *Hydrobiologia*, 435: 5-17p.
- ORGEL, L.E.; CRICK, F.H.C. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604–607p.

- 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.
- PARCHEM, R.J.; POULIN, F.; STUART, A.B.; AMEMIYA, C.T.; PATEL, N.H. 2010. BAC library for the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. *Genomics* 95, 261-267p.
- PORTER, M.L.; PÉREZ-LOSADA, M.; CRANDALL, K.A. 2005. Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37(2): 355-369p.
- 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.
- RITCHIE, H.; JAMIESON, A. J.; PIERTNEY, S.B. 2017. Genome size variation in deep-sea amphipods. *Royal Society Open Science* 4:170862. doi: 10.1098/rsos.170862.
- ROBERTSON, A.I. 1991. Plant-animal interactions and the structure and function of mangrove forest ecosystems. *Australian Journal of Ecology* 16: 433-443p.
- 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.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. 2001. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. *Ciência Rural*, 31: 897-902p.
- SWIFT, H. 1950. The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. *Physiological Zoology* 23: 169–198p.
- SETZER, J. 1966. Atlas Climático e Ecológico do Estado de São Paulo. Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai, 61p.

- SUGUIO, K.; MARTIN, L. 1978. Quaternary marine formations of the state of São Paulo and southern Rio de Janeiro. In: International Symposium on Coastal Evolution in the Quaternary. São Paulo, IGCP/SBG. 55p.
- THOMAS, C.A. 1971 The genetic organization of chromosomes. *Annual Review of Genetics* 5, 237–256p.
- UIEDA, V.S.; MOTTA, R.L. 2004. Peixes dos riachos da cuesta de Botucatu. Flora e fauna: um dossiê ambiental. Ed. Unesp. São Paulo, 238p.
- VALENTI, W.C. 1998. Carcinicultura de água doce: tecnologia para a produção de camarões. IBAMA/FAPESP, 383p.
- WELCH, S.M.; EVERSOLE, A.G. 2006. The occurrence of primary burrowing crayfish in terrestrial habitat. *Biological Conservation* 130, 458-464p.
- WHITE, M. M.; MCLAREN, I. A. 2000. Copepod development rates in relation to genome size and 18S rDNA copy number. *Genome* 43, 750–755p.
- Wilkerson MJ. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 42, 53–71p.
- WYNGAARD, G.A.; RASCH, E.M.; MANNING, N.M.; GASSER, K.; DOMANGUE, R. 2005. The relationship between genome size, development rate, and body size in copepods. *Hydrobiologia* 532, 123–137p.
- ZENG, V.; VILLANUEVA, K.E.; EWEN-CAMPEN, B.S.; ALWES, F.; BROWNE, W.E.; EXTAVOUR, C.G. 2011. De novo assembly and characterization of a maternal and developmental transcriptome for the emerging model crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *BMC Genomics* 12, 581p.

*Cap. 1 - A first report of the Genome Size for
the freshwater brachyuran family
Trichodactylidae (Malacostraca: Decapoda)*

Abstract

Among genetic studies, the evaluation of genome size has emerged as a resource for populational, biogeographic, and evolutionary interpretations once it evaluates the information contained in chromosomes from a quantitative perspective, measuring the weight of nuclear DNA in picograms (PG). Therefore, this work aimed to provide new data on the genome size of freshwater crabs *Trichodactylus fluviatilis* and *Trichodactylus petropolitanus* in the Botucatu region, São Paulo state, Brazil. The specimens were sampled using both baited traps and active searches and then were transported alive to describe the genome size using Flow Cytometry techniques. A small portion of the muscle tissue was used for all analyses. A total of 12 individuals were analyzed, showing a c-value ranging from 8.0 to 9.6 pg. Those results represent the first record for the family Trichodactylidae in the literature and indicate a higher value when compared to species already analyzed to Brachyura infraorder, especially in the freshwater environment (average = 6.65 pg). About population patterns and the life history of species with genome size as a modulating factor, there seems to be a tendency for a higher c-value in species that have "K strategists", i.e., direct embryonic development traits, as is the case with *T. fluviatilis* and *T. petropolitanus*. However, little has been recorded in the literature about the size of the genome of Decapoda crustaceans, especially those that inhabit freshwater environments, which further highlights the importance of works like the present.

Keywords: C-value, DNA weight, flow cytometry, conservation.

INTRODUCTION

The analysis of genome size (GS) or nuclear DNA weight is widely used in various groups of animals and plants to quantify the information contained in genes and chromosomes in eukaryotic organisms. It is measured in picograms (pg) of DNA per haploid nuclei, and it is expressed as the constant determination of “c-value” (Gregory, 2005). The understanding of the evolutionary patterns and modulations of GS is still in progress, and future studies aim to answer and interpret these values by correlating them with the basic biology, life history, and evolutive patterns of animals (Jeffery *et al.*, 2017; Hultgren *et al.*, 2018). In order to promote conclusive analyses and estimates between the correlation of the GS and the life history of animals, it is essential to require the availability of solid data in the literature. Despite the efforts undertaken to describe the genome size in decapod crustaceans, there is still a significant discrepancy both in the comparison of taxonomically valid species and in the number of species that have had their genome size described (Rees *et al.*, 2008; Jeffery, 2015).

Freshwater crabs are an essential component of continental aquatic biota and have a significant influence on the balance of ecosystems, acting as processors of organic matter, predators of small invertebrates and fish, as well as being preyed upon by fish, turtles, mammals, and birds (Bond-Buckup & Buckup, 1994; Magalhães, 2003; Magalhães *et al.*, 2016). These organisms belong to the Potamoidea superfamily and are distributed throughout the tropical and subtropical regions of Central and South America, Africa, Madagascar, India, Asia, Australia, and southern Europe. In the Americas, these crustaceans are represented by the families Pseudothelphusidae Ortmann, 1893 and

Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853, both of which occur in Brazilian waters (Magalhães, 2003).

Trichodactylus fluviatilis Latreille, 1828 is a Neotropical crab endemic to Brazil, occurring from the Pernambuco to the Rio Grande do Sul state. Despite this endemic status, the large geographic extension of the Brazilian territory implies a wide distribution of the species around the country's continental waters, and its occurrence in different basins draws attention to the possible formation of a taxonomic species complex. This fact was confirmed by Souza-Carvalho et al. (2017). Similarly, the freshwater crab *Trichodactylus petropolitanus* (Goeldi, 1886) presents a more restricted endemic distribution to a southern Brazilian region, occurring in the Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, and Santa Catarina states. Its distribution is linked mainly to the domain of the almost extinct Atlantic Rainforest (Magalhães, 2003).

Due to the evaluation of the GS, especially for crustaceans like in the present study, the Flow cytometry allows us to measure the optical and fluorescence characteristics of a single cell or any other particle, such as microorganisms, nuclei, and chromosome preparations (Macey, 2010). In this method, measurements are made while the particles pass one by one through a point of light at high speed (10^2 - 10^3 particles/sec). The relative fluorescence intensity of the isolated nuclei observed is then evaluated, expressing the "weight" or "mass" of the information contained in each stimulated nucleus (Xavier *et al.*, 2017).

There is no register in the literature about the genome size of Brazilian freshwater crabs, which makes this kind of evaluation and relation about the GS, endemic status, reproductive patterns, and comparisons about this group with other crustaceans more critical. There exists an online platform used to explore all the work and genome size records done on plants and animals, available at Gregory's (2023) online database, and

this represents a handy way of accessing information and using all the data to compare with the proposed new information. There are still no records available for the Brazilian continental water crabs mentioned, which will help improve the quantitative DNA knowledge of this essential group.

Therefore, we aimed to estimate the nuclear DNA content of two species of the *Trichodactylus* genus, evaluating the c-value according to the physical and chemical characteristics of the cells using Flow Cytometry methods. The result stimulates new research and future discussions using this data type.

MATERIAL AND METHODS

Biological sampling

Samples were conducted in the Edgardia Experimental Farm (22°49'S; 48°23'W; 577m altitud), which is located between the Eastern Frontier of the Cuesta de Botucatu and the Baixada Serrana, São Paulo state, southeast of Brazilian territory, and is part of the Corumbataí, Botucatu and Tejubá Environmental Protection Area (APA) (Ortega & Engel, 1992).

The animals were collected from most native forest fragments and the areas with the most significant anthropogenic activity. Two methods of capture were considered: baited traps to be placed randomly in the stream in the late afternoon of one day and inspected the next morning (passive sample) and active capture of individuals associated with marginal vegetation or hidden in rocks in the stream bed. Combined capture methods aim to optimize the results by sampling specimens that occupy different microhabitats and are more active at different times of the day (Rocha & Bueno, 2004). The individuals were taxonomically identified using keys available in current literature (Melo, 2003). For the sexing of the crabs, the presence or absence of pleopods and the morphology of the

abdomen were observed, being triangular in males and circular in females. Carapace width (CW) measurements were taken considering the opposite widest point of the lateral margin of the carapace using a 0.01 mm precision caliper. The animals were transported to the laboratory and kept alive until further analysis began.

Flow cytometry

The collected animals were placed in thermal boxes and taken to the laboratory, where they remained acclimatized in aquariums for analysis preparation. The individuals were first anesthetized by hypothermic induction, and then a tiny portion of the muscle tissue was carefully extracted from the first major chelipeds. Subsequent Flow Cytometry Analysis (FCA) was conducted according to the procedures of Xavier et al. (2017) for *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) (Characiformes: Characidae) with adaptations.

First, the tissue was treated with 120 μ L of lysis solution (9.53 mmol/L MgCl₂-7H₂O, 47.67 mmol/L KCl, 15 mmol/L Tris, 74 mmol/L sucrose, 0.6% Triton X-100 and pH 8.0) and 1.5 μ L of RNase to expose the cell nucleus and DNA. After adding RNase, the samples were vortexed for 10 seconds and incubated at 37 °C in a water bath for 15 minutes. Finally, the material was filtered through a 30 μ m mesh filter (Celltrics, Partec, Munster, Germany). The nuclei suspensions were stained with 1 mg/mL propidium iodide (PI), binding to double-stranded DNA. Cell cycle analysis of at least 20,000 nuclei for each sample was performed by flow cytometry analysis using a FACSCanto II flow cytometer with FACSDiva software. Data analysis and histogram construction were performed using FlowJo software, version vX.10.6 (Tree Stars Inc.) and expressed as median fluorescence intensity.

Figure 1 shows the representative fluorescence plot outlining the gating strategy for the analysis. Gates were used to generate an SSC (Side Scatter Parameter) vs. PE-A

(Propidium Iodide) plot and the DNA evaluation (in the same way proposed by Moraes *et al.*, 2022). The first fluorescence intensity gate was made for the standard species and the second for the analyzed species. If possible, a third gate was made for the g2 phase cells in cell division.

In order to estimate the DNA content, all the analyses were carried out using a sperm sample from *A. lacustris* since the species has a DNA content of 1.47 pg (Carvalho *et al.*, 2002). The sperm samples (~2 μ L) were processed in the same way described above for the muscle tissue of the crabs. After staining, the sperm sample was added to each crab sample (~10 μ L per sample). The coefficient of variance was controlled and kept below 3% to generate accurate analyses.

In order to estimate the DNA content, all the analyses were carried out using a sperm sample from *A. lacustris* since the species has a DNA content of 1.47 pg (Carvalho *et al.*, 2002). The sperm samples (~2 μ L) were processed in the same way described above for the muscle tissue of the crabs. After staining, the sperm sample was added to each crab sample (~10 μ L per sample). The coefficient of variance was controlled and kept below 3% to generate accurate analyses.

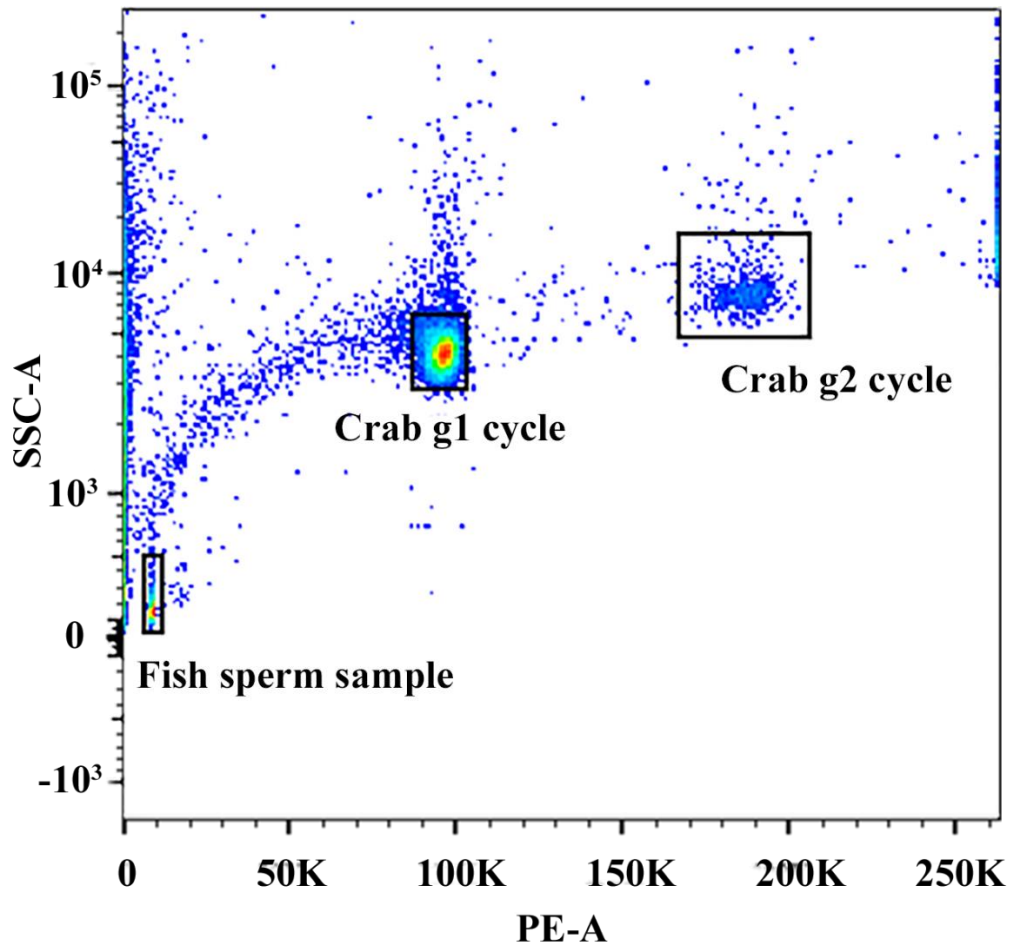


Figure 1. The Flow Cytometry analysis example with a gating strategy represents the standard and analyzed species. Side scatter parameter (SSC-A: parameter that measures the amount of laser beam that hits the particles inside the cell) vs Propidium iodide (PE-A).

RESULTS

A total of 11 individuals of *T. fluviatilis* were analyzed: 6 males and five females, and one female specimen of *T. petropolitanus*. The carapace width (CW) ranged from 22.0 mm to 25.2 mm, and the c-value ranged from 8.0 to 9.2 pg (average of 8.5 ± 0.4 pg) in *T. fluviatilis*. The CW was 24 mm, and the c-value was 9.69 pg for *T. petropolitanus*. The vertical histogram shows the position of the genome size of the species analyzed on a logarithmic scale together with the standard species (Figure 2). The curve in red represents the reference values of the sperm cells from *A. lacustris*, in green the fluorescence of the DNA content from *T. fluviatilis*, and in blue the fluorescence of the DNA content from *T. petropolitanus*. The distance on the histogram scale represents the difference between the c-values found for the standard and the species analyzed (Figure 2). All estimates for genome size were based on analyses of more than 1.5k nuclei per sample.

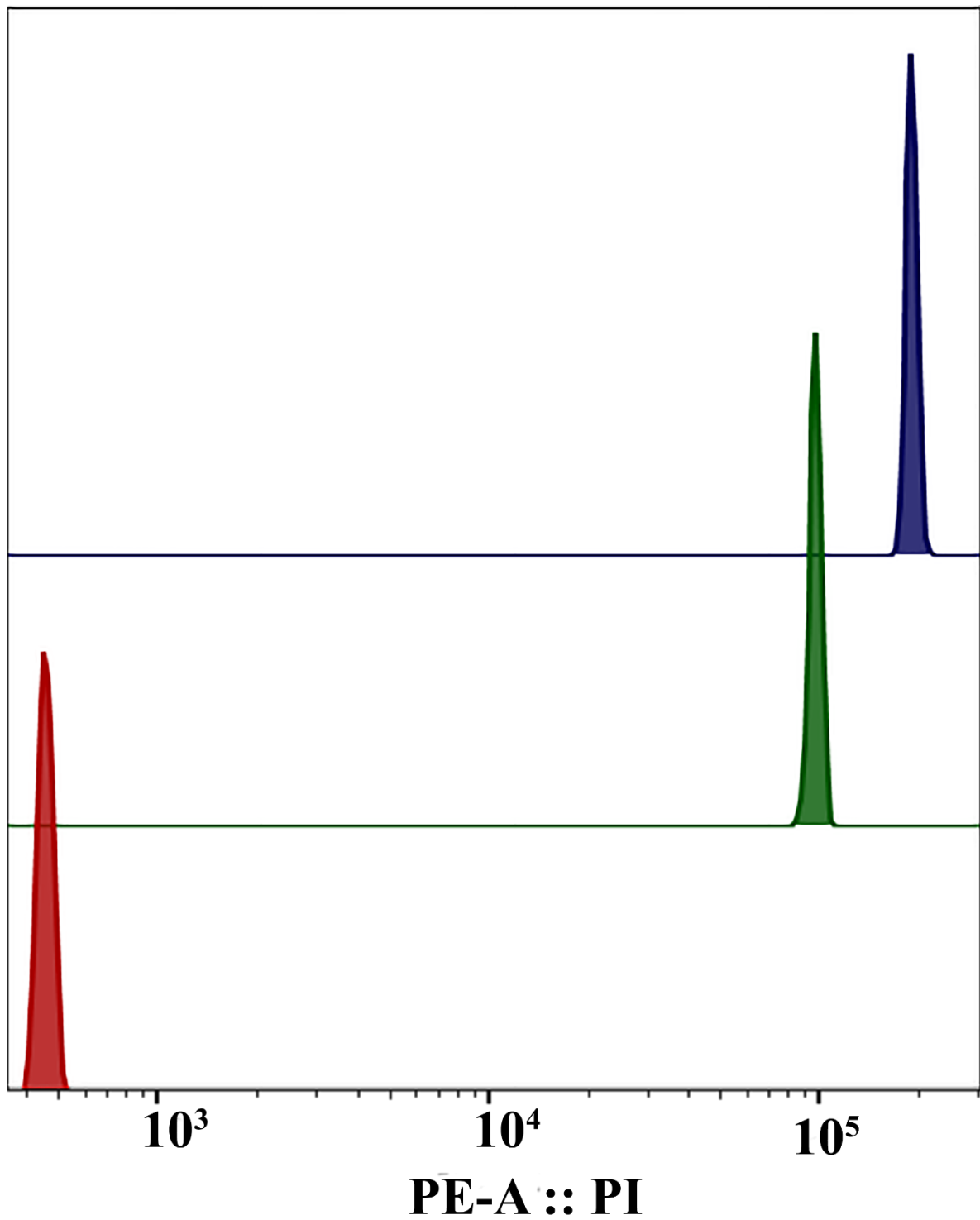


Figure 2. A vertical histogram providing the propidium iodide fluorescence intensity values found for the species analyzed and the standard species *Astyanax lacustris* (in red). *Trichodactylus fluviatilis* is shown in green and *T. petropolitanus* in blue.

DISCUSSION

In this study, new information about the Decapoda genome size is presented. In addition to the traditional descriptive analyses of classical genetics, quantitative perspectives are explored, such as the molecular weight of DNA. The first record for a Brazilian freshwater crab and the Trichodactylidae family represents a significant advance in this scenario in which information such as genome size compared with the level of diversification of such a group of animals is still missing in the literature. These brachyuran crabs play a crucial role in inland aquatic ecosystems, performing vital functions as processors of organic matter, as predators of small invertebrates and fish, as well as serving as a food source for various species of fish, birds, and mammals (Magalhães, 2003; Cumberlidge *et al.*, 2009). In addition, these animals are economically important to humans, being used as food and bait for recreational fishing. However, it is also recognized that they can be vectors of some diseases, acting as hosts or transmitters of parasites that cause paragonimiasis and onchocerciasis (Magalhães *et al.*, 2003; Yeo *et al.*, 2008).

The average genome size of 8.6 pg (analyzing both species together) is much higher than that of other crabs from the infraorder Brachyura that have already been described (Gregory, 2023). Figure 3 contains information on the seven superfamilies within Brachyura, with the most described species. This high value of the Potamoidea superfamily will be available for future comparisons and evolutionary interpretations since all these described species inhabit marine, estuarine, or semi-terrestrial environments. The record for crabs from Brazilian continental waters has been inexistent until now. Therefore, it is essential to provide updated data on animals in different environments that show different lifestyles' evolutionary patterns to enable more informed evolutionary inferences and discussions.

Looking into the habitat condition, some authors have pointed to it as one of the

main factors driving genome size evolution in many species (Grime & Mowforth, 1982; Dufresne & Jeffery, 2011; Herben *et al.*, 2012). Our results seem to validate this kind of theory. The mode of development of many crustacean species is related to the occupation of such habitats, and this variation has led to an evolutionary trend of direct development. In contrast, direct and abbreviated development is rare in marine species (Vogt, 2013). It is, therefore, correct to propose that species with direct or abbreviated development have larger genome sizes than species with indirect development or more larval stages (Hultgren *et al.*, 2018; 2021).

It is reasonable to assume that more complex organisms and those derived from several species may exhibit larger genome sizes due to the greater number of cells and the complexity of the information related to the organization of these animals. However, the weight of nuclear DNA shows no direct correlation with either cell complexity or the quantity and organization of transcribed genetic material. This lack of correlation between DNA content and organismal complexity was documented as the "C-value paradox" by Thomas (1971). However, contemporary understanding of the genome's structure and function has refuted the genome's conception as mere linear collections of genes, invalidating the interpretation of variation in genome size as something "paradoxical" (although several aspects remain perplexing). As a result, the term "c-value enigma" has emerged and is understood to be more appropriate (Gregory, 2001).

Because of this difficulty in analyzing the relationship between genome size and the life history of animals, it is essential to record as much information as possible about the nuclear DNA content of species with different types of distribution and particular behavior, as in our results, which pioneered the evaluation of a species of widely distributed tropical Brazilian freshwater crabs. The following steps in subsequent research will rely on the information obtained from results outlined in studies such as the

one described here, which address the importance of nuclear DNA weight. This information will establish a valuable link within the fundamental biological information, covering various approaches, which will contribute significantly to understanding the evolution of various species at different taxonomic levels.

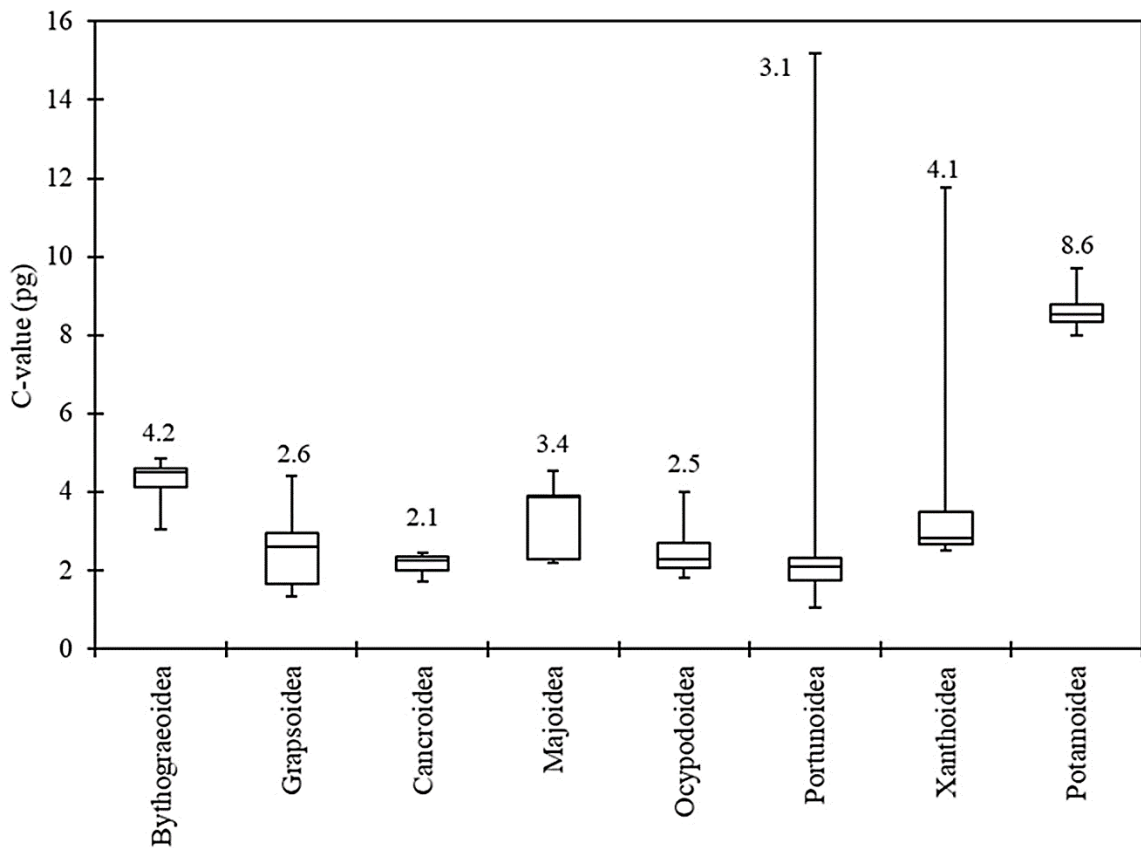


Figure 3. Box plot comparing the genome size of the seven Brachyura Superfamilies with the most described species in the Decapoda order with the new records for the Potamoidea Superfamily.

REFERENCES

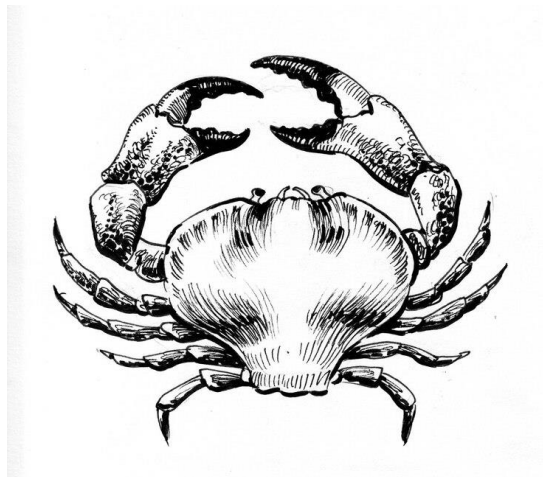
- BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L. 1994. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Arquivos de Zoologia*, **32**(4):159-346.
- CARVALHO, M. L., OLIVEIRA, C., NAVARRETE, M. C., FROEHLICH, O., & FORESTI, F. 2002. Nuclear DNA content determination in Characiformes fish (Teleostei, Ostariophysi) from the Neotropical region. *Genetics and Molecular Biology*, **25**(1), 49–55. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000100010>.
- CUMBERLIDGE, N., NG, P. K. L., YEO, D. C. J., MAGALHÃES, C., CAMPOS, M. R., & ALVAREZ, F. 2009. Freshwater crabs and the biodiversity crisis: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Conservation*, **142**, 1665–1673. doi:10.1016/j.biocon. 2009.02.038.
- DUFRESNE, F., & JEFFERY, N. 2011. A guided tour of large genome size in animals: What we know and where we are heading. *Chromosome Research*, **19**, 925– 938. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9248-x>.
- GREGORY, T. R. 2001 Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews*, **76**, 65-101.
- 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.
- GREGORY, T. R. 2023. Animal genome size database. <http://www.genomesize.com>
- GRIME, J. P.; MOWFORTH M. A. 1982. Variation in genome size – an ecological interpretation. *Nature* **299**: 151–153.
- HERBEN, T., SUDA, J., KLIMEŠOVÁ, J., MIHULKA, S., ØÍHA, P., & ŠÍMOVÁ, I. 2012. Ecological effects of cell-level processes: Genome size, functional traits and regional abundance of herbaceous plant species. *Annals of Botany*. **110**, 1357–1367. doi: 10.1093/aob/mcs099.
- HULTGREN, K. M., JEFFERY, N. W., MORAN, A., & GREGORY, T. R. 2018.

- Latitudinal variation in genome size in crustaceans. *Biological Journal of the Linnean Society*. **123**, 348–359. doi:10.1093/biolinnean/blx153.
- JEFFERY, N. W. 2015. Genome Size Diversity and Evolution in the Crustacea. Thesis PhD. The Faculty of Graduate Studies of The University of Guelph. 274p.
- HULTGREN, K. M., CHAK, S. T. C., BJELAJAC, J., & MACDONALD, K. S. 2021. Correlated evolution of larval development, egg size and genome size across two genera of snapping shrimp. *Journal of Evolutionary Biology*. **34**, 1827–1839. doi: 10.1111/jeb.13945.
- JEFFERY, N. W., ELLIS, E. A., OAKLEY, T. H. & GREGORY, T. R. 2017. The genome sizes of ostracod crustaceans correlate with body size and evolutionary history, but not environment. *J. Hered.* **108**, 701–706. doi: 10.1093/jhered/e sx055.
- MACEY, M. G. 2010. Principles of flow cytometry. Flow cytometry: principles and applications In: *Macey MG*, ed. Totowa (NJ): Humana Press, 1–15.
- MAGALHÃES, C. 2003. Famílias Pseudothelphusidae e Trichodactylidae. In: *Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil* (G.A.S. Melo, ed.), pp. 143–287. Loyola, São Paulo.
- MAGALHÃES, C., CAMPOS, M. R., COLLINS, P. A. & MANTELATTO, F. L. 2016. Diversity, distribution and conservation of freshwater crabs and shrimps in South America. In: *A global overview of the conservation of fresh- water decapod crustaceans* (T. Kawai & N. Cumberlidge, eds.), pp. 303– 322. Springer International, Cham, Switzerland.
- MELO, A. G. 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. São Paulo, Edições Loyola/Museu de Zoologia, USP. 430p.
- 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): 459-468.
- 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**, 834-852.
- REES, D. J., BELZILE, C., GLÉMET, H., & DUFRESNE, F. 2008. Large genomes among caridean shrimp. *Genome*, **51**, 159-163.
- 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): 1001-1010.
- SOUZA-CARVALHO, E. A., MAGALHÃES, C., & MANTELATTO, F. L. 2017. Molecular phylogeny of the *Trichodactylus fluviatilis* Latreille, 1828 (Brachyura: Trichodactylidae) species complex. *Journal of Crustacean Biology*, **37**(2), 187–194, 2017. doi:10.1093/jcbiol/rux005.
- THOMAS, C. A. 1971. The genetic organization of chromosomes. *Ann. Rev. Genet.*, **5**, 237–256.
- VOGT, G. 2013. Abbreviation of larval development and extension of brood care as key features of the evolution of freshwater Decapoda. *Biol. Rev.* **88**, 81–116. doi: 10.1111/j.1469-185X.2012.00241.x;
- 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**, 1–8.
- YEO, D. C. J., NG, P. K. L., CUMBERLIDGE, N., MAGALHÃES, C., DANIELS, S. R., CAMPOS, M. R. 2008 Global diversity of crabs (Crustacea: Decapoda:

Brachyura) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 275–286.

*Cap. 2 - Tamanho do genoma para
caranguejos da infraordem Brachyura
associados a diferentes tipos de ambientes*



Resumo

Os crustáceos decápodes da infraordem Brachyura são os conhecidos “caranguejos verdadeiros”, podendo ser encontrados em quase todos os ecossistemas, desde recifes de corais rasos até fontes hidrotermais e habitats de água doce. Pouco se sabe sobre o tamanho do genoma destes animais e os trabalhos referentes aos registros e descrições são muito representativos. O presente capítulo teve como objetivo estimar de forma pioneira o conteúdo nuclear do DNA de 8 espécies de caranguejos, delimitando espécies de ambientes dulcícolas, estuarinas e marinhas e avaliando o valor-C (pg). As regiões de estudo incluíram as cidades de Botucatu e Ubatuba, locais de grande importância ecológica e com diferentes tipos de interação ecológicas. 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 proveniente do tecido muscular do quelípodo dos caranguejos foi utilizado para estimar o conteúdo do DNA (valor-C), e todas as análises foram realizadas com uma amostra de esperma de *Astyanax lacustris*, utilizada como padrão de calibração. O tamanho do genoma variou de 1,62 a 9,63 pg entre as espécies. Em relação ao ambiente, a média foi de 1,80 pg no ambiente marinho, 2,59 pg no ambiente estuarino e 8,61 pg no ambiente dulcícola, apresentando diferença estatística (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Os resultados representaram registros inéditos para a superfamília Potamoidea e evidenciaram resultados importantes para a ordem Decapoda. Isso pode estar relacionado a maior variação de parâmetros hidrodinâmicos e físico-químicos em habitats de água doce e nas respostas fisiológicas que essa ocupação pode acarretar, trazendo consigo uma evolução genômica. As informações aqui presentes estabelecerão uma ligação valiosa abrangendo diversas abordagens, o que contribuirá significativamente para a compreensão da evolução de diversas espécies em diversos níveis taxonômicos.

Palavras-chave: Decapoda, citometria de fluxo, desenvolvimento, conteúdo de DNA

Abstract

The decapod crustaceans of the Brachyura infraorder are considered “true crabs”, and are distributed in almost all ecosystems, from shallow coral reefs to hydrothermal vents and freshwater habitats. Little is known about the size of the genome of these animals and the works referring to records and descriptions are very representative. The objective of this chapter was to estimate, for the first time, the DNA nuclear content of 8 species of brachiuran crabs, delimiting species from freshwater, estuarine, and marine environments and evaluating the c-value according to the cellular physical and chemical characteristics. The study regions included the cities of Botucatu and Ubatuba, places of great ecological importance and with different types of ecological interactions. The collected individuals were taken to the laboratory and processed to determine the genome size by Flow Cytometry Analysis (FCA). The material came from the muscle tissue of the crabs' chelipeds sperm sample from *Astyanax lacustris* was used as a calibration standard. Genome size ranged from 1.62 to 9.63 pg between species. Regarding the environment, the average was 1.80 pg in the marine environment, 2.59 pg in the estuarine environment, and 8.61 pg in the freshwater environment, presenting a statistical difference (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). The results represented new records for the Potamoidea superfamily essential and showed important results for the Decapoda order. This may be related to a more significant variation in hydrodynamic and physical-chemical parameters in freshwater habitats and in the physiological reactions that this occupation can cause, bringing a genomic evolution. The information presented here will establish a valuable relation considering several approaches, which will contribute significantly to understanding the evolution of several species at different taxonomic levels.

Keywords: Decapoda, flow cytometry, development, DNA content.

INTRODUÇÃO

A análise do tamanho do genoma ou conteúdo de DNA nuclear é amplamente utilizada em diversos grupos de animais e plantas para quantificar as informações contidas nos genes e cromossomos em organismos eucarióticos. Medida em pictogramas (pg) de DNA por núcleos haplóides, é expressa como a determinação constante do valor C (Gregory, 2005). O entendimento dos padrões evolutivos e das modulações do tamanho do genoma ainda é incerto, sendo que estudos futuros têm como objetivo responder e interpretar esses valores correlacionando-os com a biologia e a história de vida dos animais (Jeffery *et al.*, 2016; Hultgren *et al.*, 2018).

No entanto, a obtenção de análises e estimativas conclusivas requer a disponibilidade de dados sólidos na literatura. Apesar dos esforços empreendidos para avaliar o tamanho do genoma em crustáceos decápodes, ainda há uma discrepância significativa tanto na comparação de espécies taxonomicamente válidas quanto no número de espécies que tiveram seu tamanho do genoma descrito (Rees *et al.*, 2008).

A citometria de fluxo tem a capacidade de medir as características ópticas e de fluorescência de uma única célula ou qualquer outra partícula, como microorganismos, núcleos e preparados cromossômicos (Macey, 2010). Na técnica, as medições são feitas enquanto as partículas passam uma a uma por um ponto de luz em alta velocidade (10^2 - 10^3 partículas/seg.). Avalia-se então a intensidade relativa da fluorescência dos núcleos isolados observados, expressando o “peso” ou “massa” da informação contida em cada núcleo estimulado (Xavier *et al.*, 2017).

Os crustáceos decápodes da infraordem Brachyura são os conhecidos “caranguejos verdadeiros”, e tem origem datada do início ao meio do Jurássico (Schweitzer & Feldmann, 2010), podendo ser encontrado em quase todos os ecossistemas, desde recifes de corais rasos até fontes hidrotermais e habitats de água doce,

é um dos grupos mais ricos em espécies e altamente derivado entre os crustáceos existentes, com mais de 7250 espécies descritas em 104 famílias (Ka *et al.*, 2019).

Dentre a infraordem Brachyura, os caranguejos de água doce são um importante componente da biota aquática continental e exercem grande influência no equilíbrio dos ecossistemas, atuando como processadores de matéria orgânica, predadores de pequenos invertebrados e peixes, além de serem predados por peixes, tartarugas, mamíferos e aves (Bond-Buckup & Buckup 1994; Magalhães 2003; Magalhães *et al.* 2016). Tais animais pertencem a superfamília Potamoidea e estão distribuídos entre as regiões tropicais e subtropicais da América Central e Sul, África, Madagascar, Índia, Ásia, Austrália e sul da Europa. Nas Américas, estes crustáceos estão representados pelas famílias Pseudothelphusidae Ortmann, 1893 e Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853 sendo que ambas ocorrem no Brasil (Magalhães, 2003).

Pouco se sabe sobre o tamanho do genoma dos caranguejos de água doce brasileiros e os trabalhos referentes a registros e descrições são muito representativos, pois indicam valores em espécies distribuídas na região tropical. Existe uma plataforma online utilizada para explorar todos os trabalhos e registros do tamanho do genoma feitos em plantas e animais. Disponível no endereço www.genomesize.com, o banco de dados online Gregory é uma maneira muito útil de acessar informações e usar todos os dados para comparar com novas informações propostas. Para os caranguejos de águas continentais brasileiros citados ainda não há nenhum registro disponível, o que ajudará a aprimorar o conhecimento quantitativo de DNA desse grupo tão importante.

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). Conseqüentemente, os padrões de

variação do tamanho do genoma entre os táxons permanecem indefinidos e somente comparações amplas são possíveis. A este respeito, comparações entre táxons que diferem nas principais características de estilo de vida, como animais de águas continentais versus marinhos ou versus estuarinos, podem ser de grande interesse.

Assim sendo, o presente capítulo teve como objetivo estimar de forma pioneira o conteúdo nuclear do DNA de 8 espécies de caranguejos brachiúros, delimitando espécies de ambientes dulcícolas, estuarinas e marinhas e avaliando o valor-C (pg). O resultado visa estimular novas pesquisas e futuras discussões acerca do tema utilizando esse tipo de dado.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem biológica

A espécie *Trichodactylus fluviatilis* Latreille, 1828 e a espécie *Trichodactylus petropolitanus* (Göldi, 1886) foram coletadas na Fazenda Experimental Edgardia (22°49'S; 48°23'W; 577m de altitude). A fazenda está dentro dos territórios do município de Botucatu-SP 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). As coletas dos animais foram realizadas, abrangendo grande parte dos fragmentos de floresta nativa do local bem como as áreas com maior ação antrópica (Fig. 1). Para os animais foram considerados dois métodos de captura: uso de armadilhas iscadas que serão colocadas aleatoriamente no riacho no final do período da tarde de um dia e inspecionadas na manhã do dia seguinte (coleta passiva) e a utilização

de peneiras para capturar os indivíduos associados a vegetação marginal ou escondidos em rochas no leito do riacho (Fig. 2). O emprego dos dois métodos de captura visa otimizar os resultados no sentido de amostrar espécimes que ocupam diferentes microhabitats e/ou que são mais ativos em períodos distintos do dia (Rocha & Bueno, 2004). Os dados coletados destas duas espécies estão inseridos no capítulo 1 e foram citados no presente capítulo afim de comparação entre os ambientes.

As espécies *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803), *Leptuca lepdodactyla* (Rathbun, 1898), *Minuca mordax* (Smith, 1870) e *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) foram coletadas no manguezal da Praia Dura, na cidade de Ubatuba-SP (23°29'26.2"S 45°09'51.6"W). A junção dos rios Comprido e Escuro dá origem ao manguezal da Praia Dura, um ecossistema que exibe uma variedade notável de microhabitats devido às suas distintas características físico-químicas (Leme, 2002). Os exemplares foram capturados no local manualmente em período de maré baixa, por meio de busca ativa com a escavação das tocas localizadas no substrato e fiscalização de raízes, galhos e troncos que seriam possíveis refúgios, bem como ao redor das árvores (Fig. 3).

As espécies *Persephona punctata* (Linnaeus, 1758) e *Hepatus pudibundus* (Herbst, 1785) foram coletadas na Baía de Ubatuba, também na cidade de Ubatuba-SP (23°25'00''S, 45°03'30''W). Essa região é caracterizada por baixíssimas planícies litorâneas, maciços promontórios isolados dos contrafortes terminais da Serra do Mar. Seus rios e estuários de manguezais formam áreas ricas em nutrientes com fauna marinha diversificada, e é uma área frequentemente utilizada para estudos de crustáceos e também uma importante região pesqueira (Mantelatto & Fransozo, 1999; Castro *et al.*, 2005). Os indivíduos foram coletados com um barco camaroeiro equipado com redes tipo “double-rig” e promovendo arrastos de 15 minutos em pontos com batimetrias e características

distintas. As duas espécies são capturadas acidentalmente (“by-catch”) na pesca direcionada às espécies de camarões marinhos.

Os indivíduos foram identificados até o nível de espécie com o auxílio de chaves dicotômicas disponíveis na literatura atual (Melo, 1996; Melo, 2003; Masunari *et al.*, 2020) e para a sexagem dos caranguejos foi observado a presença ou ausência de pleópodos e a morfologia do abdome, sendo triangular nos machos e circular nas fêmeas. Foram retiradas medidas da largura da carapaça (LC). Os animais foram transportados ao laboratório e mantidos vivos até as análises posteriores se iniciarem.

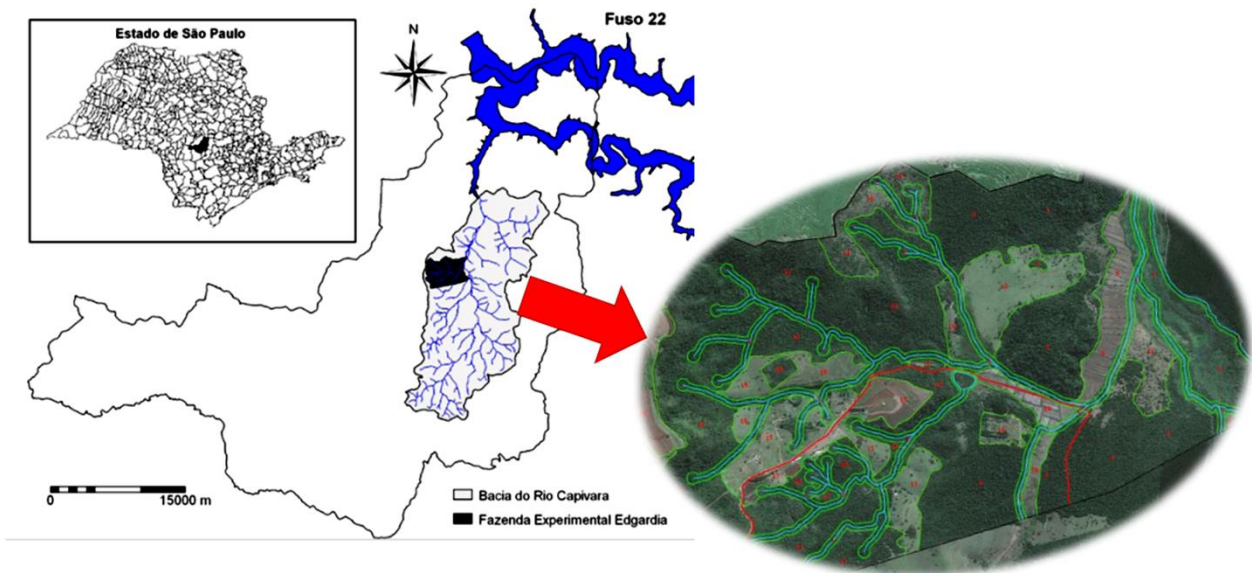


Figura 1. Mapa da Fazenda Experimental Edgardia evidenciando os riachos e os pontos em que os animais foram coletados.



Figura 2. Método de captura passiva utilizada para a obtenção das espécies *T. fluviatilis* e *T. petropolitanus* amostrados na Fazenda Experimental Edgardia, Botucatu-SP.



Figura 3. Método de captura ativa utilizada para a obtenção das espécies *U. cordatus*, *G. cruentata*, *L. leptodactyla* e *M. mordax* amostrados na Praia Dura, Ubatuba-SP.

Citometria de fluxo

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.

Primeiramente, o tecido foi tratado com 120 µL de solução de lise (9.53 mmol/L MgCl₂·7H₂O, 47.67 mmol/L KCl, 15 mmol/L Tris, 74 mmol/L sacarose, 0.6% Triton X-100, pH 8.0) e 1,5 µL de RNase para extrair o núcleo celular. Após a adição de RNase, as amostras foram agitadas em vortex por 10 segundos e incubadas a 37 °C em banho maria por 15 minutos. Por fim, o material foi filtrado com filtro de malha de 30 µm (Celltrics, Partec, Munster, Alemanha) e as suspensões de núcleos foram coradas com 1 mg/mL de iodeto de propídio (PI) que se liga ao DNA de fita dupla. A análise do ciclo celular de pelo menos 20.000 núcleos para cada amostra foi feita pela análise de citometria de fluxo usando um citômetro de fluxo FACSCanto II com software FACSDiva. A análise dos dados e a construção do histograma foram feitas com o software FlowJo, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.) e expressas como intensidade de fluorescência mediana. A figura 5 mostra o histograma representativo delineando a estratégia de gating para a análise. Gates foram usados para gerar um gráfico SSC (Side Scatter Parameter) vs. PE-A (Propidium Iodide) e o histograma de DNA (Moraes *et al.*, 2022). O primeiro gate de intensidade de fluorescência foi feito para a espécie padrão e o segundo gate para a espécie que foi analisada. Caso possível, ainda foi feito um terceiro gate para as células 4n que estão em divisão celular.

Para estimar o conteúdo de DNA, todas as análises foram feitas com uma amostra de esperma de *A. lacustris*, já que a espécie apresenta um conteúdo de DNA de 1,47 pg (Carvalho *et al.*, 2002). As amostras de esperma (~2 µL) foram processadas conforme mencionado anteriormente para o tecido muscular dos caranguejos. Após a coloração, a amostra de esperma foi adicionada a cada amostra do caranguejo (~10 µL por amostra). Para a coleta de sêmen para o valor C padrão os indivíduos foram anestesiados

previamente com uma mistura de óleo de cravo (200 mg/mL). Para estimular a espermição, foi aplicado hipófise desidratada de carpa (3 mg/kg) e a coleta foi realizada 6 horas depois utilizando os procedimentos descritos por Yasui et al. (2015). Em seguida os peixes ficaram em descanso por até 2h. O coeficiente de variância foi controlado e mantido abaixo de 3% para gerar análises precisas.

Análise de dados

Os animais coletados foram divididos em três grupos para comparar se há diferença entre o tamanho do genoma de acordo com os diferentes ambientes, sendo: Dulcícola para as espécies *T. fluviatilis* e *T. petropolitanus* encontradas em água-doce; Estuarino para as espécies *G. cruentata*, *U. cordatus*, *M. mordax* e *L. leptodactyla* encontradas no manguezal/estuário; e Marinho para as espécies *P. punctata* e *H. pudibundus* encontradas em ambiente marinho. Os dados foram testados quanto a homoscedasticidade (teste de Levene) e quanto a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) como pré-requisito para as análises estatísticas (Zar 1999).

Atendendo as premissas não paramétricas, estatisticamente os grupos foram comparados com um teste de Kruskal-Wallis e, posteriormente, um teste de Dunn. Quando o teste de Kruskal-Wallis indica diferenças significativas entre os grupos, o teste de Dunn é aplicado para realizar comparações de pares entre os grupos, ajudando a identificar quais deles têm diferenças estatisticamente significativas em termos de medianas.

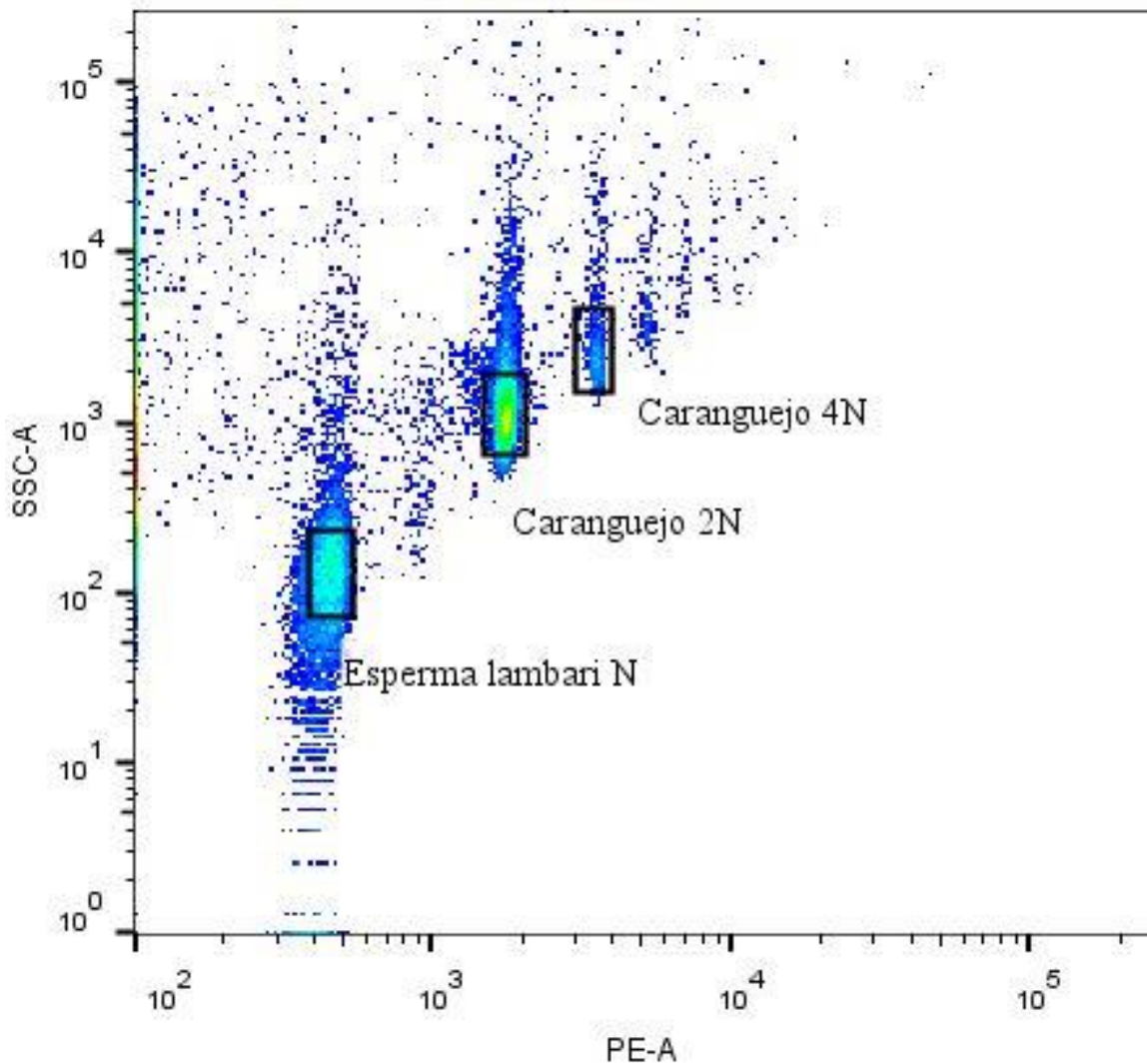


Figura 5. Análise de citometria de fluxo de amostra mostrando estratégia de gating, representando a espécie padrão e a espécie analisada. Parâmetro de dispersão lateral (SSC-A: parâmetro que mede a quantidade de feixe de laser que rebate nas partículas dentro da célula) vs Iodeto de propídio (PE-A).

RESULTADOS

Um total de 32 indivíduos distribuídos dentre as 8 espécies foram coletados e analisados. Os valores-C (média e desvio padrão) variaram de $1,60 \pm 0,10$ a $9,63$ pg e os comprimentos de carapaça de $10,13 \pm 0,66$ a $35,84 \pm 6,07$ mm (Tab. 1). O histograma

vertical evidencia a posição do tamanho do genoma das espécies analisadas em uma escala juntamente com a espécie padrão. O pico em vermelho representa os valores de referência das células de espermatozoide de *A. lacustris*, em azul estão representadas as espécies marinhas *P. punctata* e *H. pudibundus*, em amarelo e laranja as espécies coletadas no estuário/manguezal *M. mordax*, *L. leptodactyla*, *G. cruentata* e *U. cordatus*, e em verde as espécies dulcícolas *T. fluviatilis* e *T. petropolitanus*. A distância na escala do histograma representa a diferença entre os valores-C encontrados para o padrão e as espécies analisadas (Fig. 6).

Tabela 1. Lista das espécies analisadas no presente estudo com média e desvio padrão nos valores do tamanho do genoma (pg) e comprimento da carapaça (mm) amostrados em três regiões do Estado de São Paulo.

Espécie	N	C-value (pg)	LC (mm)
<i>P. punctata</i>	3	2.00 ± 0.05	34.74 ± 2.98
<i>H. pudibundus</i>	3	1.60 ± 0.10	34.12 ± 2.41
<i>M. mordax</i>	3	1.69 ± 0.07	16.49 ± 050
<i>L. leptodactyla</i>	3	1.62 ± 0.03	10.13 ± 0.66
<i>G. cruentata</i>	4	3.01 ± 0.24	35.84 ± 6.07
<i>U. cordatus</i>	4	3.60 ± 0.19	33.12 ± 9.61
<i>T. fluviatilis</i>	11	8.52 ± 0.38	23.11 ± 1.20
<i>T. petropolitanus</i>	1	9.63	24.0

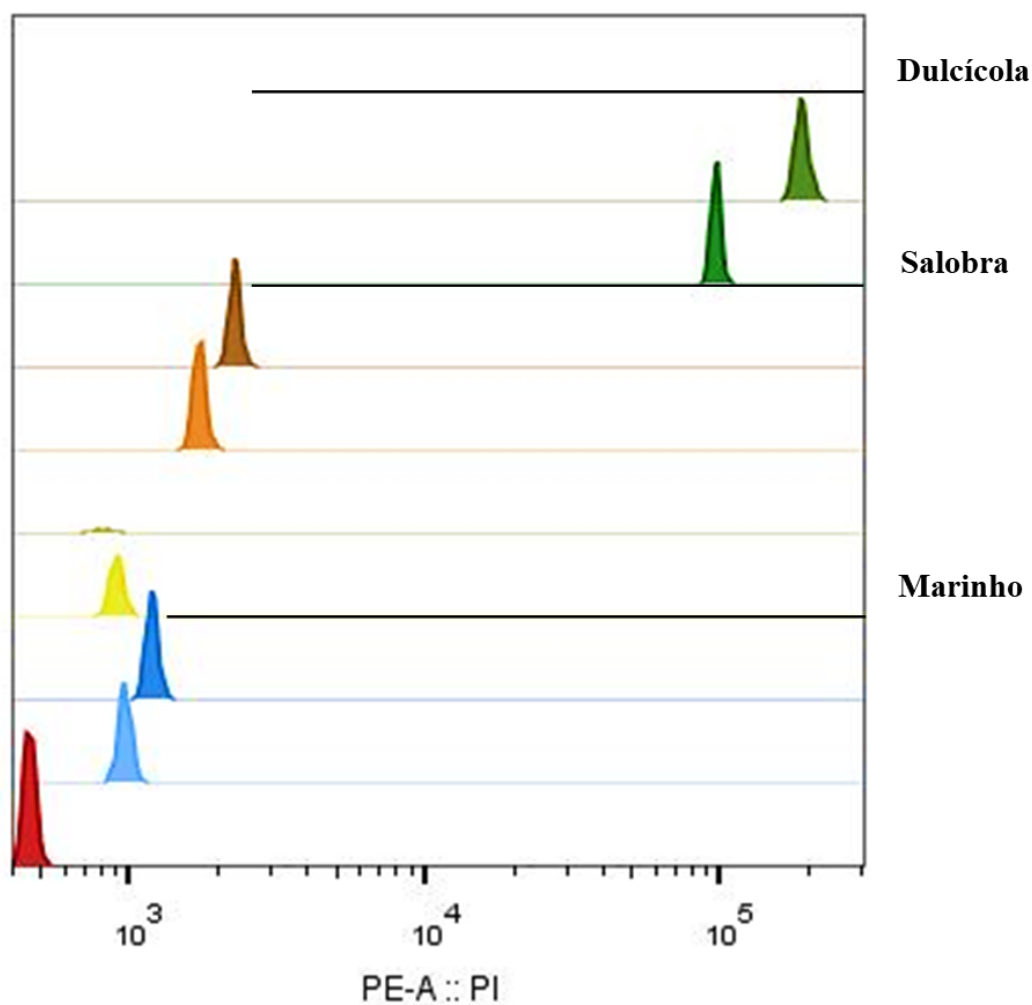


Figura 6. Histograma vertical evidenciando os valores encontrados para as espécies analisadas e a espécie padrão *A. lacustris* (em vermelho). Em azul estão representadas as espécies marinhas *P. punctata* e *H. pudibundus*, em amarelo e laranja as espécies coletadas no estuário/manguezal *M. mordax*, *L. leptodactyla*, *G. cruentata* e *U. cordatus*, e em verde as espécies dulcícolas *T. fluviatilis* e *T. petropolitanus*. PE-A :: PI: Iodeto de propídio

A média e desvio padrão do tamanho do genoma (pg) para as espécies marinhas foi de $1,80 \pm 0,22$; para as espécies estuarinas foi de $2,59 \pm 0,88$; e para as espécies dulcícolas foi de $8,61 \pm 0,48$ (Fig. 7). Os dulcícolas como um grupo diferiram significativamente dos marinhos e dos estuarinos (Kruskal-Wallis análise de variância unidirecional com método post hoc de Dunn, $P < 0,05$), enquanto não houve diferença estatística entre os grupos marinhos e estuarinos.

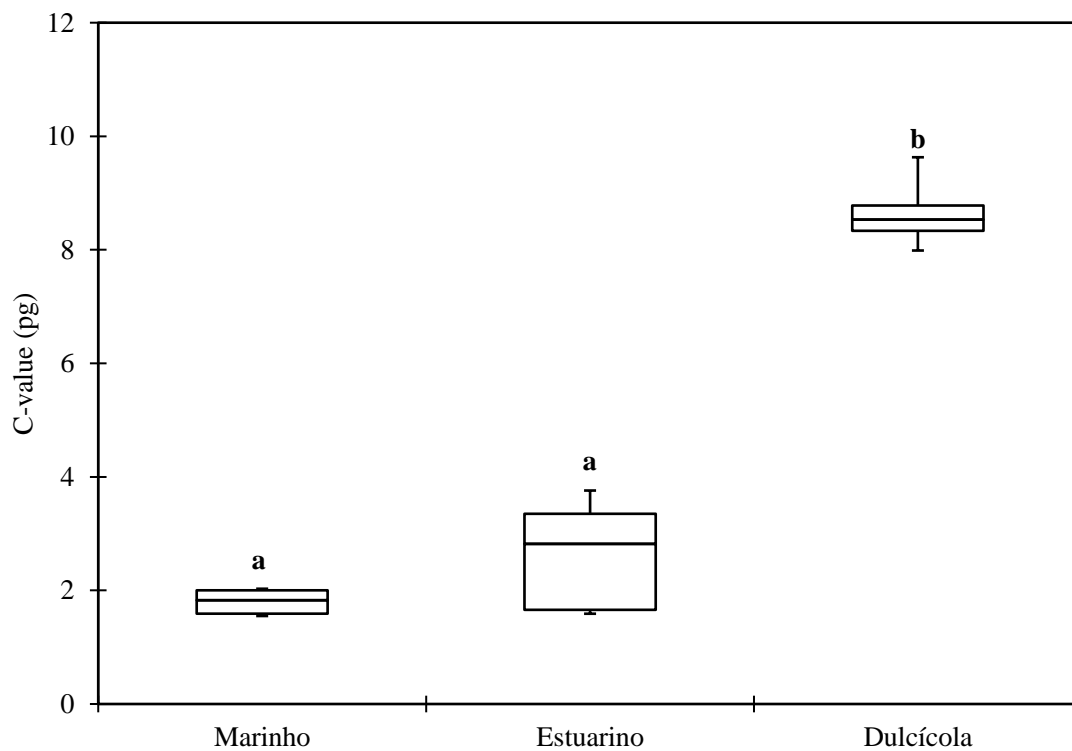


Figura 7. Gráfico BoxPlot comparativo entre o tamanho do genoma divididos em três categorias: Marinho, Estuarino e Dulcícola. Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Neste estudo, é apresentado um processo inovador recentemente aplicado para uma análise mais abrangente do genoma dos animais. Além das tradicionais análises descritivas da genética clássica, são exploradas perspectivas adicionais, como o peso molecular do DNA. O primeiro registro para um caranguejo de água doce brasileiro, bem como para a superfamília Potamoidea Ortmann, 1896, representa um importante avanço nesse cenário em que informações como o tamanho do genoma em comparação com o nível de diversificação de tal grupo de animais ainda é insignificante. Estes caranguejos desempenham um papel de extrema relevância nos ecossistemas aquáticos interiores, exercendo funções vitais como processadores de matéria orgânica, como predadores de pequenos invertebrados e peixes, além de servirem como fonte de alimento para diversas espécies de peixes, aves e mamíferos (Magalhães, 2003; Cumberlidge *et al.*, 2009).

O tamanho médio do genoma de 8,5 pg para as espécies dulcícolas está muito acima do genoma encontrado em outros caranguejos da infraordem Brachyura já descritos (base de dados Animal Genome Size Database, online). Este alto valor da superfamília Potamoidea estará disponível para futuras comparações e interpretações evolutivas, uma vez que todas estas espécies descritas habitam ambientes marinhos, estuarinos ou são semi-terrestres, incluindo as demais analisadas no presente trabalho. É essencial fornecer dados atualizados sobre animais em diferentes tipos de ambientes para possibilitar inferências e discussões evolutivas mais embasadas.

A diferença no tamanho do genoma entre as espécies de acordo com o ambiente representa um resultado muito importantes ao se levar em consideração os crustáceos da ordem Decapoda. Enquanto em outras ordens dentro do grupo muitos autores encontraram padrões de tamanho do genoma correlacionados a alguma variável (Hessen & Persson, 2009; Ritchie *et al.*, 2017; Hultgren *et al.*, 2018; e Hancock *et al.* 2021 - com Amphipoda - Hessen & Persson, 2009; e Jeffery *et al.* 2017 - para Ostracoda e Cladocera

- Gregory *et al.*, 2000; Wyngaard *et al.*, 2005; e Hultgren *et al.*, 2018 - para Copepoda), um padrão de correlação consistente ainda não foi encontrado em uma das ordens mais especiosas de crustáceos, os Decapoda. Apenas Ianucci *et al.* (2022) encontrou resultados similares para caranguejos da infraordem brachyura (embora outros fatores também tenham sido analisados e correlacionados com o tamanho do genoma).

Ainda falando sobre o habitat, alguns autores têm apontado como um dos principais fatores que conduzem a evolução do tamanho do genoma em muitas espécies (Grime & Mowforth, 1982; Dufresne & Jeffery, 2011; Herben *et al.*, 2012). No presente capítulo, os resultados sobre o tamanho do genoma ser maior em animais dulcícolas e menor em animais marinhos corroboraram tal afirmação. Isso pode estar relacionado à maior variação de parâmetros hidrodinâmicos e físico-químicos em habitats de água doce e nas respostas fisiológicas que essa ocupação pode acarretar, trazendo consigo uma evolução genômica. O modo de desenvolvimento de muitas espécies de crustáceos está relacionado à ocupação de tais habitats, e essa variação levou a uma tendência evolutiva de desenvolvimento direto. Em contraste, o desenvolvimento direto e abreviado é muito raro em espécies marinhas (Vogt, 2013). É correto propor então que espécies com desenvolvimento direto ou abreviado possuam maiores tamanhos do genoma em relação às espécies com desenvolvimento indireto ou mais fases larvais.

Uma das expectativas a respeito dos dados era que as espécies coletadas nas regiões estuarinas poderiam ter um tamanho de genoma menor do que as espécies marinhas e dulcícolas, de acordo com a hipótese de grandes genomas restritos (Knight *et al.*, 2005). Esta hipótese postula que as espécies com grandes genomas estão sub-representadas em ambientes menos estáveis devido ao custo de manutenção de grandes quantidades de DNA. Tais ambientes representam de fato diversas variáveis para se adaptar se comparado ao ambiente marinho, como imprevisibilidade de temperatura e

salinidade, extremos climáticos e disponibilidade de água, por exemplo. Entretanto, apesar das espécies *M. mordax* e *L. leptodactyla* apresentarem os menores valores-C (juntamente com a espécie marinha *H. pudibundus*), não houve diferença estatística entre as espécies coletadas no manguezal/estuário e as espécies coletadas no ambiente marinho.

Por conta da dificuldade de analisar a relação do tamanho do genoma com a história de vida dos animais, é fundamental que sejam registradas a maior quantidade de informações possíveis sobre o conteúdo do DNA nuclear das espécies, com diversos tipos de distribuição e comportamento particular, como em nossos resultados que avaliaram pioneiramente espécies de caranguejo brachiúros brasileiros. 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 diversos níveis taxonômicos.

REFERÊNCIAS

- BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. 1994. A Família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Arquivos de Zoologia do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo* 32(4): 1-346p.
- BONNIVARD, E.; CATRICE, O.; RAVAUX, J.; BROWN, SC.; HIGUET, D. 2009. Survey of genome size in 28 hydrothermal vent species covering 10 families. *Genome* 52, 524-536p.
- CUMBERLIDGE, N.; NG, P.K.L.; YEO, D.C.J.; MAGALHÃES, C.; CAMPOS, M.R.; ALVAREZ, F. 2009. Freshwater crabs and the biodiversity crisis: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Conservation*, 142, 1665–1673p.
- DUFRESNE, F.; JEFFERY, N. 2011. A guided tour of large genome size in animals: what we know and where we are heading. *Chromosome Research* 19: 925-938p.
- 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.
- GRIME, J. P.; MOWFORTH, M.A. 1982. Variation in genome size: an ecological interpretation. *Nature* 299, 151–153p.
- HANCOCK, Z.B.; HARDIN, F.O.; MURTHY, A.; HILLHOUSE, A.; JOHNSTON, J. S. 2021. Rapid genomic expansion and purging associated with habitat transitions in a clade of beach crustaceans (Amphipoda: Haustoriidae). *Journal of Crustacean Biology* 41:42. doi: 10.1093/jcbiol/ruab042.
- HERBEN, T.; SUDA, J.; KLIMEŠOVÁ, J.; MIHULKA, S.; ØÍHA, P.; ŠÍMOVÁ, I. 2012. Ecological effects of cell-level processes: Genome size, functional traits and regional abundance of herbaceous plant species. *Annals of Botany* 110, 1357–1367p.
- 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.

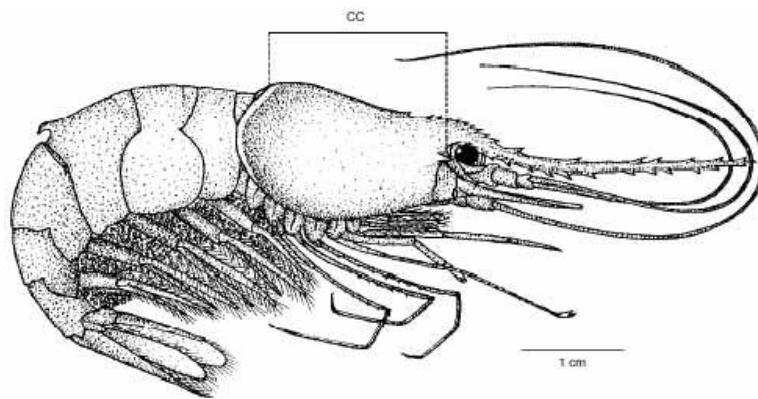
- HULTGREN, K.M.; JEFFERY, N.W.; MORAN, A.; GREGORY, T.R. 2018. Latitudinal variation in genome size in crustaceans. *Biological Journal of Linnean Society* 123, 348–359p.
- IANNUCCI, A.; SAHA, A.; CANNICCI, S.; BELLUCCI, A.; CHENG, C.L.Y.; NG, K.H.; FRATINI, S. 2022. Ecological, physiological and life-history traits correlate with genome sizes in decapod crustaceans. *Frontiers in Ecology and Evolution* 10: 1-15p.
- JEFFERY, N.W.; HULTGREN, K.; CHAK, S.T.C.; GREGORY, T.R.; RUBENSTEIN, D.R. 2016. Patterns of genome size variation in snapping shrimp. *Genome* 59: 393–402p.
- JEFFERY, N.W.; ELLIS, E.A.; OAKLEY, T.H.; GREGORY, T.R. 2017. The genome sizes of ostracod crustaceans correlate with body size and evolutionary history, but not environment. *Journal of Heredity* 108, 701–706p.
- KNIGHT, C.A.; MOLINARI, N.A.; PETROV, D.A. 2005. The Large Genome Constraint Hypothesis: Evolution, Ecology and Phenotype. *Annals of Botany* 95: 177-190p.
- LEME, M.H.A. 2002. A comparative analysis of the population biology of the mangrove crabs *Aratus pisonii* and *Sesarma rectum* (Brachyura, Grapsidae) from the north coast of São Paulo State, Brazil. *Journal of Crustacean Biology* 22(3): 553-557p.
- MACEY, M.G. 2010. Principles of flow cytometry. *Flow cytometry: principles and applications* In: Macey MG, ed. Totowa (NJ): Humana Press, 1–15p.
- MAGALHÃES, C.; CAMPOS, M.R.; COLLINS, P.A.; MANTELATTO, F.L. 2016. Diversity, distribution and conservation of freshwater crabs and shrimps in South America. In: *A global overview of the conservation of fresh- water decapod crustaceans* (T. Kawai & N. Cumberlidge, eds.), pp. 303– 322p.

- MAGALHÃES, C. 2003. Famílias Pseudothelphusidae e Trichodactylidae. p. 143–287.
In: G.A.S. Melo (ed), Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de Água Doce do Brasil. São Paulo, Editora Loyola.
- MANTELATTO, F.L.; FRANSOZO, A. 1999. Relative growth of the crab *Sesarma rectum* Randall, 1840 (Decapoda, Brachyura, Grapsidae) from Bertiooga, São Paulo, Brazil. *Pakistan Journal of Marine Sciences*. 5:11–21p.
- MASUNARI, S.; MARTINS, S.B.; ANACLETO, A.F.M. 2020. An illustrated key to the fiddler crabs (Crustacea, decapoda, ocypodidae) from the atlantic coast of Brazil. *Zookeys* 943: 1-20p.
- 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.
- REES, D.J.; BELZILE, C.; GLÉMET, H.; DUFRESNE, F. 2008. Large genomes among caridean shrimp. *Genome* 51, 159-163p.
- RITCHIE, H.; JAMIESON, A. J.; PIERTNEY, S.B. 2017. Genome size variation in deep-sea amphipods. *Royal Society Open Science* 4:170862. doi: 10.1098/rsos.170862.
- 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.
- VOGT, G. 2013. Abbreviation of larval development and extension of brood care as key features of the evolution of fresh-water Decapoda. *Biological Review*. 88:81–116p.

WYNGAARD, G.A.; RASCH, E.M.; MANNING, N.M.; GASSER, K.; DOMANGUE, R. 2005. The relationship between genome size, development rate, and body size in copepods. *Hydrobiologia* 532, 123–137p.

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.

*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 corpóreo*



Resumo

A infraordem Caridea Dana 1852 é representada por mais de 3000 espécies, sendo considerada como um dos principais grupos para a compreensão de modelos biológicos e evolutivos dentro da ordem Decapoda. Os camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 são representadas por mais de 125 espécies descritas distribuídas em rios, riachos, lagos e reservatórios em zonas tropicais e subtropicais ao redor do mundo, sendo algumas destas espécies são endêmicas do Brasil. O presente capítulo teve como objetivo estimar o conteúdo nuclear do DNA de cinco espécies de camarões carídeos continentais, avaliando o valor-C (pg) de acordo com as características particulares sobre o tipo de desenvolvimento e tamanho em cada uma delas. As regiões de estudo incluíram as cidades de Botucatu, Piratininga e Iacanga, locais de grande importância ecológica e com diferentes tipos de interação ecológicas e ação antrópica. 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 das brânquias dos camarões e para estimar o conteúdo do DNA, todas as análises foram realizadas com uma amostra de esperma de *Astyanax lacustris*, a qual foi utilizada como padrão de calibração. O tamanho do genoma variou de 4,01 a 24,68 pg entre as espécies (*M. pantanalense* e *M. brasiliense*), e de 9,03 a 21,73 pg em relação ao tipo de desenvolvimento (direto ou abreviado e indireto ou com muitas fases larvais), apresentando diferença estatística (teste t, $p < 0,05$). A história de vida das espécies e as estratégias que adotam para a reprodução parece desempenhar um papel determinante na modelação de tais características genéticas. Houve uma tendência envolvendo menores valores-C àquelas espécies r-estrategistas, que investem em uma prole numerosa e com grande capacidade de dispersão, ao contrário das espécies k-estrategistas, que investem na qualidade da prole com menor fecundidade e mais cuidados parentais. Esses dados estabelecerão uma conexão valiosa no âmbito das informações biológicas primordiais, o que terá um papel de grande relevância para a compreensão da evolução de várias espécies em diferentes níveis taxonômicos. Os resultados apresentaram registros inéditos para espécies endêmicas do Brasil.

Palavras-chave: Crustacea, tamanho do corpo, conteúdo de DNA, citometria de fluxo.

Abstract

The infraorder Caridea Dana 1852 is represented by more than 3000 species and is considered a strategic group for the understanding of biological and evolutionary models within the order Decapoda. Freshwater shrimp of the genus *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 are represented by more than 125 described species distributed in rivers, streams, lakes, and reservoirs in tropical and subtropical zones worldwide, some of which are endemic to Brazil. This chapter aimed to estimate the nuclear DNA content of five species of continental carid shrimp, evaluating the c-value according to developmental pattern and size characteristics. The study regions included the cities of Botucatu, Piratininga, and Iacanga, places of great ecological relevance, and different ecological interactions and anthropic actions. The collected individuals were taken alive to the laboratory until the Flow Cytometry Analysis (FCA) to estimate DNA content. The gills of shrimp sperm samples from *Astyanax lacustris* were used as a calibration standard. The genome size ranged from 4.01 to 24.68 pg between species (*M. pantanalense* e *M. brasiliense*) and from 9.03 to 21.73 pg about development (direct or abbreviated and indirect or with many larval stages), showing statistical difference ($P = 0.0000$). The life history of species and the reproductive strategies seem to play a decisive role in shaping such genetic characteristics. There was a trend involving lower values of C for those r-strategist species, which invest in numerous offspring with high dispersal capacity, as opposed to k-strategist species, which invest in the quality of offspring with lower fecundity and more parental care. These data will establish a valuable connection within the scope of primordial biological information, which will have a role of great relevance for understanding the evolution of several species at different taxonomic levels. The results presented unprecedented records for endemic species in Brazil.

Keywords: Crustacea, body size, DNA content, flow cytometry.

INTRODUÇÃO

O conteúdo do DNA nuclear é exibido como uma das muitas ferramentas utilizadas em estudos para investigar as perspectivas evolutivas e a história de vida de diversas espécies animais. É considerado como a biomassa do conteúdo de informação em genes e cromossomos em eucariotos, e medido em picogramas (pg) do DNA por núcleos haploides (Gregory, 2005). Essa biomassa é interpretada a partir da constante denominada como “c-value” (valor-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 “valor-C” e “genome size” são intercambiáveis. Apesar das tentativas realizadas para estimar a dimensão do genoma em crustáceos decápodes, persiste uma disparidade substancial tanto na avaliação entre espécies taxonomicamente reconhecidas quanto no registro do número de espécies para as quais o tamanho do genoma foi documentado (Rees *et al.*, 2008).

Historicamente, a primeira citometria de fluxo desenvolvida era um instrumento de parâmetro único que detectava apenas o tamanho das células. Atualmente, instrumentos altamente sofisticados evoluíram com a capacidade de detectar 14 parâmetros simultaneamente (Wilkerson, 2012). A citometria de fluxo tem a capacidade de medir as características ópticas e de fluorescência de uma única célula ou qualquer outra partícula, como microorganismos, núcleos e preparações cromossômicas em um fluxo de fluido quando passam por uma fonte de luz (Macey, 2010). Avalia-se então a intensidade relativa da fluorescência dos núcleos isolados observados, expressando o “peso” ou “massa” da informação contida em cada núcleo estimulado (Xavier *et al.*, 2017).

Com uma riqueza inferior apenas aos caranguejos da infraordem Brachyura Latreille, 1802, a infraordem Caridea Dana 1852 é representada por mais de 3000

espécies, sendo considerada como um dos principais grupos para a compreensão de modelos biológicos e evolutivos dentro da ordem Decapoda (De Grave & Fransen, 2011). Com um formato do corpo típico de “shrimp like”, os camarões carídeos são popularmente denominados como camarões com a carapaça e abdome comprimidos lateralmente (Bauer, 2004). O táxon é dividido em mais de 30 famílias, sendo as mais representativas e com maior relevância Palaemonidae Rafinesque, 1815 e Alpheidae Rafinesque, 1815 (De Grave & Fransen, 2011).

Os camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 são representadas por mais de 125 espécies descritas distribuídas em rios, riachos, lagos e reservatórios em zonas tropicais e subtropicais ao redor do mundo (Holthuis, 1980). Algumas destas espécies são endêmicas do Brasil (Müller, 1892; Bueno & Rodrigues, 1995) mas outras tem uma extensa distribuição geográfica, o que inclui outros países americanos (Holthuis, 1952). Pouco se sabe sobre o tamanho do genoma destes animais e os trabalhos referentes a registros e descrições são muito representativos. Disponível no endereço www.genomesize.com, o banco de dados online Gregory é uma maneira muito útil de acessar informações e usar todos os dados para comparar com novas informações propostas.

Para os camarões de águas continentais do gênero existem apenas 4 espécies com o tamanho do genoma descritas, e apenas uma ocorrendo no Brasil. Os dados obtidos no presente trabalho ajudarão a aprimorar o conhecimento quantitativo de DNA desse grupo tão importante.

Assim sendo, o presente capítulo teve como objetivo estimar o conteúdo nuclear do DNA de cinco espécies de camarões carídeos continentais, avaliando o valor de c de acordo com as características particulares sobre o tipo de desenvolvimento e tamanho em

cada uma delas. O resultado visa estimular novas pesquisas e futuras discussões acerca do tema utilizando esse tipo de dado.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem biológica

A espécie *Macrobrachium iheringii* (Ortmann, 1897) foi coletada na Fazenda Experimental Edgardia (22°49'S; 48°23'W; 577m de altitude). A fazenda está dentro dos territórios do município de Botucatu-SP 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) (Fig. 1). A espécie *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) foi coletada no rio batalha (22°24'24.1"S 49°05'51.4"W). O rio está localizado na região centro-oeste do Estado de São Paulo e é pertencente à bacia hidrográfica do Médio Tietê Superior. Tem suas nascentes na Serra da Jacuntiga (Agudos) e em seu percurso, pelos municípios de Agudos, Bauru, Piratininga, Avaí, Duartina, Gália, Presidente Alves, Reginópolis e Uru, atinge o Rio Tietê com 167 km de extensão, recebendo lançamentos de esgotos domésticos e efluentes industriais em diferentes pontos e tendo pontos de pouca ação antrópica (Da Silva *et al.*, 2009). As espécies *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862), *Macrobrachium pantanalense* Santos, Hayd & Anger, 2013 e *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1778) foram coletadas no rio Claro (21°53'28.2"S 49°00'44.5"W), na porção localizada na cidade de Iacanga. O rio é afluente da margem esquerda do rio Tietê, e tem nascente entre as cidades Bauru e Iacanga. Percorre por volta de 34 km, alternando diversos tipos de ação antrópica.

A espécie *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) foi adquirida em loja de aquarismo especializada.

As coletas dos animais foram realizadas, abrangendo grande parte dos fragmentos de floresta nativa do local bem como as áreas com maior ação antrópica das regiões citadas. Para os animais foram considerados dois métodos de captura: uso de armadilhas iscadas que serão colocadas aleatoriamente no riacho no final do período da tarde de um dia e inspecionadas na manhã do dia seguinte (coleta passiva) e a principalmente a utilização de peneiras para capturar os indivíduos associados a vegetação marginal ou escondidos em rochas no leito do riacho (Fig. 2). O emprego dos dois métodos de captura visou otimizar os resultados no sentido de amostrar espécimes que ocupam diferentes microhabitats 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 (Melo, 2003; Pillegi, 2009), e a sexagem foi feita pela observação, sob estereomicroscópio óptico, da morfologia do segundo par de pleópodos, evidenciando a presença do apêndice masculino (Valenti, 1998; García-Dávila *et al.*, 2000; Mantelatto & Barbosa, 2005). Com um paquímetro de precisão 0.01 mm foram retiradas medidas do comprimento da carapaça (CC mm). Os animais foram transportados ao laboratório e mantidos vivos até as análises posteriores se iniciarem.

Citometria de fluxo

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.

Primeiramente, o tecido foi tratado com 120 μ L de solução de lise (9.53 mmol/L $MgCl_2 \cdot 7H_2O$, 47.67 mmol/L KCl, 15 mmol/L Tris, 74 mmol/L sacarose, 0.6% Triton X-100, pH 8.0) e 1,5 μ L de RNase para extrair o núcleo celular. Após a adição de RNase, as amostras foram agitadas em vortex por 10 segundos e incubadas a 37 °C em banho maria por 15 minutos. Por fim, o material foi filtrado com filtro de malha de 30 μ m (Celltrics, Partec, Munster, Alemanha) e as suspensões de núcleos foram coradas com 1 mg/mL de iodeto de propídio (PI) que se liga ao DNA de fita dupla.

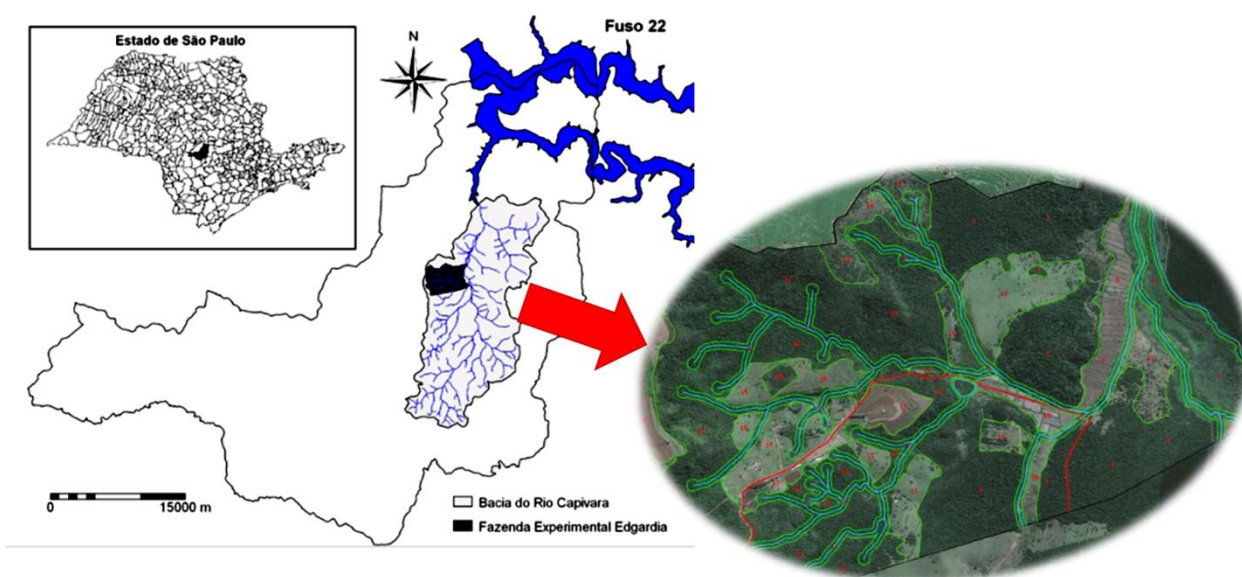


Figura 1. Mapa da Fazenda Experimental Edgardia evidenciando os riachos e os pontos em que os animais foram coletados.



Figura 2. Método de captura ativa utilizada para a obtenção das espécies amostrados nas regiões de coleta. As peneiras foram utilizadas nas vegetações marginais ou leitos dos rios e riachos. Foto: João G. Barioto.

A análise do ciclo celular de pelo menos 20.000 núcleos para cada amostra foi feita pela análise de citometria de fluxo usando um citômetro de fluxo FACSCanto II com software FACSDiva. A análise dos dados e a construção do histograma foram feitas com o software FlowJo, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.) e expressas como intensidade de fluorescência mediana. A figura 5 mostra o histograma representativo delineando a estratégia de gating para a análise. Gates foram usados para gerar um gráfico SSC (Side Scatter Parameter) vs. PE-A (Propidium Iodide) e o histograma de DNA (Moraes *et al.*, 2022). O primeiro gate de intensidade de fluorescência foi feito para a espécie padrão e o segundo gate para a espécie que foi analisada. Caso possível, ainda foi feito um terceiro gate para as células 4n que estão em divisão celular.

Para estimar o conteúdo de DNA, todas as análises foram feitas com uma amostra de esperma de *A. lacustris*, já que a espécie apresenta um conteúdo de DNA de 1,47 pg (Carvalho *et al.*, 2002). As amostras de esperma (~2 µL) foram processadas conforme mencionado anteriormente para o tecido muscular dos caranguejos. Após a coloração, a amostra de esperma foi adicionada a cada amostra do caranguejo (~10 µL por amostra).

Para a coleta de sêmen para o valor-C padrão os indivíduos foram anestesiados previamente com uma mistura de óleo de cravo (200 mg/mL). Para estimular a espermição, foi aplicado hipófise desidratada de carpa (3 mg/kg) e a coleta foi realizada 6 horas depois utilizando os procedimentos descritos por Yasui *et al.* (2015). Em seguida os peixes ficaram em descanso por até 2h. O coeficiente de variância foi controlado e mantido abaixo de 3% para gerar análises precisas.

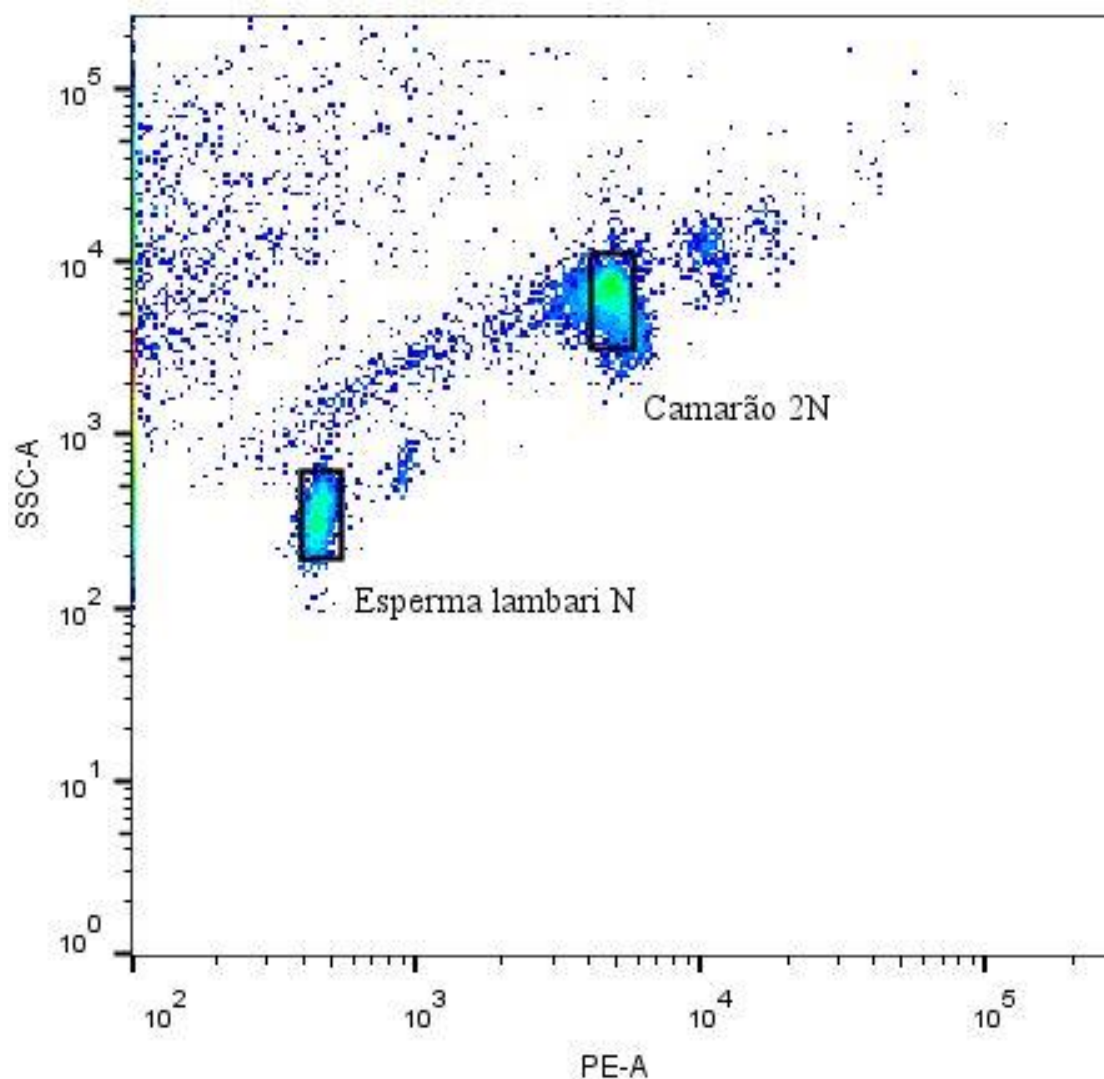


Figura 3. Análise de citometria de fluxo de amostra mostrando estratégia de gating, representando a espécie padrão e a espécie analisada. Parâmetro de dispersão lateral (SSC-A: parâmetro que mede a quantidade de feixe de laser que rebate nas partículas dentro da célula) vs Iodeto de propídio (PE-A).

Análise de dados

Os animais coletados foram divididos em dois grupos para comparar se há diferença entre o tamanho do genoma de acordo com o tipo de desenvolvimento, sendo: Desenvolvimento abreviado para as espécies *M. iheringi*, *M. jelskii* e *M. brasiliense*, as quais apresentam apenas três estágios larvais (Bueno, 1980; Magalhães, 2000; Garcia-Davila et al, 2000) e ovos grandes e pouco numerosos (Holthuis, 1952; Gamba, 1984; Sollaud, 1920; Melo, 2003); e Desenvolvimento estendido para as espécies *M. acanthurus*, *M. amazonicum* e *M. pantanalense*, as quais apresentam de oito a onze estágios larvais (Guest, 1979; Magalhães, 1985; Anger & Hayd, 2010; Jalihal *et al*, 1993) e ovos pequenos e muito numerosos (Chaudhury, 1970; Jalihal *et al*, 1993; Anger & Hayd, 2010). Para comparação se existe diferença estatística entre os dois grupos, foi realizado um teste T (student). Esse teste é particularmente aplicado quando se trabalha com amostras pequenas e assume que os dados são aproximadamente distribuídos de maneira normal. Para verificar se existe relação entre o comprimento da carapaça e o valor de C foi realizado uma regressão linear simples, onde a variável dependente foi o valor de C e a variável independente o comprimento da carapaça.

RESULTADOS

Um total de 33 indivíduos de *Macrobrachium* distribuídos em 6 espécies foram amostrados e analisados. Os valores-C (média e desvio padrão) variaram de $4,41 \pm 0,62$ a $25,6 \pm 1,08$ pg e os comprimentos de carapaça de 6.18 ± 1.45 a 15.93 ± 1.21 (Tab. 1).

O histograma pode ser avaliado observando-se os dois picos que representam em vermelho os valores de referência das células de espermatozoides de *A. lacustris*, em azul a fluorescência das células 2n das espécies analisadas. A distância na escala do

histograma representa a diferença entre os valores de C encontrados para o padrão e a espécie analisada (Fig. 2).

A relação do valor-C dos indivíduos em função do comprimento da carapaça está representada na Figura 3, a partir da qual constata-se que o valor-C se eleva com o aumento do comprimento da carapaça (Regressão Linear Simples; $R^2 = 0,43$; $F = 23,36$; $P < 0,001$).

Considerando a história de vida e o tipo de desenvolvimento, as 6 espécies foram divididas em 2 categorias, sendo com desenvolvimento abreviado ou pelo menos pós-larvas com desenvolvimento abreviado (*M. brasiliense* e *M. iheringi*) e desenvolvimento estendido, com muitas fases larvais e fases de pós larva em desenvolvimento (*M. acanthurus*, *M. amazonicum* e *M. pantanalense*). A média de tamanho do genoma (pg) para as espécies com desenvolvimento abreviado foi de $21,73 \pm 8,69$ e para as espécies com desenvolvimento estendido foi de $8,99 \pm 5,11$, apresentando diferença estatística entre elas (teste t; $T = 3,1$; $P < 0,004$; Fig. 4).

Tabela 1. Lista de *Macrobrachium* spp. analisados no presente estudo com média e desvio padrão nos valores do tamanho do genoma (pg) e comprimento da carapaça (mm) amostrados em três regiões do Estado de São Paulo.

Espécie	N	C-value (pg)	CC (mm)
<i>M. acanthurus</i>	9	8.14 ± 3.45	9.87 ± 1.64
<i>M. amazonicum</i>	5	6.17 ± 0.24	7.16 ± 0.88
<i>M. brasiliense</i>	4	23.29 ± 1.00	15.93 ± 1.21
<i>M. iheringi</i>	3	7.03 ± 0.81	14.57 ± 2.11
<i>M. jelskii</i>	7	8.37 ± 0.68	7.21 ± 0.86
<i>M. pantanalensis</i>	5	4.82 ± 0.84	6.18 ± 1.45

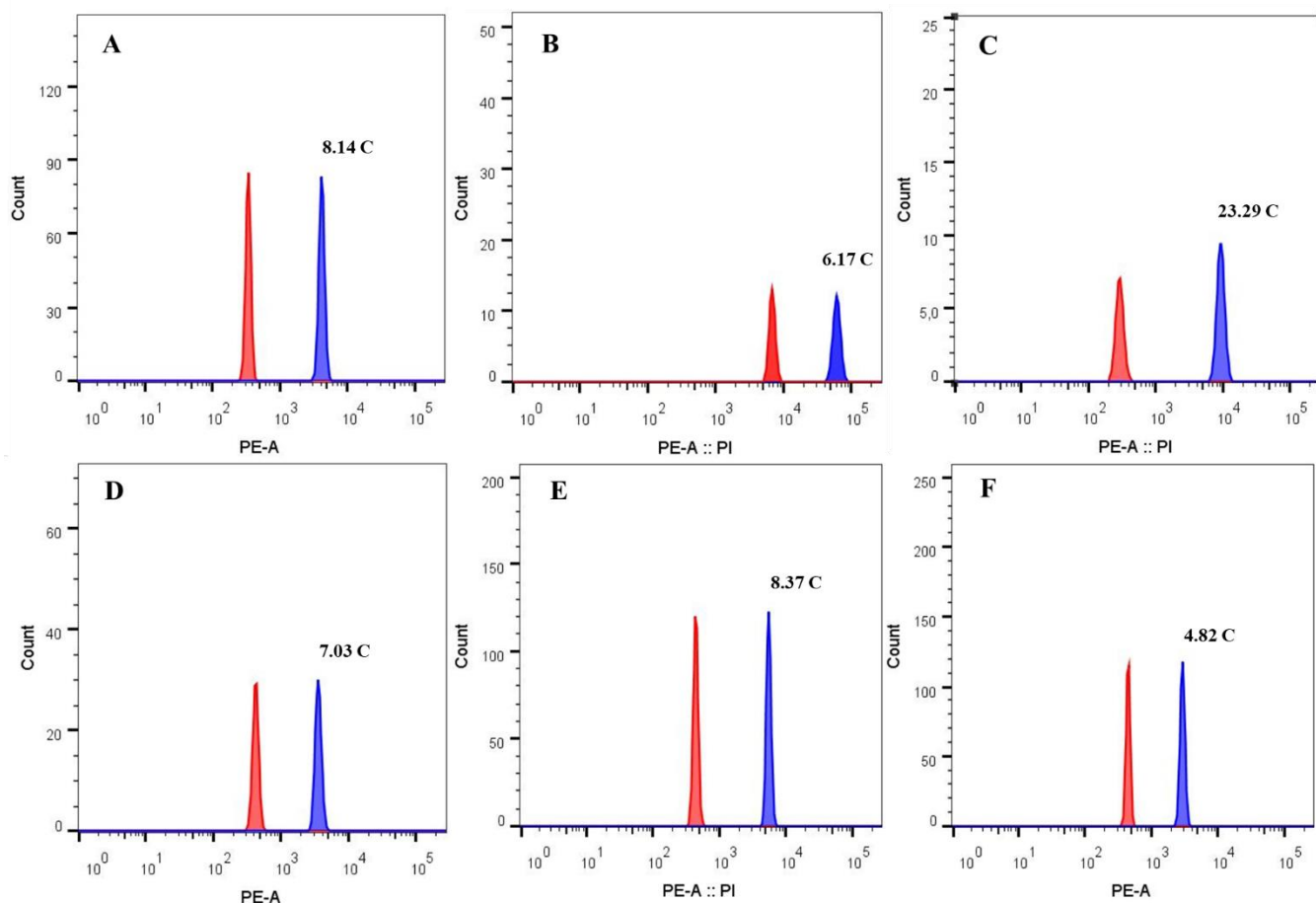


Figura 2. Histograma evidenciando os valores encontrados para o gênero *Macrobrachium* (em azul) e a espécie padrão *A. lacustris* (em vermelho). A: *M. acanthurus*; B: *M. amazonicum*; C: *M. brasiliense*; D: *M. iheringi*; E: *M. jelskii*; F: *M. pantanalense*. Count: número de núcleos; PE-A: Iodeto de propídio.

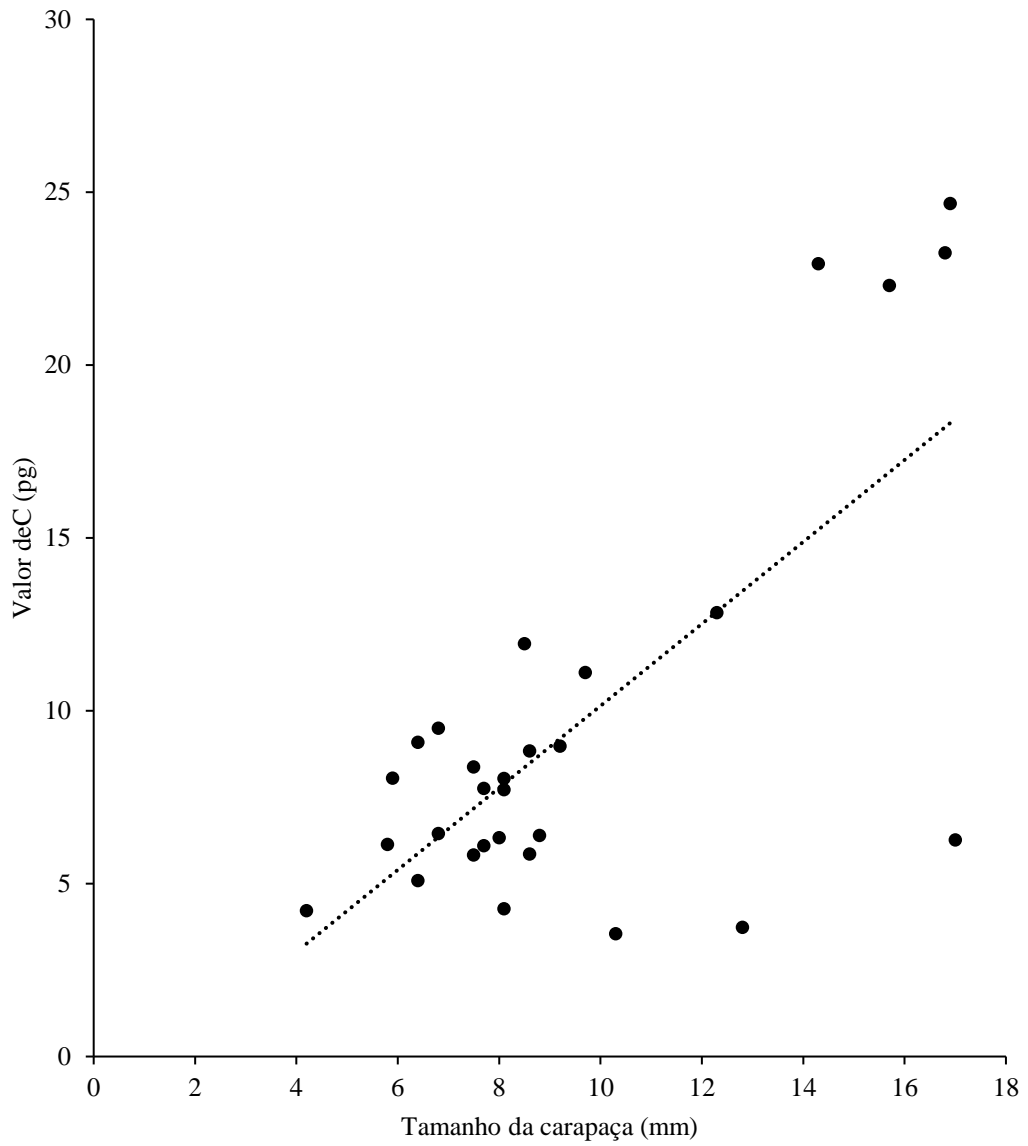


Figura 3. Gráfico de regressão linear entre o valor de c (y) e o comprimento da carapaça (x) dos indivíduos do gênero *Macrobrachium* coletados em três regiões do estado de São Paulo.

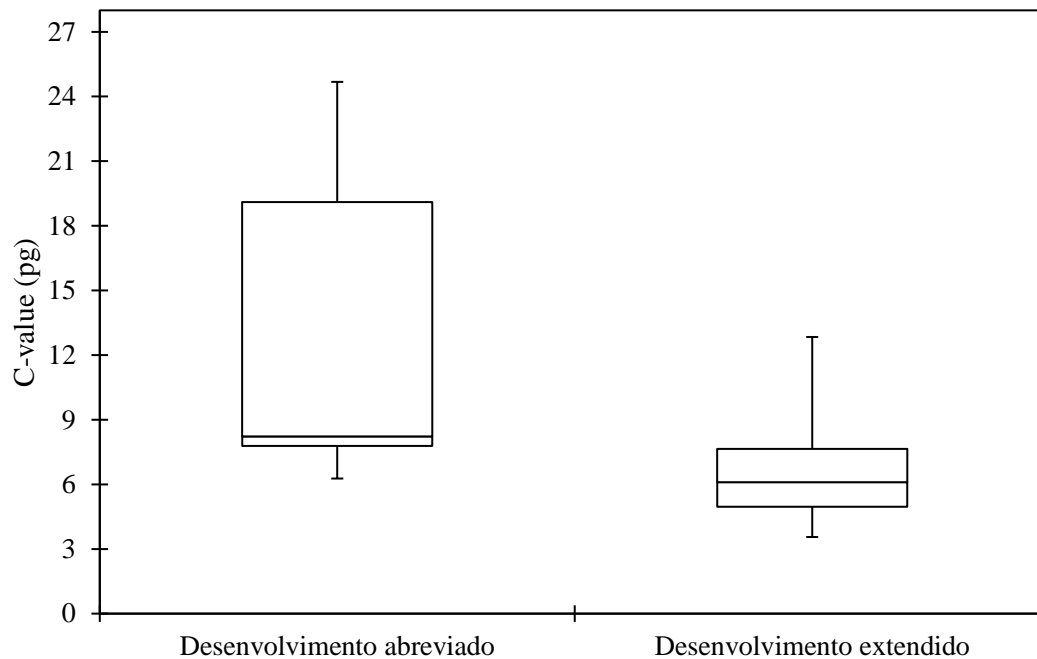


Figura 4. Gráfico BoxPlot comparativo entre o tamanho do genoma divididas em duas categorias: desenvolvimento direto ou abreviado e desenvolvimento indireto ou com muitas fases larvais.

DISCUSSÃO

Este estudo introduz um método inovador que tem sido recentemente empregado para examinar os genomas de animais sob novas perspectivas evolutivas e de história de vida, incluindo fatores como peso molecular do DNA, em contraste com as abordagens tradicionais de análise genética descritiva.

O primeiro registro referente às espécies de camarões de águas continentais brasileiras constitui um marco significativo dentro de um contexto ao qual detalhes como a relação entre o tamanho do genoma em comparação com o nível de diversidade desse conjunto de organismos ainda é insignificante.

Os camarões do gênero *Macrobrachium* destacam-se principalmente por apresentar uma acentuada plasticidade adaptativa, ocorrendo em diferentes ambientes nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (Holthuis, 1952; Short, 2004; Pileggi & Mantelatto, 2010). 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 (Holthius, 1980; Pileggi, 2009).

A história de vida das espécies e as estratégias que adotam para a reprodução parece desempenhar um papel determinante na modelação das características genéticas. Parece haver uma tendência envolvendo menores valores-C àquelas espécies r-estrategistas, que investem em uma prole numerosa e com grande capacidade de dispersão, ao contrário das espécies k-estrategistas, que investem na qualidade da prole com menor fecundidade e especialização quanto ao cuidado parental. Isso corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, onde houve diferença estatística no grupo considerado com desenvolvimento abreviado e os maiores resultados de valores-C foram registrados para a espécie *M. brasiliense*.

Rees *et al.* (2007) relaciona isso ao fato de que as espécies que investem em proles numerosas tendem a ter células menores e crescimento acelerado, enquanto as espécies que investem na qualidade da prole tendem a possuir células maiores e menor padrão de crescimento. Gregory (2002), entretanto, salienta que a discussão sobre o desenvolvimento do organismo deve ser mais abrangente, e não apenas a rapidez com que o organismo deve passar pelas transformações em seu desenvolvimento, mas quanta transformação deve ser feita na quantidade de tempo disponível é uma importantíssima informação.

Uma correlação positiva entre o tamanho do genoma e o tamanho do corpo foi encontrada em nossos resultados, o que corrobora com o descrito em uma variedade de invertebrados (McLaren *et al.*, 1988; Ferrari & Rai, 1989; Finston, Hebert & Footit, 1995; Gregory *et al.*, 2000). Essas correlações positivas indicam que pelo menos parte da diferença no tamanho do corpo entre espécies relacionadas é resultado de mudanças nos

volumes das células, e não no número de células (Hessen & Persson, 2009). Tais resultados representam registros muito importantes dentro desse grupo restrito de camarões de água doce, uma vez que nem em relação a ordem Decapoda um padrão de relação foi bem definido.

As espécies descritas no presente capítulo ou alcançaram grandes valores de tamanhos do genoma ou se aproximaram da média representada para a ordem Decapoda (6,97 pg; base de dados Animal Genome Size Database, online). Se compararmos os dois grupos de indivíduos “shrimp like” maiores representados dentro da ordem Decapoda (Dendrobranchiata e Caridea), veremos que os camarões carídeos apresentam tamanhos do genoma muito maiores (Fig. 5). Ao traçar um panorama evolutivo partindo da premissa dos camarões Dendrobranchiata como grupo primitivo e os camarões Caridea como grupo derivado (Porter *et al.*, 2005), podemos inferir uma evolução no tamanho do genoma. Se por um lado genomas pequenos são uma característica “primitiva” ou mais recente em organismos é uma questão de debate e, para muitos táxons, pequenos genomas evoluíram de genomas ancestrais maiores (Gregory, 2002), por outro lado existe a proposta de que genomas maiores em alguns casos são construídos através de condições mais extremas e derivados secundariamente de genomas menores (Libertini *et al.*, 2008).

O tamanho do genoma parece ser apresentado como um elo entre a evolução e os padrões adaptativos dos camarões carídeos. Isto tende a ficar mais claro quando buscamos situações filogenéticas e geográficas/ecológicas extremas, como por exemplo os maiores valores-C encontrados em espécies antárticas (Rees *et al.*, Hultgren *et al.*, 2018). Neste sentido, o valor-C pode ser modulado em função da necessidade particular da determinada característica.

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 (Gregory *et al.*, 2000; Gregory, 2001; Hessen & Persson, 2009). Por conta da dificuldade de analisar a relação do tamanho do genoma com a história de vida dos animais, é fundamental que sejam registradas a maior quantidade de informações possíveis sobre o conteúdo do DNA nuclear das espécies, com diversos tipos de distribuição e comportamento particular, como em nossos resultados. Esses dados estabelecerão uma conexão valiosa no âmbito das informações biológicas primordiais, englobando uma variedade de abordagens, o que terá um papel de grande relevância para a compreensão da evolução de várias espécies em diferentes níveis taxonômicos.

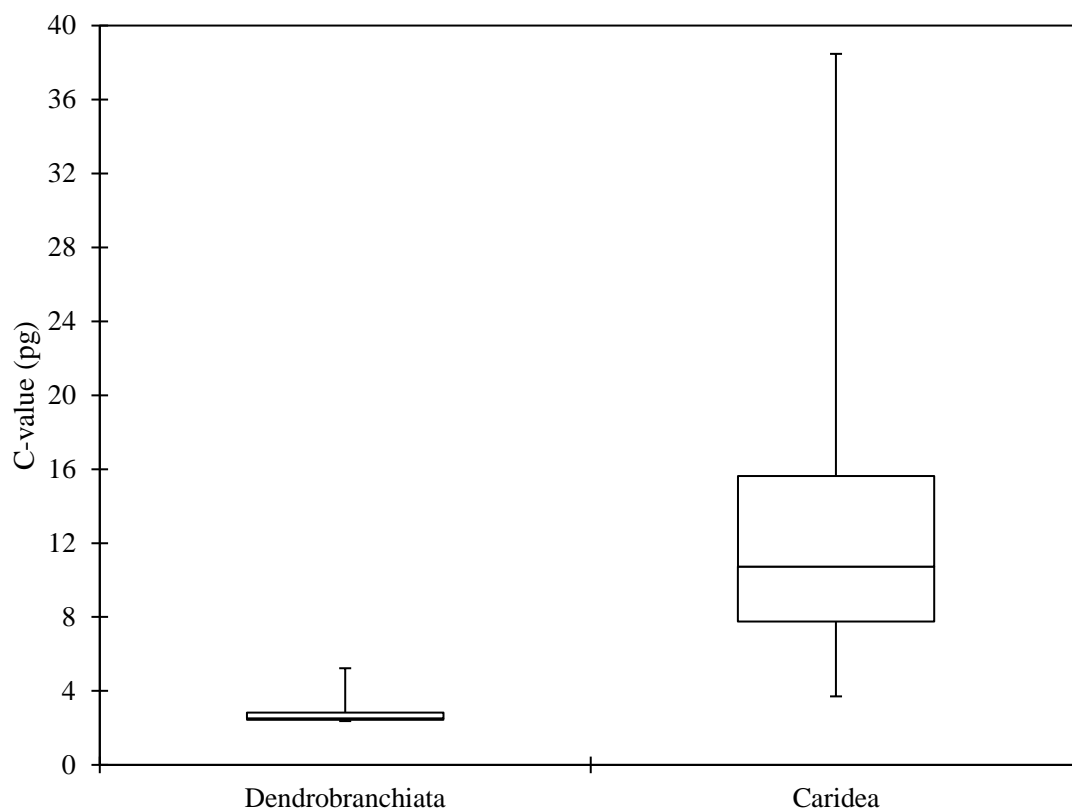


Figura 5. Gráfico BoxPlot comparativo entre o tamanho do genoma divididas em dois grupos de indivíduos: camarões Dendrobranchiata e Caridea. Os dados foram consultados em <https://www.genomesize.com> em 10/08/2023.

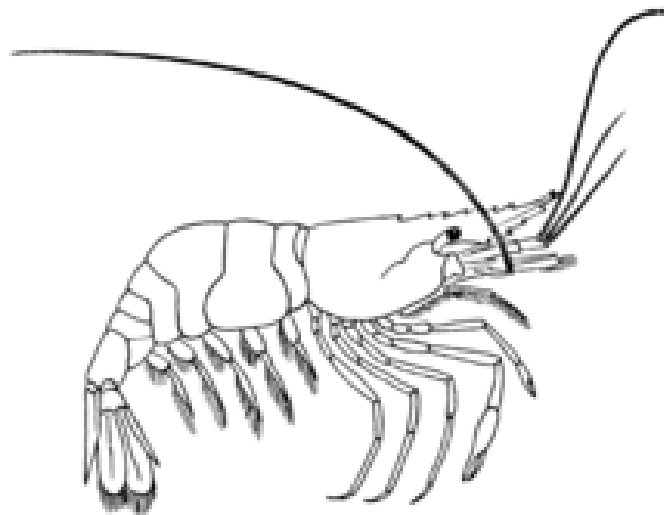
REFERÊNCIAS

- 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. Biología 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, Sevigny 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.