

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

### PROJETO DE REDE INTEGRADA DE PESQUISA MODELO ESTRUTURADO – PROJETO COMPLETO

Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - Desenvolvimento de  
Ações Estratégicas para Políticas em Biodiversidade no âmbito  
do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio)

#### PROJETO DE PESQUISA ASSOCIADO 1

<b>TÍTULO DO PROJETO</b>	<b>Inventário das espécies brasileiras de crustáceos decápodes: diversidade mapeada por meio de análise integrativa</b>
<b>LINHA DE PESQUISA</b>	<b>Linha 8: Rede Costeira Marinha</b>
<b>TEMA CONTEMPLADO</b>	<b>Inventários Biológicos</b>
<b>COORDENADOR</b>	<b>Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto</b>
<b>INSTITUIÇÃO EXECUTORA</b>	<b>Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP)</b>

#### I. Identificação do Coordenador e Instituição Executora

Coordenador: Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto

Instituição Executora: Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP)

#### II. Tema abordado (conforme item 1.4)

Inventários Biológicos

#### III. Informações sobre os membros da equipe e função

##### Coordenador:

Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto – Bolsista Produtividade 1A CNPq - Zoologia, atua desde 2002 nos estudos sobre sistemática filogenética, taxonomia e sistemática sobre vários grupos de crustáceos decápodes. Possui vasta experiência neste tipo de estudo, em particular por ter coordenado 3 grandes projetos temáticos na temática sobre biodiversidade. Atuará na coordenação e execução das atividades de campo. Realização de análises moleculares e morfológicas, identificação e descrição de espécies. Elaboração de relatórios e prestação de contas. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

##### Pesquisadores:

Dr. Fernando J. Zara (UNESP)

Colaborador da proposta e responsável pela linha de Espermiotaxonomia e ultraestrutura que trabalha em sinergia e diretamente ligada a taxonomia molecular. Descrever de maneira integrativa a evolução dos sistemas reprodutores e a ultraestrutura dos espermatozoides em Decapoda e reconstruir os estados ancestrais de caráter dos sistemas reprodutores e do espermatozoide pela

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

integração com a filogenia molecular e assim produzir uma nova abordagem frente ao posicionamento sistemático de diferentes famílias para a maioria da infraordem. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

Dr. Sandro Santos (UFSM)

Colaborador da proposta e com expertise em sistemática e taxonomia molecular e filogeografia de Decapoda. Auxiliará na análise das espécies com distribuição no sul do Brasil. Colaborará com a análise das espécies com ampla distribuição e possíveis conflitos taxonômicos. Estudos filogeográficos e taxonomia tradicional no auxílio para o reconhecimento de novas espécies e de complexos crípticos. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

Dra. Dra. Marlise Ladvocat Bartholomei Santos (UFSM)

Colaborador da proposta e com expertise em sistemática e taxonomia molecular e filogeografia de Decapoda. Colaborará com a análise das espécies com ampla distribuição e possíveis conflitos taxonômicos. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

Dr. Gustavo Teixeira (UEL)

Colaborador da proposta e com expertise em sistemática e taxonomia molecular e filogeografia de Decapoda. Auxiliará na análise das espécies com distribuição no sul do Brasil. Colaborará com a análise das espécies com ampla distribuição e possíveis conflitos taxonômicos. Estudos filogeográficos e taxonomia tradicional no auxílio para o reconhecimento de novas espécies e de complexos crípticos. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

Dr. Harry Boos (ICMBio/CEPSUL/Itajaí/SC)

Coleta de animais da região sul, registro e análise de imagens obtidas com veículo subaquático de operação remota (R.O.V.). Tombamento de parte dos espécimes coletados na Coleção Biológica do CEPSUL. Análise dos dados para o subsídio ao processo de avaliação do risco de extinção das espécies de crustáceos, sendo Ponto Focal do ICMBio neste processo. Encaminhamento das análises geradas para a elaboração de políticas públicas voltadas à conservação da biodiversidade, em especial relacionadas ao ODS 14 - Vida na água.

Dr. Luis E. Bezerra (UFC)

Coleta de animais, com ênfase nas regiões Norte e Nordeste. Com expertise em sistemática e taxonomia morfológica, auxiliará na identificação das espécies. Tombamento de parte dos espécimes coletados na Coleção do LABOMAR. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

Dr. Fulvio Freire (UFRN)

Coleta de animais, com ênfase nas regiões Norte e Nordeste. Com expertise em sistemática e taxonomia morfológica, auxiliará na identificação das espécies de camarões. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

Dr. Emerson C. Mossolin (UFCAT)

Coleta de animais, com ênfase nos estados do Espírito Santo. A expertise em trabalhos de campo o qualificará para coordenar boa parte das Atividades de Campo e Análises Laboratoriais. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

Dr. Felipe B. Ribeiro (USP/FFCLRP)

Será colaborador nas atividades de coleta, e responsável pela identificação e descrição de novos táxons de isópodos parasitas associadas a hospedeiros decápodes da costa brasileira. Além disso, estará responsável diretamente pela redação dos manuscritos relacionados a essa temática que é parte do inventário associado ao táxon alvo. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

Dr. Rogerio Costa (UNESP)

Coleta de animais e ajuda na coordenação. Com expertise em sistemática e taxonomia morfológica, auxiliará na identificação das espécies de camarões. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

Dr. Célio Magalhães (INPA)

Com expertise em sistemática e taxonomia morfológica, auxiliará nas premissas e delineamento da identificação das espécies, a partir de uma vasta experiência com decápodes de água doce. Será responsável pela interlocução e tombamento de parte dos espécimes coletados na Coleção do INPA. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

Dr. Sergio Schwarz da Rocha (UFRB)

Coleta de animais, com ênfase no estado da Bahia. Com expertise em ecologia e zoologia de decápodes, auxiliará na organização das coletas, análise dos dados e redação de conteúdo. Colaboração na elaboração de relatórios e análise dos resultados. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

Dr. Jesser F. Souza Filho (UFPE)

Coleta de animais, com ênfase nas regiões Norte e Nordeste. Com expertise em sistemática e taxonomia morfológica, auxiliará na identificação das espécies. Tombamento de parte dos espécimes coletados na Coleção do MOUFPE onde é o curador. Colaboração na elaboração de relatórios. Redação e revisão de artigos e outros materiais de divulgação dos resultados do projeto.

### **Membros colaboradores**

#### **Pesquisadores Exterior:**

- Prof. Dr. José Luis Antonio Villalobos <https://orcid.org/0000-0001-6810-2300>  
Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Prof. Dr. Ingo S. Wehrmann <http://orcid.org/0000-0002-6826-7938>  
Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, Costa Rica
- Prof. Dr. Luis Miguel Pardo <https://orcid.org/0000-0002-8179-5057>  
Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile
- Prof. Dr. Rafael Robles Reyes <http://lattes.cnpq.br/7619034721167163>  
Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Campeche, México
- Dr. Pedro A. Peres <http://lattes.cnpq.br/9200220262738720>  
Florida International University, Miami, Florida
- Dra. Laura López-Greco <http://lattes.cnpq.br/3594581167453366>  
Universidad de Buenos Aires
- Dr. Christopher C. Tudge  
American University, Washington (DC), EUA

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

Todos esses pesquisadores têm vasta experiência em biodiversidade, alguns deles curadores das coleções científicas das respectivas universidades e colaborarão em análises morfológicas, ultraestrutura, moleculares, em particular sobre aspectos bio e filogeográficos e do genoma. Alguns deles atuarão na descrição, de maneira integrativa, os sistemas reprodutores de Decapoda sob a óptica da microscopia de luz e eletrônica

### **Pós-Doutorandos:**

Dra. Ana Francisca Tamburus (UNESP)  
Dr. Gabriel L. Bochini (USP/FFCLRP)  
Dr. Ronaldo Rui (UFES)  
Dr. Lucas Rezende Penido Paschoal (UNESP)  
Dr. Caio dos Santos Nogueira (UNESP)  
Dra. Maria Alice Garcia Bento (UNESP)  
Dr. Aurinete Oliveira Negromonte (UFPE)

Todos têm ampla experiência comprovada em trabalhos de campo junto às atividades focadas em diversidade de espécies e auxiliarão nas coletas de campo em distintos ambientes; apresentam amplo conhecimento para identificação das espécies; Colaboração na produção de sequências de DNA, identificação e descrição de espécies. Auxílio na descrição integrativa sobre a evolução do sistema reprodutor masculino, espermatozoides, e a implicação desta abordagem frente ao posicionamento sistemático de certas famílias. Auxílio na compilação de dados, elaboração de relatórios, redação e revisão de artigos, e outros materiais de divulgação dos resultados referentes ao projeto.

### **Pós-Graduandos:**

#### **Doutorandos:**

Gislaine Puli (UFMS)  
Gláucia Brisotto (UFMS)  
Jeniffer Natalia Teles (USP/FFCLRP)  
Lucas Oliveira Rogeri (USP/FFCLRP)  
Rodrigo Pantoni (USP/FFCLRP)  
Barbara Paiva Morete (UNESP)  
Priscila Frasado da Silva (UEL)  
Luane Samara Alves e Silva (UEL)

#### **Mestrando:**

Henrique Geremias Silva (USP/FFCLRP)  
Ionara Freitas Silva (UFPE)  
Carlos Eduardo Aragão Neves Xavier (UFPE)

Os pós-graduandos auxiliarão nas coletas de campo, na triagem do material e na identificação das espécies; Colaboração na produção de sequências de DNA (mitocondrial, nuclear e genoma), identificação e descrição de espécies. Auxílio na compilação de dados, elaboração de relatórios, redação e revisão de artigos, e outros materiais de divulgação dos resultados referentes ao projeto.

#### **Graduandos:**

Felipe Cesar Balbino Santos (USP/FFCLRP)  
Aurora Pereira dos Santos (USP/FFCLRP)  
Barbara Cristina Batista Coelho (UNESP)  
Maria Júlia Geraldo Dias (UNESP)  
Bianca Lourenço Figueiredo (UNESP)  
Matheus José Falchi (UNESP)  
Tiago Arantes (UEL)

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

Daiane Marques Almeida (UFRB)  
Joabe da Cruz Carvalho (UFRB)  
Roberto da Silva Dourado Júnior (UFRB)  
Elton dos Santos Freitas (UFRB)  
Virginia Façal Rocha da Costa (UFPE)  
Geycilene Calado Bezerra de Barros (UFPE)

Os graduandos participarão nas atividades de coleta de campo; colaboração nas análises moleculares, triagem de material; auxílio na compilação de dados. Realizar a ultraestrutura comparada dos espermatozoides de várias espécies alvo.

Técnicos/Biólogos:

Bernardo Cerântola (CEPSUL/ICMBio)  
Isadora Valentina Portela Mendes (UEL)  
Marcia Fioreze Mataqueiro (UNESP)  
Fabiola Maria Marques do Couto Cahu (UFPE)  
Jessica Francyne Frias (UFPE)

Coleta de animais, registro e análise de imagens obtidas com veículo subaquático de operação remota (R.O.V.). Tombamento de parte dos espécimes coletados na Coleção Biológica do CEPSUL e MOUFPE. Realização de triagem, análises populacionais, morfológicas, triagem de material. Operar o MEV e análises histológicas e de ultraestrutura.

#### IV. Orçamento detalhado e coerente com a proposta apresentada

O orçamento para esse projeto é expressivo, pois ele é o eixo central e agregador do projeto de rede, e a vasta maioria do material a ser coletado servirá aos demais projetos e também abrigará uma série de atividades que servirão a mais de um projeto. Assim, as atividades de custeio, em particular diárias e passagens, serão os motores de ações para captura das espécies em várias regiões do país. Somam-se a esse montante, com expressiva parcela, as análises moleculares e o sequenciamento genômico, as quais são naturalmente onerosas. Alguns equipamentos estão sendo solicitados para complementar a infraestrutura de alguns laboratórios visando prover as melhores condições para execução das análises e, por consequência, gerar ótimos resultados. O detalhamento foi feito na forma de quadro explicativo para facilitar a leitura objetiva e dinâmica.

#### Orçamento Total do Projeto Inventário

Custeio			
Itens de dispêndio	Valor total estimado	Detalhamento	Justificativa
Diárias	243.200,00	Manutenção com hospedagem, alimentação e deslocamento da equipe durante a realização das atividades de coleta de dados em campo em diferentes áreas do litoral brasileiro;	Atividade de coleta de dados constituem a essência do projeto. Novas amostragens para aquisição de material biológico são essenciais. Assim, as diárias serão utilizadas para a manutenção das equipes durante a realização de diversas campanhas de coleta. Os valores praticados são aqueles calculados para permitir a permanência dos participantes para realização das atividades em tempo mínimo.
Material de		Reagentes essenciais para a	Reagentes (álcool etílico 96%) para

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

consumo	173.000,00	conservação das amostras de plâncton; reagentes para as análises de DNA (Barcoding, primers, Dntp, periféricos, diversos) utilizado na rotina molecular (técnicas de extração, PCR); filtros de água ultrapura;	fixação e conservação dos animais amostrados. Reagentes necessários para execução das etapas de rotina nas análises moleculares envolvendo extração de DNA de tecido, amplificação por PCR, purificação para sequenciamento. Água ultrapura é utilizada em várias etapas.
Passagens	124.000,00	Visitas a coleções científicas; deslocamentos de equipes para atividades de coleta nas diferentes áreas do litoral brasileiro; deslocamento para reuniões e avaliações; participação em congressos	Necessidade de visita para comparações morfológicas com material de série tipológica e outros depositados em diferentes coleções científicas; participação em atividades de coletas de campo nas diferentes áreas do litoral brasileiro, principalmente onde o deslocamento viário é impraticável; Divulgação dos resultados do projeto.
Serviços de terceiros	270.000,00	Manutenção corretiva de equipamentos; sequenciamento de amostras de DNA por sanger, barcoding e genômico; aluguel de embarcação para coleta de material biológico	Manutenção de equipamentos de análise molecular e de microscopia ótica e ultraestrutura, os quais já fazem parte dos acervos, mas regularmente requerem manutenção; Pagamento de serviços de terceiros, pessoa física ou jurídica, de caráter eventual para purificação e sequenciamento de amostras de DNA e de aluguel de embarcação para a coleta do material biológico
<b>Custeio Total</b>	<b>810.200,00</b>		

<b>Capital</b>				
Itens de dispêndio	Quantidade	Valor estimado	Detalhamento	Justificativa
Equipamentos e Material permanente	1	71.000,00	Termociclador para reações de PCR	Ampliar a capacidade do Laboratório de Carcinologia e Diversidade Genética / UFSM para processamento de amostras biológicas para sequenciamento de DNA, que serão utilizadas nos estudos.
	1	35.000,00	QU - BIT FLEX – Fluorômetro Qubit™ 4, com WiFi	Equipamento para quantificação de DNA, RNA, para análises genômicas no LBSC da USP

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

	2	30.000,00	Câmeras fotográficas para Microscópio trinocular marca Leica, modelo DME, modelo DME série NV005 e Estereomicroscópio trinocular marca Carl Zeiss modelo Stemi 2000C, com software de análise e tratamento de imagens	Equipamento necessário para registros de imagens nos estudos sobre diversidade e morfologia (Taxonomia e sistemática) de crustáceos no laboratório de Carcinologia da MOUFPE.
	3	75.000,00	Estereomicroscópios com mecanismo de zoom com cinco etapas fixas de zoom, em 6,3x, 10x, 16x, 25x e 40x	Equipamento óptico necessário para rotina de análise de caracteres morfológicos, fundamental para análise das amostras de plâncton, identificação e descrição de formas adultas e juvenis. Atender as necessidades dos laboratórios da UFCAT, UEL e UNESP
	1	63.280,00	Microscópio com câmara clara; de 4X (N.A. 0,10/ W.D. 30 mm); 10X (N.A. 0,25/ W.D. 7 mm), 40X retrátil (N.A. 0,65/ W.D. 0,65 mm),	Equipamento optico necessário para rotina de análise da morfologia de caracteres, fundamental para análise das amostras de plâncton, identificação e descrição de formas larvais; ilustração e descrição dos espécimes de parasitas coletados. Atender as necessidades do laboratório da USP
<b>Capital Total</b>	<b>274.280,00</b>			

<b>Bolsas</b>					
Modalidade	Duração (meses)	Quantidade	Valor unitário	Valor total	Justificativa
	12	1	700,00	8.400,00	Bolsa ITI-A: (R\$

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

					700,00/mês) por 1 ano. Auxílio em atividades de campo e laboratoriais. Atender as demandas de recursos humanos de dois laboratórios da USP
	24	2	5.850,00	280.800,00	Bolsa SET-C: (R\$ 5.580,00/mês) por 2 anos para auxílio em atividades de campo e laboratoriais. Treinamento de recursos humanos. Atender as demandas de recursos humanos dos laboratórios da USP, UNESP
<b>Bolsas Total</b>	<b>288.400,00</b>				

**TOTAL GERAL R\$ 1.343.680,00**

### V. Dados gerais do projeto em português e inglês, incluindo título, palavras-chave, resumo e objetivo geral

**Título:** Inventário das espécies brasileiras de crustáceos decápodes: diversidade mapeada por meio de análise integrativa

**Palavras-Chave:** Análise molecular, Espermiotaxonomia, Espermatozoide, Filogenia, Histologia, Microscopia eletrônica, Morfologia, Sistemática, Taxonomia, Ultraestrutura

**Resumo:** O eixo deste projeto 1, envolvendo a taxonomia e a sistemática filogenética dos crustáceos decápodes baseada na integração entre dados morfológicos (taxonomia alfa e ultraestrutura reprodutiva) e moleculares (sequências de DNA mitocondrial, nuclear e genômica), constitui o pilar para o funcionamento e integração dos demais eixos da proposta de rede em seus mais variados aspectos. A taxonomia e sistemática constituem o alicerce para a ciência moderna e, em particular, o cerne deste projeto que visa a melhoria e ampliação sobre o conhecimento da biodiversidade e dos padrões e processos evolutivos dos crustáceos decápodes, em particular os habitantes da fauna brasileira. A combinação dessas ferramentas tem se comprovado como uma aliada, em alguns casos de vital importância, para o avanço do conhecimento em distintas áreas e, em particular, para a biodiversidade. Além deste contexto integrador, o eixo desse projeto associado será composto por algumas especificidades que, em sua essência, buscarão trazer um refinamento do conhecimento acerca da biodiversidade de crustáceos decápodes do Brasil. De maneira objetiva, pretende-se aprofundar o uso destas técnicas usando como modelo de interesse alguns grupos marinhos buscando aspectos evolutivos nunca estudados para a fauna brasileira (genômica) e que podem indicar estruturas populacionais, eventos de especiação e escala aplicada utilizados em conservação e repovoamento. Esta combinação de técnicas visa à elaboração de um inventário atualizado e construído sob um rigor taxonômico das espécies de crustáceos decápodes do Brasil, respaldado por uma biblioteca genômica (*Barcoding*) e uma coleção científica de referência com dados catalogados em acervos *on-line*. Adicionalmente, o presente projeto pretende trabalhar, também em duas frentes morfológicas distintas, sempre integrando a filogenia molecular como fio condutor. A primeira será a ultraestrutura dos

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

espermatozoides (espermiotaxonomia), espermatóforos e estruturas copulatórias (gonóporos, gonópodos, petasma e apêndice masculino) de diferentes espécies marinhas, estuarinas e de água doce. Esta frente contribuirá para o entendimento das relações de parentesco entre decápodes, sendo uma ferramenta diretamente relacionada à taxonomia/sistemática. Ao final, teremos uma biblioteca da ultraestrutura dos espermatozoides dos decápodes brasileiros, a qual será associada à biblioteca genômica “barcode”. Assim, tais dados serão associados com as ferramentas morfológicas e moleculares. Esta integração entre diferentes ferramentas na solução de problemas taxonômicos vem se mostrando bastante profícua e com resultados promissores concretizados em recentes publicações dos membros desta proposta temática, em sinergia com a taxonomia moderna. A segunda frente pretende estudar a morfologia funcional do sistema reprodutor masculino e das estruturas de armazenamento espermático como tético (Dendrobranchiata), esterno (Anomura, Astacidea, Caridea) e receptáculo seminal (Eubrachyura) ou espermateca (Podotremata). Por meio da anatomia, histologia e histoquímica pretendemos buscar padrões de evolução do sistema reprodutor masculino (e suas glândulas) além de uma abordagem ampla para os padrões de transferência e armazenamento espermático em espécies formadoras de plug espermático ou não, por meio de micro tomografia. Assim, pretendemos entender como a morfologia funcional foi modificada pelas relações de parentesco. Desta maneira, produziremos informações que serão utilizadas em análises taxonômicas sobre a biodiversidade e, também, informações biológicas básicas para a reprodução e consequente preservação e manejo das espécies.

**Objetivo Geral:** Utilizar a combinação de ferramentas modernas e de alto poder de resolução para mapear e identificar a diversidade de crustáceos decápodes marinhos do litoral brasileiro. Com a ajuda de morfologia, moléculas e ultraestrutura, contar a história evolutiva, padrões biogeográficos e inserção evolutivo para Decapoda habitante da diversidade do Brasil, transformando o país em uma referência mundial sobre o conhecimento da diversidade de decápodes em termos de inventário suportado por uma biblioteca genômica e com caracteres morfo-ultraestruturais. O conjunto desse conhecimento atualizado trará amplo suporte para várias áreas do conhecimento que utilizam esse táxon.

**Title:** Inventário das espécies brasileiras de crustáceos decápodes: diversidade mapeada por meio de análise integrativa

**Keywords:** Análise molecular, Espermiotaxonomia, Espermatozoide, Filogenia, Histologia, Microscopia eletrônica, Morfologia, Sistemática, Taxonomia, Ultraestrutura

**Abstract:** The axis of this project 1, involving the taxonomy and phylogenetic systematics of decapod crustaceans based on the integration between morphological (alpha taxonomy and reproductive ultrastructure) and molecular (mitochondrial, nuclear and genomic DNA sequences) data, constitutes the pillar for the functioning and integration of the other axes of the proposed network in its most varied aspects. Taxonomy and systematics constitute the foundation for modern science and, in particular, the core of this project that aims to improve and expand knowledge of biodiversity and the patterns and evolutionary processes of decapod crustaceans, in particular the inhabitants of the Brazilian fauna. The combination of these tools has proven to be an ally, in some cases of vital importance, for the advancement of knowledge in different areas and, in particular, for biodiversity. In addition to this integrating context, the axis of this associated project will consist of

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

some specificities that, in essence, will seek to bring a refinement of knowledge about the biodiversity of decapod crustaceans in Brazil. Objectively, it is intended to deepen the use of these techniques using as a model of interest some of the marine groups seeking evolutionary aspects never studied for the Brazilian fauna (as genomics) and that may indicate population structures, speciation events and applied scale used in conservation and restocking. This combination of techniques aims to create an up-to-date inventory based on taxonomic rigor for decapod crustacean species in Brazil, supported by a genomic library (Barcoding) and a scientific reference collection with data cataloged in online collections. Additionally, the present project aims to work on two distinct morphological fronts, always integrating molecular phylogeny as a guiding principle. The first will focus on the ultrastructure of spermatozoa (spermiotaxonomy), spermatophores, and copulatory structures (gonopores, gonopods, petasma, and male appendage) of different marine, estuarine, and freshwater species. This approach will contribute to the understanding of kinship relations among decapods, serving as a tool directly related to taxonomy/systematics. Ultimately, we will establish a library of the ultrastructure of spermatozoa from Brazilian decapods, which will be linked to the genomic "barcode" library. Thus, these data will be combined with morphological and molecular tools. This integration of different tools to solve taxonomic problems has proven to be highly productive, yielding promising results as evidenced in recent publications by the members of this thematic proposal, in synergy with modern taxonomy. The second front aims to study the functional morphology of the male reproductive system and sperm storage structures such as the telic (Dendrobranchiata), sternum (Anomura, Astacidea, Caridea), seminal receptacle (Eubranchyura), or spermatheca (Podotremata). Through anatomy, histology, and histochemistry, we intend to identify patterns of evolution in the male reproductive system (and its glands), as well as a comprehensive approach to sperm transfer and storage patterns in species that form sperm plugs or not, using microtomography. In this way, we seek to understand how functional morphology has been modified by kinship relations. Thus, we will produce information that will be used in taxonomic analyses of biodiversity and also provide fundamental biological insights for the reproduction, preservation, and management of species.

**General Objectives:** Use a combination of modern tools and high-resolution power to identify the diversity of marine decapod crustaceans along the Brazilian coast. With the help of morphology, molecules and ultrastructure, we intend to know the evolutionary history, biogeographical patterns and evolutionary insertion for Decapoda inhabitant of the diversity of Brazil, transforming the country into a world reference on the knowledge of the diversity of decapods in terms of inventory supported by a library genomic and morpho-ultrastructural characters. The set of this updated knowledge will provide broad support for several areas of knowledge that use this taxon.

### VI. Relevância e impacto do projeto para o PPBio

O projeto proposto envolve a articulação de competências regionais para o estudo da taxonomia e sistemática, áreas consideradas base para o conhecimento sobre a biodiversidade e os ecossistemas brasileiros. O conceito ancorado no uso de um táxon para nortear a rede de ação ampliada para várias IESs é uma estratégia promissora e será implementada de forma planejada e gradativa, tendo como base experiências anteriores bem-sucedidas.

A proposta tem em sua essência as premissas do PPBio, i.e., avaliar a diversidade taxonômica, genética populacional, aspectos evolutivos, e a compreensão dos padrões de distribuição. A inclusão de informações taxonômicas e as relações filogenéticas e evolutivas nos estudos sobre biodiversidade tem se mostrado com um dos aspectos relevantes para auxiliar na

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

definição das políticas públicas de conservação, bem como para determinar ações de manejo em cativeiro e em vida livre, visando assim o uso dos recursos naturais de forma sustentável. O valor preditivo da filogenia facilita a exploração da diversidade genética. Conhecer a diversidade genética, com representantes de diferentes linhagens da árvore evolutiva, é ferramenta fundamental no estabelecimento dos princípios norteadores na coleta de espécies silvestres, aparentadas às espécies cultivadas de interesse econômico, e seu uso em programas de melhoramento genético.

Dessa forma cria-se um vínculo entre a sistemática e as políticas de conservação vigentes, sendo que a resolução de problemas de cunho sistemático bem como a validação de espécies pode contribuir para políticas de conservação mais sólidas. Finalmente, a construção de um inventário, com amparo da genômica, colocará o país na vanguarda do conhecimento sobre a biodiversidade e servirá de modelo para outros programas em nível internacional.

Certamente, a relevância e o impacto do projeto para o PPBio residem na forma de análise e geração de dados. Um pouco da importância desses métodos é relatado a seguir.

### *Caracterização da ferramenta barcoding e aplicabilidade na taxonomia*

A utilização de informações moleculares em estudos filogenéticos e taxonômicos é, sem dúvida, um dos mais crescentes e interessantes caminhos para a sistemática atual (Martin & Davis 2001, Martin et al. 2009). A obtenção de informações sobre o DNA já se consolidou como uma importante ferramenta na resolução de relações sistemáticas, em situações nas quais apenas o uso de dados morfológicos não é suficiente. Da mesma forma, a metodologia molecular tem sido satisfatoriamente utilizada na validação de espécies, no estudo de espécies crípticas e em estudos sobre relações filogeográficas intra e interespecíficas, incluindo diversos táxons de crustáceos decápodes marinhos que contam com importantes aportes feitos pelo grupo proponente do LBSC (Mantelatto et al. 2007 e 2009, Negri et al. 2012, 2014, Rossi & Mantelatto 2013; Magalhães et al. 2016b, Tamburus & Mantelatto 2021, Terossi et al. 2017, Negri et al. 2018, Vera-Silva & Mantelatto 2022, Mantelatto et al. 2023).

A adoção da abordagem morfológica tradicional para a identificação de espécies, apesar de ser bastante confiável, apresenta limitações. A plasticidade fenotípica e a variabilidade genética nos caracteres empregados para o reconhecimento de espécies podem induzir a erros de identificação, assim como as chaves morfológicas que frequentemente são construídas a partir de um determinado estágio de vida do animal. As limitações apontadas no sistema de identificação tradicional e a escassez de taxonomistas especializados nos diferentes grupos de organismos evidenciam a necessidade de utilização de novas ferramentas para identificação dos táxons.

A técnica conhecida como DNA barcoding consiste na caracterização de espécies por meio da análise de sequências curtas de DNA produzidas de forma rápida e com custo factível (Hebert et al. 2003a, Blaxter 2004), o que a torna importante para estudos sobre a biodiversidade. Atualmente, uma parte do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade 1 (COI), normalmente composta de 650 nucleotídeos, tem sido utilizada como região padrão de barcode para muitas espécies de metazoários (Hebert et al. 2003b, Ward et al. 2005, Johnsen et al. 2010). A escolha de um gene mitocondrial baseia-se no alto número de cópias por célula e em outras características peculiares, tais como herança uni parental, taxas evolutivas rápidas, em comparação com o genoma nuclear, ausência de recombinação e a presença de sequências bastante conservadas (Schubart et al. 2000, Calcagnotto 2001). Exceto para cnidários, a maioria das espécies congêneres animais apresentam taxa de divergência no gene COI suficiente para possibilitar a identificação das espécies através de DNA barcoding (Hebert et al. 2003b). De 1781 pares de

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

espécies congêneres de crustáceos analisados quanto ao gene COI, 98,4% apresentaram mais de 2% de taxa divergência entre si, sendo que 63,8% divergiram de 16 a 32% (Hebert et al. 2003b).

Até alguns anos atrás, a técnica de DNA barcoding tinha sido utilizada com sucesso em estudos de mapeamento apenas para peixes e aves. O All Birds Barcoding Initiative (ABBI) e o Fish Barcode of Life Initiative (Fish-BOL) pretendem montar um arquivo de todas as espécies com seus respectivos códigos de barras de DNA. Da mesma forma, esforços para a catalogação de espécies fósseis estão sendo realizadas (Lambert et al. 2005). Problemas quanto à identidade taxonômica de espécimes em diferentes estágios de desenvolvimento, quanto à identidade taxonômica de espécimes com fins comerciais a fim de evitarem-se fraudes, ou para identificação de espécies ameaçadas de extinção, espécies invasoras, espécies pragas, ou mesmo para evitar a biopirataria, poderão ser equacionadas a partir desta base de dados (Armstrong & Ball 2005, Hebert et al. 2003<sup>a</sup>, Janzen et al. 2005, Vences et al. 2005).

Dessa forma, a implementação do uso do DNA Barcoding visa, além da facilidade na identificação taxonômica, ampliar o acesso à informação de forma precisa, além de uma aplicabilidade em amplo espectro filogenético e taxonômico, incluindo muitas espécies não descritas, como é o caso dos decápodes marinhos. Portanto, a tendência atual indica uma integração da informação molecular com a taxonomia tradicional para um maior e melhor conhecimento da biodiversidade do planeta.

Diversos grupos de pesquisa participam de um esforço internacional para estabelecer a técnica de DNA barcoding como padrão global para o estudo da biodiversidade. A FAPESP e o CNPq, por meio da promoção de Chamadas/Editais Específicos, além de Simpósios específicos sobre DNA Barcoding, efetivaram a entrada da comunidade científica brasileira no cenário mundial, por meio de discussões dos avanços e dos rumos da técnica de DNA barcoding. Como resultado, ficou definida a urgência da entrada do Brasil no projeto mundial de DNA barcoding, de forma ampla e efetiva, pelo fato do país possuir uma enorme diversidade biológica. Esta sinalização vinda da FAPESP e do CNPq no âmbito do PPBio constitui um dos motivadores para a elaboração da presente proposta.

### *Introdução da Genômica em crustáceos decápodes e aplicabilidade*

Estudos genômicos estão superando os métodos de Sanger em investigações moleculares devido a custo, volume de dados e tempo (Bravo et al. 2019, Zhang et al. 2019). A fusão de sequenciamento de DNA de alto rendimento e avanços computacionais revoluciona a biologia, especialmente a evolutiva, na era de BigData (Andermann et al. 2020). Isso aprimorou o entendimento da "Árvore da Vida", abrangendo seres vivos (Hug et al. 2016) e extintos (Green et al. 2010). Atualmente existem métodos de subamostragem genômica, mais eficientes em custo e complexidade que o sequenciamento completo (Andermann et al. 2020). Dois principais métodos são a subamostragem baseada em enzimas de restrição, RAD-seq (Miller et al. 2007), e a captura de alvos (Gnirke et al. 2009).

Double Digest RADseq é uma variação do RADseq original, desenvolvida para viabilizar a genotipagem de alta escala de diversos loci em todo o genoma. O processo de ddRADseq envolve duas fases de digestão enzimática do DNA genômico, usando enzimas de restrição que fragmentam o DNA em locais específicos de reconhecimento, gerando segmentos com pontos iniciais conhecidos (Peterson et al. 2012). Isso resulta na obtenção de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) como marcador molecular. Os SNPs são posições no DNA genômico onde existem diferentes variantes de sequência (Brookes 1999). Comparados com outros marcadores, os SNPs permitem um acesso direto à variação da sequência, reduzindo erros de

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

genotipagem, proporcionando uma estratégia eficaz, de alto rendimento e economia (Brookes 1999; Aguirre et al. 2019). Como resultado, várias áreas de pesquisa têm adotado essa técnica para aprofundar a compreensão da biodiversidade, como genômica populacional (Carlos et al. 2017, Timm et al. 2020), filogeografia (Peres et al., 2022; Rittmeyer et al. 2021), genômica da conservação (Amor et al. 2020, Benestan 2020) e outras áreas (Maroso et al. 2018, Amor et al. 2019).

O método de captura de alvo é muito utilizado, pois seleciona regiões genômicas específicas, como aquelas de interesse evolutivo (Andermann et al. 2020). Essa técnica economiza tempo e recursos, direcionando a maioria do sequenciamento para tais áreas, ao invés de cobrir todo o genoma. Além disso, utiliza Elementos Nucleares Ultraconservados (UCEs) como marcadores genéticos, permitindo análises filogenômicas em escala expressiva (> 500 loci) (Faircloth et al. 2012). A alta conservação dos UCEs facilita a identificação e o alinhamento em genomas diferentes; esses elementos são amplamente distribuídos (Stephen et al. 2008). O uso dos UCEs possibilita a análise de loci similares entre espécies de grupos taxonômicos diversos (Petersen et al. 2022). Este método genômico predomina em estudos de sistemática filogenética e evolução, em grupos marinhos (Bernot et al. 2022, Petersen et al. 2022, Geburzi et al. 2023) e terrestres (Andersen et al. 2019, Gustafson et al. 2020, Muell et al. 2022).

A genômica na conservação assume um papel fundamental ao identificar regiões do genoma responsáveis pela adaptação local, essenciais para a preservação e contribui para investigações ecológicas, como a estimativa populacional (McMahon et al. 2014). Dados genômicos de um único indivíduo podem fornecer insights valiosos sobre espécies ameaçadas, especialmente após mudanças na dinâmica populacional (McMahon et al. 2014). Para compreender a estrutura de populações de organismos marinhos dispersos, estudos genômicos frequentemente utilizam milhares de loci SNP abrangendo todo o genoma, isso permite análises detalhadas e detecção de sinais de seleção (Lal et al. 2016). Essas informações são cruciais para iniciativas de conservação e gerenciamento de estoques e são fundamentais para mapeamento genômico e estudos de associação ampla do genoma (Lal et al. 2016). Análises genômicas populacionais enriquecem marcadores e viabilizam estimativas precisas de estruturas populacionais e parâmetros demográficos (Primmer 2009). Além disso, elas facilitam a detecção de variação genética adaptativa, auxiliando na definição de áreas de conservação (Funk et al. 2012) e estratégias de mitigação de impactos das mudanças climáticas na biodiversidade (Hoffmann et al. 2015).

Uma preocupação global contemporânea, constantemente sob investigação, envolve os impactos do aquecimento global e da acidificação dos oceanos, resultados do aumento de CO<sub>2</sub> na atmosfera (Duarte et al. 2015). A compreensão dos padrões de diversidade genética em organismos marinhos é de suma importância, uma vez que o genoma de espécies oceânicas está sujeito a modificações devido a uma gama complexa de influências antrópicas (Blasiak et al. 2020). A perda dessa diversidade emerge como um tema central na genética da conservação, que também preconiza estratégias para preservar as espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptar a transformações no ambiente (Frankham et al. 2008).

Como já ressaltado no Projeto de Rede, crustáceos decápodes incluem uma variedade de táxons de relevância econômica, como recursos alimentares, organismos incrustantes, espécies-chave e modelos biológicos para pesquisa (Martin & Davis 2001, Bernot et al. 2022). Apesar de serem um grupo de invertebrados com várias espécies essenciais para a aquicultura, os crustáceos ainda estão consideravelmente atrás em termos de uso da genômica, em comparação com outros animais (Yuan et al. 2023). A ausência de recursos genômicos específicos para

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

crustáceos tem dificultado a pesquisa no âmbito do genoma, evolução fenotípica, filogeografia e construção de filogenias robustas (GIGA 2014, Bernot et al. 2022, Bernot et al. 2023, Yuan et al. 2023).

No Brasil, a aplicação de dados genômicos em estudos da biodiversidade de decápodes é escassa ou praticamente inexistente, o que dificulta as comparações com outros grupos e a compreensão das espécies nativas do país. Nesse contexto, tornam-se particularmente relevantes e urgentes pesquisas dessa natureza, especialmente diante das atuais mudanças climáticas globais e desafios de conservação da biodiversidade. Aprofundar nosso entendimento sobre a genômica desses organismos pode ser instrumental para identificar populações de crustáceos geneticamente distintas, valendo-se de um amplo espectro de informações genéticas, o que se revela crucial para a gestão e conservação dessas espécies. A abordagem genômica permite a detecção de populações ameaçadas ou com características genéticas singulares, contribuindo para a formulação, implementação e monitoramento de medidas conservacionistas.

Diante desse contexto, vislumbramos na execução desse projeto, a oportunidade inédita para protagonizar a vanguarda do conhecimento em genômica utilizando o táxon alvo como modelo de estudo. Esse será um dos tópicos de maior relevância e impacto para a ciência brasileira e dentro do PPBio.

### VII. Objetivos específicos, metas e indicadores da proposta

#### Objetivos específicos

- 1) Realizar análise morfológica acurada das espécies de decápodes coletadas no território nacional, com ênfase nos ermitões, camarões e caranguejos de ambientes marinhos, de forma a obter uma alta precisão taxonômica para a confecção de um futuro inventário completo e com base filogenética atual.
- 2) Avaliar a presença de isópodos parasitas em hospedeiros decápodes da costa brasileira, com a descrição de novos táxons e expansão da distribuição de táxons já registrados no Brasil, considerando a carência de estudos sobre essa relação.
- 3) Obtenção de sequências parciais dos genes 16S e COI<sub>mt</sub> das espécies de decápodes do território brasileiro, construindo uma biblioteca genômica da fauna de decápodes. Mapear espécies potencialmente importantes para obtenção de sequências genômicas.
- 4) Realizar análise combinada entre os resultados obtidos nas análises morfológica e molecular, elaborando uma revisão taxonômica completa e consistente.
- 5) Construção de um inventário da biodiversidade dos crustáceos decápodes do Brasil. Esse, de forma inédita será acompanhado de um inventário de códigos de barra genético. Tais elementos trarão subsídios para futuros estudos filogenéticos, filogeográficos e de conservação.
- 6) Realizar abordagens em macro escalas sobre padrões e processos evolutivos em grupos de decápodes com potencial para elucidação de questões importantes para conservação da biodiversidade e mudanças climáticas.
- 7) Realizar uma análise morfológica apurada da ultraestrutura do espermatozoide de espécies de decápodes marinhos do Brasil, cobrindo as cinco Ecorregiões costeira, de forma a obter uma alta precisão taxonômica para a confecção do inventário de espécies associado à filogenética atual.
- 8) Realizar uma análise combinada entre os resultados obtidos nas análises da ultraestrutura do espermatozoide, espermatóforos e estruturas de transferência (gonóporos, gonópodos, petasma e apêndice masculino) com a análise molecular, elaborando uma matriz de

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

características taxonômicas mais completa e consistente, com o objetivo de esclarecer as relações de parentesco em diferentes grupos.

- 9) Produzir uma análise combinada entre a histologia e a ultraestrutura para compreender os padrões de espermatogênese relacionado a classificação do testículo nos diferentes grupos de decápodes, utilizando como modelo a biodiversidade brasileira.
- 10) Produzir um estudo comparativo detalhado do vaso deferente e seus mecanismos de montagem do espermátforo. Além disso e, principalmente, o estudo das glândulas acessórias e vaso deferente, quanto a posição anatômica, histologia e composição química em decápodes, com ênfase para espécies produtoras de tampão (plug) espermático e não formadoras, formadoras de estratos espermáticos e não formadoras procurando rastrear se tais características anatômicas estão mais ligadas à estratégia reprodutiva de transferência ou à filogenia.
- 11) Realizar um estudo detalhado das estruturas de armazenamento espermático temporário (esterno das fêmeas) ou de longo prazo (télico, espermateca e receptáculo seminal), com a introdução da moderna ferramenta de nanocrotomografia computadorizada. Adicionalmente, este objetivo permitirá entender os locais e os mecanismos de fertilização para os diferentes grupos utilizando como modelo a biodiversidade de Decapoda brasileira.

### Metas:

1. Será especialmente promissor para o treinamento de novos estudantes em diferentes níveis a partir de subprojetos desenvolvidos dentro do projeto hora pleiteado, considerando-se a necessidade de formar especialistas com conhecimento em biodiversidade utilizando a taxonomia integrada sobre crustáceos decápodes, tendo em vista a incrível riqueza de espécies e uma das maiores biodiversidades do planeta.
2. Formar recursos humanos em biodiversidade para atuação em coleções biológicas, inventários, revisões taxonômicas e outras ações que exijam conhecimentos especializados, visando assim ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade brasileira.
3. Promover o intercâmbio de estudantes e pesquisadores entre os diferentes laboratórios, gerando uma atmosfera internacional que visa o crescimento pessoal e intelectual a partir de novas experiências adquiridas na rotina de trabalho de cada instituição de pesquisa.
4. Apesar deste promissor cenário, as informações biológicas disponíveis sobre a diversidade deste grupo estão desatualizadas e incompletas para a fauna brasileira, onde nós estamos aptos a coletar e trabalhar sob autorização federal, contribuindo legalmente para o conhecimento da biodiversidade.
5. Neste sentido, estabelecer e sedimentar trabalhos promissores de uma rede de cooperação nacional e internacional com pesquisadores de diferentes instituições é uma ação estratégica para a melhoria do conhecimento sobre os problemas deste cenário.
6. Ampliar a capacidade para a Ciência em taxonomia instalada no País para aplicação na base do conhecimento da biodiversidade brasileira e da política de biodiversidade.
7. A inclusão da sequência de DNA destes crustáceos decápodes nos bancos de dados de Barcode proporcionará para qualquer pesquisador identificar espécies a partir de ovos, larvas, juvenis e fragmentos de animais que não poderiam ser identificados pelos métodos de morfologia usuais e, portanto, terá uma serventia mundial.
8. A identidade taxonômica de espécimes brasileiras com fins comerciais ou não poderão ser checadas para evitar fraudes, ou ainda para a identificação de espécies ameaçadas de extinção,

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

espécies invasoras, espécies pragas, ou mesmo para evitar a biopirataria. Ou seja, a aplicabilidade em todas essas áreas poderá ser utilizada a partir desta base de dados

Os indicadores serão mensurados por meio do sucesso das metas estabelecidas, as quais serão avaliadas a cada reunião anual sobre o andamento.

### VIII. Metodologia

#### *Metodologia Geral de Coleta*

O detalhamento desta parte segue o que foi informado no projeto de rede. Em resumo, as coletas de campo serão efetuadas de forma exploratória em todos os ambientes da região costeira marinha. Parte destas amostragens terá como foco áreas específicas, enquanto outras amostragens serão geograficamente mais amplas no intuito de focar na diversidade, visando à obtenção do maior número de representantes de diversas espécies e de exemplares frescos para o mapeamento da biodiversidade baseado em análises morfológicas e moleculares. A preservação dos espécimes capturados também será feita de acordo com a finalidade, sendo que exemplares para análise taxonômica/molecular serão preservados em álcool etílico, enquanto os exemplares para análises da ultraestrutura do sistema reprodutor serão criossecionados após a coleta e dissecados na sequência. Quanto a identificação dos isópodes parasitas, os hospedeiros serão observados e quando parasitados são geralmente percebidos pela presença de deformidades na câmara branquial ou a própria presença dos parasitas no pleon. A identificação será feita com base na literatura e expertise dos pesquisadores. Todos os exemplares serão tombados nas coleções científicas de referência já citadas no projeto de rede.

#### *Procedimentos gerais para o estudo taxonômico e molecular*

Revisão Morfológica: Com base na literatura existente (vide caracterização do táxon no projeto de rede) serão analisadas as principais características morfológicas de cada espécie alvo. Além de caracteres tradicionalmente utilizado em cada táxon, novos caracteres poderão ser incluídos a partir do estudo comparativo da morfologia dos indivíduos coletados e também aqueles depositados nas coleções carcinológicas mencionadas, incluindo os espécimes-tipos. Técnicas específicas, como MEV, ME e nanotomografia por CT-Scan poderão ser utilizadas para visualização de detalhes morfológicos de relevância taxonômica.

Obtenção dos dados moleculares: O DNA genômico total será obtido a partir dos tecidos musculares abdominais ou dos quelípodos. O protocolo de extração dos espécimes frescos e/ou fixados apenas em etanol 70-80% será baseado nos trabalhos de Mantelatto et al. (2006, 2007, 2009a e b, 2018b), com as devidas modificações apontadas em Pileggi & Mantelatto (2010), ou aos diferentes táxons. O DNA extraído será quantificado por espectrofotometria (Nano Drop®) em leitura de densidade óptica. A amplificação do DNA será feita por reação de PCR (Polimerase Chain Reaction) em termociclador Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler®. A amplificação será realizada utilizando-se primers específicos previamente testados. Os seguintes conjuntos de primers serão usados: 16Sar e 16Sbr e COIa e COIf (Barcoding) para os genes mitocondriais (Palumbi & Benzie 1991). Os resultados das PCRs serão observados no processo eletroforético em gel de agarose 1,5% e registrados em fotodocumentador L-Pix EX® Loccus, com iluminação ultravioleta. O material genético resultante da amplificação será purificado via kits SureClean Plus® ou Cellco®, seguindo os protocolos dos fabricantes. O sequenciamento Sanger será realizado em um sequenciador automatizado ABI Prism 3100 Genetic Analyzer® (Applied

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

Biosystems automated sequencer) por meio do kit de reação ABI Big Dye® Terminator Mix (PE Biosystems). As sequências obtidas serão inseridas no programa Geneious Prime versões 2022.0.1 e 2022.2.2 (Kearse et al. 2012) para obtenção de sequências consenso (*De novo* assembling). A qualidade das sequências será aferida com base nos parâmetros fornecidos pelo programa. Após a edição, serão comparadas com as sequências depositadas na base de dados GenBank (NCBI), por meio da ferramenta de procura de sequências, o BLASTn® (Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.shtml>).

Para análise genômica, os protocolos seguirão as diretrizes de Peres et al. (2023). Em resumo serão preparadas bibliotecas RADseq de digestão dupla de acordo com o método ddRADseq (Peterson et al. 2012). O DNA de todos os indivíduos será digerido com uma combinação de NlaIII e NotI (New England Biolabs) após testes de enzimas para determinar o melhor conjunto de enzimas. Após a digestão, adaptadores de código de barras personalizados serão ligados aos fragmentos e reunidos em 8 subbibliotecas. Cada subbiblioteca será selecionada por tamanho em um PippinPrep (SageScience). Fragmentos selecionados por tamanho serão então amplificados via PCR com Phusion Hi-Fidelity Polymerase (Thermo Scientific), que também incorpora índices (i7) e adaptadores Illumina nos fragmentos e permitirá o agrupamento de sub-bibliotecas na biblioteca final. O sequenciamento será feito em equipamento Illumina HiSeq 4000 (PE150). Os arquivos de sequência bruta serão filtrados com qualidade, alinhados e montados com STACKS v2.3d (Rochette et al. 2019) em centros de computação de alta performance (possível Florida International University High Performance Computing Cluster – HPCC e/ou Esalq/USP). As leituras serão demultiplexadas, limpas e filtradas com qualidade com o programa process\_radtags. O programa wrapper denovo\_map.pl será utilizado para executar ustacks, cstacks, sstacks, tsv2Bam e populações em STACKS v2.3d. Serão executadas análises exploratórias por subconjunto dos dados para determinar o melhor conjunto de parâmetros, seguindo Rochette et al. (2017) para maximizar a chamada de SNPs e minimizar as taxas de erro. Todos os loci putativos serão comparados com o catálogo com sstacks, e leituras diretas e reversas (extremidades pareadas) serão montadas por tsv2Bam. O módulo de populações será usado para gerar um arquivo de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) alinhados.

### *Análises Filogenéticas e de variabilidade*

As análises filogenéticas serão realizadas a partir dos dados dos genes mitocondriais 16S rDNA e Citocromo oxidase I (COI - barcoding). Serão construídas árvores filogenéticas pelo método de Máxima Verossimilhança (ML), uma para cada gene. Para a elaboração das árvores, o conjunto das sequências será alinhado no MAFFT v.7 (Kato & Toh, 2008) (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Após o alinhamento, este será submetido à versão online do programa IQ-TREE (<http://www.iqtree.org/>) (Nguyen et al. 2015) para a elaboração da árvore, com a seleção prévia do modelo de substituição pelo ModelFinder do IQ-TREE (Kalyaanamoorthy et al. 2017), além da consistência das topologias mensurada por meio de valores de 1000 réplicas de bootstrap, obtidos pela ferramenta de Ultrafast bootstrap (Hoang et al. 2018). Além das árvores contendo dados de cada gene separadamente, será gerada uma árvore concatenando dados dos genes 16S e COI. Neste caso, o método utilizado para a elaboração da árvore será a Inferência Bayesiana (IB), que se baseia na probabilidade de se observarem determinados dados já tendo algum conhecimento sobre eles, os *priors* (Yang & Rannala 1997, Hall 2008). Para a elaboração da árvore concatenada, inicialmente, os conjuntos de sequências que compuseram a árvore, sendo um conjunto para cada gene, serão alinhados no MAFFT v.7 (Kato & Toh 2008)

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

(<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Após o alinhamento dos conjuntos de sequências, estes serão colocados no MEGA 10.0.5 para determinação dos modelos de substituição mais adequados para cada conjunto de dados seguindo o Critério de Informação Bayesiano (BIC) (Nei & Kumar 2000, Tamura et al. 2004, Kumar et al. 2018). Após a seleção dos modelos, os dois conjuntos de dados serão unidos no BEAUTi 2 (Bouckaert et al. 2019), onde será processada a preparação dos arquivos utilizados para a geração das árvores. Para calcular os valores aproximados de probabilidade posterior será utilizado como método o *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) (Yang & Rannala 1997) e os *priors* impostos à análise serão aqueles presumidos pelo *Birth Death Model*. Realizadas as etapas de preparação dos conjuntos de dados, estes seguirão para o BEAST 2.5 (Bouckaert et al. 2019) para a geração das árvores. No BEAST serão realizadas três análises, sendo que em cada análise era feita a amostragem de uma árvore a cada 25 mil gerações durante 50 milhões de gerações, com frequência de amostragem igual a 100 mil e burn-in de 25%. Os parâmetros das análises serão avaliados no Tracer v.1.7.1 (Rambaut et al. 2014). Na sequência, as árvores geradas nas três análises serão combinadas no programa LogCombiner v2.6.6 (Drummond & Rambaut 2007). Posteriormente, o resultado será obtido a partir do resumo da maioria das árvores através do programa TreeAnnotator v2.6.2 (Drummond & Rambaut 2007). Por fim, a árvore final será visualizada e editada no FigTree v1.4.4 (Rambaut 2018). Também serão elaboradas duas matrizes de distância genética, uma para 16S e uma para COI, no software MEGA 10.0.5 (Tamura et al. 2004, Kumar et al. 2018) para conhecer a distância genética entre os indivíduos avaliados utilizando o método de *p-distance*.

A variabilidade genética intraespecífica de cada uma das espécies que demonstrarem variabilidade morfológica e/ou genética questionável será avaliada por meio das sequências parciais do gene mitocondrial COI obtidas de três ou mais indivíduos provenientes da mesma localidade ao longo da distribuição geográfica da espécie, condição já testada com êxito para outros decápodes (Vergamini et al. 2011, Terossi & Mantelatto 2012, Rossi & Mantelatto 2013). O número de haplótipos será calculado no programa DnaSP versão 4.10.9 (Rozas & Rozas 1999). A diversidade de nucleotídeos e de haplótipos será estimada para cada população usando o programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier et al. 2005). Redes de haplótipos serão construídas pelo método de Median-Joining no programa Network (Bandelt et al. 1999), com os dados previamente preparados no DnaSP. Análises de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) serão computadas no software Arlequin para examinar a distribuição da variação genética.

### *Procedimentos gerais para o estudo do sistema reprodutor e espermatozoide*

As espécies estudadas quanto à morfologia, histologia e histoquímica do sistema reprodutor masculino e receptáculo seminal, e principalmente a ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozoides, em princípio, serão aquelas para as quais forem encontrados machos e fêmeas adultas com o sistema reprodutor desenvolvido durante as coletas. No entanto, pretende-se enfatizar no caso da espermiotaxonomia, as espécies de grupos com problemas taxonômicos, visando elucidar tal vertente.

Decápodes adultos serão coletados em áreas costeiras do Brasil, por meio de técnicas variadas em função do ambiente em que vivem e submetidos às preparações de rotina em microscopia. Os exemplares obtidos serão armazenados vivos em baldes contendo água oriunda do ambiente de origem da coleta com aeração e etiquetados conforme o local, data e período de coleta e acondicionados em caixas térmicas até o momento de serem manuseados em laboratório. Posteriormente, este material será transportado para o laboratório, onde será confirmada a identificação de acordo com a literatura pertinente. Os exemplares de cada espécie e local de estudo

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

serão separados quanto ao sexo e fase de maturação. Todos os exemplares obtidos serão mensurados quanto ao tamanho padrão, utilizando-se um paquímetro (0,01 mm). Os procedimentos de anestesia, dissecação, análise dos receptáculos seminais, sistema reprodutor masculino, espermátóforos e espermatozoides seguirão, em linhas gerais, os procedimentos descritos nos trabalhos efetuados pelo grupo (Zara et al. 2012, 2013, 2014, Buranelli et al. 2014; Camargo et al. 2016). Parte do sistema reprodutor masculino (testículo e vaso deferente), de cada espécie alvo de estudo, será removida do cefalotórax e abdome. As amostras desse tecido serão fixadas e submetidas ao processamento de rotina para microscopia. As descrições morfológicas ultraestruturais dos espermatozoides serão elaboradas a partir de documentação fotográfica do material processado e analisado sob microscopia eletrônica. De posse das descrições, serão feitas comparações com as espécies estudadas, bem como com aquelas conhecidas na literatura. Todos os indivíduos dissecados serão individualizados após as análises, conservados em etanol 80% e incorporados às Coleções de Referência.

### *Procedimentos de microscopia de luz*

Estereomicroscopia motorizada e reconstrução tridimensional: Para a análise macroscópica da anatomia do sistema reprodutor masculino e estruturas de armazenamento espermático do sistema reprodutor feminino, os animais terão a carapaça cefalotorácica e o coração removidas (Zara et al. 2012, 2013). Estes serão mantidos imersos em solução fixadora de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) com 5% de sacarose. Posteriormente os animais serão escaneados antero-posteriormente sob estereomicroscópio Leica M205C, sendo as imagens, serão montadas digitalmente em diferentes planos utilizando-se o programa Leica LAS Montage. Após o registro anatômico do interior do animal, o sistema reprodutor será dissecado e mantido no mesmo fixador para o registro macroscópico dos detalhes anatômicos: Arquitetura geral dos órgãos, glândulas associadas ao sistema reprodutor masculino, órgãos de transferência espermática e posição de abertura dos ovidutos na estrutura armazenadora de espermatozoides. Será aplicada também o contraste de fase de Rotterman (microscopia de contraste de fase ao estereomicroscópio) para observação da distribuição dos espermátóforos/espermatozoides no interior do vaso deferente ou órgãos de armazenamento espermático. Este procedimento será realizado no mesmo estereomicroscópio e programa.

Microscopia de luz: os órgãos provenientes da estereomicroscopia motorizada permanecerão no fixador por 24h em geladeira. Após três banhos no mesmo tampão, as amostras serão desidratadas em série crescente de álcool (70-95%), embebidas e incluídas em historesina glicol-metacrilato Leica. Os blocos histológicos serão cortados em micrótomo rotativo Leica RM2255, com espessura de 4-7µm e recolhidos em lâminas. As lâminas serão coradas com hematoxilina & eosina, para a descrição tradicional, PAS-hematoxilina e azul de toluidina, para a descrição da espermatogênese, além das técnicas para proteínas com o corante Xylidine ponaceau e azul de bromofenol. Para polissacarídeos neutros será utilizada a técnica de PAS e para os ácidos, o azul de Alcian (Zara et al. 2012, 2013, 2014, Nascimento & Zara 2013, Tiseo et al. 2014).

Microscopia de Contraste Interferência de Fase (DIC): Para a observação dos braços radiais dos espermatozoides ou aspectos tridimensionais dos espermátóforos, será realizado um esfregaço da PVD. Para tal, fragmentos do vaso deferente serão macerados em cinco ml de glutaraldeído 2,5% ou água do mar do local de coleta, sendo posteriormente tomados 100 µl da solução, os quais serão recolhidos em lâmina e recobertos por lamínula (Zara et al. 2012). Posteriormente, as lâminas serão

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

analisadas no DIC Zeiss Axio Imager Z2.

### *Procedimentos de microscopia eletrônica*

**Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):** O material biológico será fixado em solução de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,3) com sacarose 5% (Rote et al., 1990) para as espécies marinhas e sem sacarose para as espécies estuarinas e água doce, por 4 horas em geladeira. Devido a nossa experiência com diversidade de amostras biológicas provenientes de diferentes ambientes, também será utilizado, em outras amostras do mesmo animal, o tampão PHEM (600 mM PIPES, 250 mM HEPES, 100 mM EGTA e 20 mM MgCl<sub>2</sub>) com 9% sacarose, para as marinhas e ausência deste composto para as estuarinas e água doce (Montanaro et al. 2016). Em seguida, as amostras serão pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% no tamponado (2 horas), contrastadas “En bloc” com acetato de uranila 1% em solução aquosa (15 horas), sendo desidratadas em série crescente de acetona, embebidas e incluídas em mistura de resina Epon-Araldite. Após a polimerização dos blocos, estes serão cortados em ultramicrotomo Leica UC7, sendo os cortes ultrafinos (50nm), recolhidos em grades de cobre (100 a 200mesh). A contrastação das grades será realizada com acetato de uranila e citrato de chumbo, sendo as mesmas observadas e documentadas no TEM Jeol J1010, operado à 80 kV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP, FCAV, Campus de Jaboticabal.

**Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):** O material biológico será fixado na mesma solução descrita para a MET por no mínimo 24 horas, sendo a pós-fixação conduzida da mesma maneira. A desidratação será em sequência crescente de acetona, sendo a completa secagem obtida em aparelho ponto crítico CP EMS (Electron Microscopy Science), com CO<sub>2</sub> líquido. As amostras completamente secas serão montadas em “stub” com fita condutora dupla face e metalizadas em aparelho sputtering (Danton Vacuon), com camada de 10 nm de ouro. As observações e imagens serão realizadas nos MEV Jeol SEM 5485 ou Zeiss Evo (em instalação), com voltagens variando de 10-20 kV no mesmo laboratório de microscopia eletrônica da técnica de MET.

### *Procedimentos para nanotomografia computadorizada (nCT)*

Para a visualização dos órgãos internos e interação entre os órgãos de armazenamento espermático associado ao sistema reprodutor feminino e estruturas copulatórias masculinas, os sistemas reprodutores serão tratados com solução de alcóolica de iodeto 1% por 24h para aumento de contraste dos tecidos, sendo o restante do animal mantido imerso em solução fixadora para microscopia de luz, permitindo o exame posterior dos tecido em análise macroscópica por estereomicroscopia motorizada e histologia. A nCT será realizada no Centro de Documentação da Biodiversidade (CDB) do Departamento de Biologia da FFCLRP/USP por meio do nCT scan General Electric com tubo de nano raio X operado a 70kV e resolução 200 µA, produzindo 2000 imagens por escaneamento. A reconstrução das imagens será realizada usando o programa Datos/X-reconstruction (GE Sensing & Inspection Technologies) e as sobreposições dos cortes virtuais serão processados e exportados para o programa VGStudio Max. As reconstruções superficiais serão realizadas por meio do programa FEI Amira versão 5.4.3.

## IX. Plano de Divulgação Científica

A divulgação científica será centrada na publicação de artigos nas mais renomadas revistas internacionais, mantendo a tradição dos pesquisadores desta proposta. Adicionalmente, pretende-se ter subsídios biológicos para albergar a produção de um livro científico ilustrado

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

apresentando a biodiversidade marinha de decápodes, provavelmente dividida pelas cinco Ecorregiões do Brasil.

No projeto contamos com a participação de um ponto Focal do ICMBio (Dr. Harry Boos), com expertise de uso da plataforma SiBBr - Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira, o que garantirá essa demanda prevista no edital. Ainda, na qualidade de membro titular (PORTARIA MPA Nº 121/2023), encaminharemos as informações geradas para o Comitê Permanente de Gestão da Pesca e do Uso Sustentável dos Recursos Pesqueiros Demersais das Regiões Sudeste e Sul (CPG Demersais SE/S), parte da Rede Nacional Colaborativa para Gestão Sustentável dos Recursos Pesqueiros (Rede Pesca Brasil. Decreto nº 10.736/2021).

Outro aspecto importante atrelado aos dados, será a disseminação do conhecimento gerado, que ocorrerá por meio de: i) participação com apresentações em eventos científicos (congressos, conferências, simpósios etc.); ii) elaboração de manuscritos para publicação dos resultados e conclusões, encaminhados para periódicos arbitrados e com impacto relevante na comunidade científica nacional e internacional; iii) informes em veículos de divulgação na mídia falada e escrita, sediados na IES, nas cidades e nas associações e programas de pós-graduação afins; iv) montagem de uma página na *Web* e a divulgação nas mídias digitais (Instagram, Facebook, Twitter) de informações relevantes para os diferentes públicos que queiram obter informações pertinentes, solicitar permissão para utilização de material e/ou dados.

Adicionalmente, com o material adquirido nas várias atividades de campo, estes serão apresentados nas escolas de ensino médio e fundamental, além das atividades de Extensão que existem nas IESs participantes, os quais promovem a integração dos estudantes de graduação com a sociedade extramuros, seja por meio de apresentações ou visitas aos laboratórios para tratar do tema biodiversidade. Em toda veiculação será feita expressa referência ao apoio institucional do CNPq.

### X. Etapas de execução da proposta com respectivo cronograma de atividades, observado o prazo fixado no subitem 10.4

O presente projeto foi elaborado para ser executado ao longo de 36 meses, seguindo o plano de atividades traçado abaixo, dividido em trimestres de cada ano:

Atividades	2024				2025				2026			
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º
Coletas de campo em todas as regiões												
Preparação de amostras												
Análises laboratoriais (triagem e preparações)												
Análise morfológica												
Análise molecular												
Análises histológicas e ultraestruturais dos sistemas reprodutores e espermatozoides												
Análise e Compilação dos Resultados												
Produção e publicação de artigos científicos e elaboração de relatório final												

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

### XI. Produtos esperados como resultado do projeto de pesquisa, com previsão de cronograma de entrega anual

- A. Confecção de um inventário completo e com base filogenética atual das espécies de crustáceos decápodes do Brasil.
- B. Construção de uma biblioteca genômica dos crustáceos decápodes do Brasil.
- C. Geração de novidades científicas (descrição de espécies novas e crípticas).
- D. Aporte de espécimens nos acervos das coleções científicas de referência nacional e de novas coleções que possam servir como réplicas.
- E. Divulgação dos resultados em eventos científicos (congressos, conferências, simpósios).
- F. Realização de workshops para discussão sobre avanços em temáticas específicas.
- G. Realização de cursos de atualização, treinamento, difusão e capacitação de pessoal.
- H. Interlocução com comunidades costeiras para divulgação da ciência em diferentes níveis de abrangência.
- I. Fornecer subsídios científicos sobre a fauna de decápodes para balizar tomadas de decisões sobre ações e critérios de conservação de espécies.
- J. Promover o intercâmbio de estudantes e pesquisadores entre os diferentes laboratórios.
- K. Cadastro das espécies coleadas na plataforma SiBBR - Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira.
- L. Encaminhamento das informações geradas para o Comitê Permanente de Gestão da Pesca e do Uso Sustentável dos Recursos Pesqueiros Demersais das Regiões Sudeste e Sul (CPG Demersais SE/S), parte da Rede Nacional Colaborativa para Gestão Sustentável dos Recursos Pesqueiros (Rede Pesca Brasil. Decreto nº 10.736/2021).
- M. Fornecer resultados para compor e auxiliar a "Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos - BPBES" quanto ao diagnóstico em andamento para Ambiente Marinho Costeiro.
- N. Publicação dos resultados e análises obtidos em periódicos arbitrados e com impacto relevante na comunidade científica nacional e internacional.

### XII. Recursos financeiros de outras fontes aprovados para aplicação no projeto

O coordenador e pesquisadores colaboradores da proposta contam com apoio financeiro de projetos de pesquisa de agências de fomento, em vigência, capazes de dar suporte adicional para a execução da proposta apresentada. No entanto, esses projetos são complementares e os recursos aqui solicitados são essenciais para que a proposta seja executada com êxito, e deixando explícito que as demandas de bolsas de estudo aqui solicitadas têm nessa única chamada a sua fonte e, portanto, muito importantes. Abaixo a listagem da origem e valores destes recursos disponíveis:

#### *Bolsas de Produtividade em Pesquisa (CNPq)*

- 1. 2020/2025: "Padrões e processos de diversificação em crustáceos decápodes neotropicais: análise integrada por meio de filogenia molecular, variabilidade genética e revisão taxonômica" – Bolsa de Produtividade em Pesquisa - CNPq - Nível 1A (Processo Nº 302253/2019-0). Valores: Mensalidade e Taxa Bancada Mensal de R\$ 1.560,00 – Fernando L. Mantelatto.
- 2. 2019/2026: "Diversificação dos crustáceos do gênero *Aegla* Leach 1820 (Decapoda, Anomura, Aeglidæ)." – Bolsa de Produtividade em Pesquisa - CNPq - Nível 1B (Processo Nº # 311690/2018-1). Mensalidade e Taxa Bancada Mensal de R\$ 1.320,00 – Sandro Santos.

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

3. 2023/2027: "Efeito da pesca na estruturação das comunidades de camarões na região de Ubatuba" – Bolsa de Produtividade em Pesquisa - CNPq - Nível 1B (Processo Nº # 304368/2022-4). Mensalidade e Taxa Bancada Mensal de R\$ 1.320,00 – Rogerio Costa.
4. 2023/2025: "Nova diversidade de camarões peneídeos na costa brasileira e impacto das mudanças climáticas" – Bolsa de Produtividade em Pesquisa - CNPq - Nível 02 (Processo Nº 310293/2022-7). Valor: Mensalidade Mensal – Fulvio Freire.
5. 2023/2025: ""Riqueza, distribuição e filogenia de Aegla (Crustacea, Anomura) em bacias hidrográficas do Paraná" – Bolsa de Produtividade em Pesquisa - CNPq - Nível 02 (Processo Nº 303802/2022-7). Valor: Mensalidade Mensal – Gustavo Teixeira.
6. 2021-2023: "O papel da recuperação hidrológica e de grupos funcionais na restauração, manejo e estoque de carbono azul de manguezais degradados" – Bolsa de Produtividade em Pesquisa - CNPq - Nível 02 (Proc. Nº 31065/2020-2). Valor: Mensalidade Mensal – Luiz Bezerra.
7. 2021-2023: "Evolução do sistema reprodutor em decápodes a partir de dados morfológicos, espermatológicos e moleculares" – Bolsa de Produtividade em Pesquisa - CNPq - Nível 02 (Proc. Nº 309898/2020-2). Valor: Mensalidade Mensal – Fernando Zara.

### *Projetos de Pesquisa*

8. 2019/2024: "Análise integrativa da fauna brasileira de crustáceos decápodes: taxonomia, sistemática filogenética, espermiotaxonomia, morfologia do desenvolvimento pós-embriônico, ecologia e conservação". Auxílio à Pesquisa, Programa BIOTA, Projeto Temático FAPESP (Processo Nº 2018/13685-5). Coordenador. Valor Total: R\$ 2.567.956,34 – Fernando L. Mantelatto, Rogerio Costa e Fernando Zara. O presente projeto encontra-se em fase final de execução e contribuiu de forma significativa para os equipamentos necessários para as análises de microscopias e moleculares as quais são chave para a execução da presente proposta.
9. 2023/2025: "Nova abordagem de taxonomia integrativa para identificação de camarões peneídeos e impacto das mudanças climáticas em seus estoques pesqueiros" - FAPERJ: Processo nº 10959064-720.000038/2022-89. Valor: R\$ 50.000,00 (+ Bolsa de PD) – Fulvio Freire.

### **XIII. Disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto**

Os dois centros principais que coordenarão as análises e compilação dos dados dessa proposta estão sediados na USP e UNESP, e assim a infraestrutura focou nessas duas sedes. Todas as outras IESs também apresentam as condições de logística que darão o devido apoio e suporte durante coletas e análises específicas.

A USP está estrategicamente localizada no centro (São Paulo) das áreas que serão amostradas facilitando a logística de organização e de ponto de apoio durante as atividades. A infraestrutura (logística e equipamentos) disponível na instituição sede (Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos – LBSC, Departamento de Biologia - DB, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP, Universidade de São Paulo - USP), conta com a vasta maioria dos equipamentos necessários para as análises moleculares e morfológicas previstas neste projeto, além de veículo de coleta que viabiliza as expedições de campo em curtas

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

distancias. Alguns poucos equipamentos em solicitação visam aprimorar a estrutura com o aporte de modelos mais modernos e/ou prover condições mínimas em laboratórios que se encontram em formação/estruturação. O DB conta ainda com o Centro de Documentação Biológica (Microscopia Eletrônica e Nano-CTScan – adquirido pela FINEP tendo o proponente como coordenador, e lupas motorizadas com análise de imagem). Quanto à logística, contará com prédios e laboratórios equipados com infraestrutura para dar suporte amplo e irrestrito ao projeto, em ambientes climatizados e com acesso à internet de última geração. A USP conta ainda com bases de apoio (Ubatuba, São Sebastião e Cananéia) no litoral que darão suporte a execução das atividades de campo. Todos os serviços acadêmicos, administrativos e de apoio técnico existentes serão disponibilizados, à medida que necessário, para a plena execução das atividades. Em particular, técnicos acadêmicos (compra e prestação de contas), técnico de laboratório, pessoal de limpeza, manutenção e reparos (hidráulica, elétrica), motoristas, entre outros. A USP conta também com laboratórios de informática munidos de supercomputadores para processamento de análises e arquivamento de dados.

A UNESP FCAV conta com laboratório de microscopia eletrônica totalmente reformado e com equipamentos obtidos via projetos temáticos FAPESP e Universal do CNPq. Neste laboratório, o qual conta com o suporte técnico da Dra. Claudia Maria Toffanelli Fiorillo (CPF: 181061.668-99), encontram-se três microscópios, sendo dois eletrônicos (transmissão Jeol J1010 – com câmera Gatan e Varredura Zeiss Evo 10) e um microscópio confocal Leica, recém-instalado. Todos estes equipamentos estão disponíveis para utilização desta proposta. Além disso, na FCAV está sediado o Laboratório de Morfologia de Invertebrados, onde serão realizadas as análises morfológicas e ultraestruturais. Este laboratório montado graças ao suporte da FAPESP via projetos Jovem Pesquisado, e dois temáticos Biota, além de um Universal do CNPq, e o Projeto CAPESP Ciências do Mar II tem todo o instrumental para realização das diferentes técnicas de microscopia desta proposta. O laboratório conta com uma funcionária técnica exclusiva para o projeto, a Sra. Marcia Fioreze Mataqueiro (CPF: 109.093.778-47) e que auxiliara na operação dos equipamentos. Entre os recursos físicos, figuram micróstomo Leica e ultra micrótomo Leica UC7, microscópio óptico e de contraste de fase Leica DM2000, com novo programa de captura de imagem Leica LAS, um estereomicroscópio com base luminosa para contraste de fase de Rottermann e um microscópio Zeiss Axiovision Z2 com contraste Inter diferencial de fase (DIC) e fluorescência.

### j) Indicação do cronograma de atividades, incluindo as reuniões anuais internas de avaliação e acompanhamento dos Projetos Associados

Avaliação será feita de forma contínua, porém com reuniões semestrais entre os coordenadores e demais participantes, além de workshops para apresentação dos resultados e discussões entre todos os representantes das IESs participantes.

Atividades	2024				2025				2026			
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º
Planejamento e acompanhamento												
Coletas de campo												
Análises laboratoriais (triagem e preparações diversas)												
Visitas Museus/Instituições												
Análises moleculares												
Análise e Compilação dos Resultados												



## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

- CALCAGNOTTO, D. (2001). Taxas de evolução e o relógio molecular, pp. 52-63. In: S.R. Mاتيoli (ed), *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora LTDA-ME, Ribeirão Preto (SP).
- CAMARGO, T. R., ROSSI, N., CASTILHO, A. L., COSTA, R. C., MANTELATTO, F. L. & F. J. ZARA (2016). Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology* 135, 67-81.
- CARLOS, L., TABOADA, S., COMBOSCH, D., GIRIBET, G., & RIESGO, A. (2017). Population connectivity of *Dendrilla antarctica* Topsent, 1905 (Porifera, Demospongiae) from west Antarctica shallow bottoms using Genome-wide SNPs obtained from RADseq techniques. In Book of Abstracts (p. 59).
- DRUMMOND, A. J. & RAMBAUT, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- DUARTE, G., CALDERON, E. N., PEREIRA, C. M., MARANGONI, L. F., SANTOS, H. F., PEIXOTO, R. S., ... & CASTRO, C. B. (2015). A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. *Ecology and Evolution*, 5(20), 4555-4566.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G. & SCHNEIDER, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E. & QUATTRO, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- FAIRCLOTH, B. C., MCCORMACK, J. E., CRAWFORD, N. G., HARVEY, M. G., BRUMFIELD, R. T., & GLENN, T. C. (2012). Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Systematic Biology*, 61(5), 717-726.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J., & BRISCOE, D. (2008). *Genética da Conservação*. Ribeirão Preto. 262 pp.
- FUNK, W. C., MCKAY, J. K., HOHENLOHE, P. A., & ALLENDORF, F. W. (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(9), 489-496.
- GEBURZI, J. C., RODRIGUEZ FLORES, P. C., DERKARABETIAN, S., & GIRIBET, G. (2023). From the shallows to the depths: A new probe set to target ultraconserved elements for Malacostraca. *bioRxiv*, 2023-06.
- GIGA Community of Scientists. (2014). The Global Invertebrate Genomics Alliance (GIGA): developing community resources to study diverse invertebrate genomes. *Journal of Heredity*, 105(1), 1-18.
- GNIRKE, A., MELNIKOV, A., MAGUIRE, J., ROGOV, P., LEPROUST, E. M., BROCKMAN, W., ... & NUSBAUM, C. (2009). Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nature Biotechnology*, 27(2), 182-189.
- GREEN, R. E., KRAUSE, J., BRIGGS, A. W., MARICIC, T., STENZEL, U., KIRCHER, M., ... & PÄÄBO, S. (2010). A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*, 328(5979), 710-722.
- GUSTAFSON, G. T., BACA, S. M., ALEXANDER, A. M., & SHORT, A. E. (2020). Phylogenomic analysis of the beetle suborder Adephaga with comparison of tailored and generalized ultraconserved element probe performance. *Systematic Entomology*, 45(3), 552-570.
- HALL, B. G. (2008). *Phylogenetic trees made easy: A how-to manual*. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 233p.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL S. L. & DEWAARD, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society of London*, 270, 313-321.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S. & DE WAARD, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceeding of the Royal Society of London*, 270, 96-99.
- HOANG, D. T.; CHERNOMOR, O.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. & VINH, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 518-522.
- HOFFMANN, A., GRIFFIN, P., DILLON, S., CATULLO, R., RANE, R., BYRNE, M., ... & SGRÒ, C. (2015). A framework for incorporating evolutionary genomics into biodiversity conservation and management. *Climate Change Responses*, 2, 1-24.
- HUG, L. A., BAKER, B. J., ANANTHARAMAN, K., BROWN, C. T., PROBST, A. J., CASTELLE, C. J., ... & BANFIELD, J. F. (2016). A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*, 1(5), 1-6.
- JANZEN, D. H.; HAJIBABAEI, M.; BURNS, J. M.; HALLWACHS, W.; REMIGIO, E. & HEBERT, P. D. N. (2005). Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 360, 1835-1845.
- JOHNSEN, A.; RINDAL, E.; ERICSON, P. G. P.; ZUCCON, D.; KERR, K. C. R.; STOECKLE, M. Y. & LIFJELD, J. T. (2010). DNA barcoding of scandinavian birds reveals divergent lineages in trans-Atlantic species. *Journal fur Ornithologie*, 151, 565-578.

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

- KALYAANAMOORTHY, S.; MINH, B. Q.; WONG, T.K.F.; VON HAESELER, A. & JERMIIN, L. S. (2017). ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. *Nature Methods*, 14: 587-589.
- KATO, K. & TOH, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9 (4): 286-298.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *BMC Bioinformatics*, 12, 1647-1649.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C. & TAMURA, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- LAL, M. M., SOUTHGATE, P. C., JERRY, D. R., & ZENGER, K. R. (2016). Fishing for divergence in a sea of connectivity: the utility of ddRADseq genotyping in a marine invertebrate, the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Marine Genomics*, 25, 57-68.
- LAMBERT, D. M.; BAKER, A.; HUYNEN, L.; HADDRATH, O.; HEBERT, P. D. & MILLAR, C. D. (2005). Is a large-scale DNA-based inventory of ancient life possible? *Journal of Heredity*, 96(3), 279-284.
- MAGALHÃES, T.; ROBLES, R.; FELDER, D. L. & MANTELATTO, F. L. (2016b). Integrative taxonomic study of the purse crab genus *Persephona* Leach, 1817 (Brachyura: Leucosiidae): combining morphology and molecular data. *PLoS ONE*, 11(4), e0152627.
- MANTELATTO, F. L.; PAIXÃO, J. M.; ROBLES, R.; TELES, J. N. & BALBINO, F. C. (2023). Evidence using morphology, molecules, and biogeography clarifies the taxonomic status of mole crabs of the genus *Emerita* Scopoli, 1777 (Anomura, Hippidae) and reveals a new species from the western Atlantic. *Zookeys*, 1161: 169-202.
- MANTELATTO, F. L.; ROBLES, R. & FELDER, D. L. (2007). Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus *Portunus* (Crustacea, Brachyura, Portunidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 150 (1), 211-220.
- MANTELATTO, F. L.; ROBLES, R.; SCHUBART, C. D. & FELDER, D. L. (2009). Molecular phylogeny of the genus *Cronius* Stimpson, 1860, with reassignment of *C. tumidulus* and several american species of *Portunus* to the genus *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae). In: Martin, J.W.; Crandall, K.A. & Felder, D.L. (Eds.) *Decapod Crustacean Phylogenetics*. CRC Press Taylor & Francis Group. *Crustacean Issues*, 18, 567-579.
- MANTELATTO, F. L.; ROBLES, R.; WEHRTMANN, I. S.; SCHUBART, C. D. & FELDER, D. L. (2018a). New insights into the molecular phylogeny of the swimming crabs of the genera *Portunus* Weber, 1795 and *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae) of the Americas. *Journal of Crustacean Biology*, 38(2), 190-197.
- MANTELATTO, F.L., TEROSSI, M., NEGRI, M., BURANELLI, R. C., ROBLES, R., MAGALHÃES, T., TAMBURUS, A.F., ROSSI, N. & MIYAZAKI, M.J. (2018b) 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), 805-815.
- MAROSO, F., CASANOVA, A., DO PRADO, F. D., BOUZA, C., PARDO, B. G., BLANCO, A., ... & MARTÍNEZ, P. (2018). Species identification of two closely exploited flatfish, turbot (*Scophthalmus maximus*) and brill (*Scophthalmus rhombus*), using a ddRADseq genomic approach. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(5), 1253-1260.
- MARTIN, J. W. & DAVIS, G. E. (2001). An updated classification of the recent Crustacea. California: Natural History Museum of Los Angeles County, 124p.
- MARTIN, J. W., & DAVIS, G. E. (2001). An updated classification of the recent Crustacea (Vol. 39, p. 129). Los Angeles: Natural History Museum of Los Angeles County.
- MARTIN, J. W., CRANDALL, K. A. & FELDER, D. L. (2009). *Decapod Crustacean Phylogenetics* (Eds), Boca Raton, Florida: Taylor & Francis/CRC Press. *Crustacean Issues*, 18, 616p.
- MCMAHON, B. J., TEELING, E. C., & HÖGLUND, J. (2014). How and why should we implement genomics into conservation? *Evolutionary Applications*, 7(9), 999-1007.
- MILLER, M. R., DUNHAM, J. P., AMORES, A., CRESKO, W. A., & JOHNSON, E. A. (2007). Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research*, 17(2), 240-248.
- MUELL, M. R., CHÁVEZ, G., PRATES, I., GUILLORY, W. X., KAHN, T. R., TWOMEY, E. M., ... & BROWN, J. L. (2022). Phylogenomic analysis of evolutionary relationships in *Ranitomeya* poison frogs (Family Dendrobatidae) using ultraconserved elements. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 168, 107389.
- NASCIMENTO, F. A. D. & ZARA, F.J. (2013). Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius*, 21, 161-177.

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

- NEGRI, M. P.; LEMAITRE, R. & MANTELATTO, F. L. (2014). Molecular and morphological resurrection of *Clibanarius symmetricus* (Randall, 1840), a cryptic species hiding under the name for the “thin stripe” hermit crab *C. vittatus* (Bosc, 1802) (Decapoda: Anomura: Diogenidae). *Journal of Crustacean Biology*, 34(6), 848-861.
- NEGRI, M.; PILEGGI, L. G. & MANTELATTO, F. L. (2012). Molecular barcode and morphological analyses reveal the taxonomic and biogeographical status of the stripedlegged hermit crab species *Clibanarius sclopetarius* (Herbst, 1796) and *Clibanarius vittatus* (Bosc, 1802) (Decapoda: Diogenidae). *Invertebrate Systematics*, 26 (5/6), 561-571.
- NEGRI, M.; SCHUBART, C. D. & MANTELATTO, F. L. (2018). Tracing the introduction history of the invasive swimming crab *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) in the Western Atlantic: evidences of high genetic diversity and multiple introductions. *Biological Invasions*, 20(7), 1771–1798.
- NEI, M. & KUMAR, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- NGUYEN, L. T.; SCHMIDT, H. A.; VON HAESELER, A. & MINH, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274.
- PALUMBI, S. R. & BENZIE, J. (1991). Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1: 27-34.
- PERES, P.A.; BRACKEN-GRISSOM, H.; TIMM, L. E.; MANTELATTO, F.L. (2023). Genomic Analyses Implicate the Amazon–Orinoco Plume as the Driver of Cryptic Speciation in a Swimming Crab. *Genes*, 13, 2263.
- PETERSEN, H. C., KNOTT, K. E., BANTA, G. T., & HANSEN, B. W. (2022). Ultra-conserved elements provide insights to the biogeographic patterns of three benthic macroinvertebrate species in the Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 271, 107863.
- PETERSON, B. K., WEBER, J. N., KAY, E. H., FISHER, H. S., & HOEKSTRA, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7(5), e37135.
- PETERSON, B. K.; WEBER, J. N.; KAY, E. H.; FISHER, H. S.; HOEKSTRA, H. E. (2012). Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7, e37135.
- PILEGGI, L. G. & MANTELATTO, F. L. (2010). Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebrate Systematics*, 24(2): 194-208.
- PRIMMER, C. R. (2009). From conservation genetics to conservation genomics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1162(1), 357-368.
- RAMBAUT, A. (2018). FigTree 1.4.4. Disponível em: <http://github.com/rambaut/figtree>
- RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; XIE, D. & DRUMMOND, A. J. (2014). Tracer v1.6. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- RITTMAYER, E. N., ELMONIER, A., & RUANE, S. (2021). Phylogeography of the Rough Greensnake, *Ophedryx aestivus* (Squamata: Colubridae), Using Multilocus Sanger Sequence and Genomic ddRADseq Data. *Journal of Herpetology*, 55(4), 342-354.
- RO, S., TALBOT, P., LEUNG-TRUJILLO, J. & A.L., LAWRENCE (1990) Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: Segments 1-3. *Journal of Crustacean Biology*, 10, 455-468.
- ROSSI, N. & MANTELATTO, F. L. (2013). Molecular analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) supports the existence of a single species throughout its distribution. *PLoS ONE*, 8 (1): e54698.
- ROZAS, J. & ROZAS, R. (1999). DnaSP version 3.0: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15(2), 174-175.
- SCHUBART, C. D.; NEIGEL, J. E. & FELDER, D. L. (2000). Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. *Crustacean Issues*, 12, 817-830.
- STEPHEN, S., PHEASANT, M., MAKUNIN, I. V., & MATTICK, J. S. (2008). Large-scale appearance of ultraconserved elements in tetrapod genomes and slowdown of the molecular clock. *Molecular Biology and Evolution*, 25(2), 402-408.
- TAMBURUS, A. F. & MANTELATTO, F. L. (2021). A molecular perspective on the systematics of the spider crab genus *Libinia* Leach, 1815 (Majoidea: Epialtidae). *Invertebrate Systematic*, 35, 688-700.
- TAMURA, K.; NEI, M. & KUMAR, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 11030-11035.

## Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 07/2023 - PPBio

- TEROSSO, M. & MANTELATTO, F. L. (2012). Morphological and genetic variability in *Hippolyte obliquimanus* Dana, 1852 (Decapoda: Caridea: Hippolytidae) from Brazil and the Caribbean Sea. *Crustaceana*, 85 (6), 685-712.
- TEROSSO, M.; DE GRAVE, S. & MANTELATTO, F. L. (2017). Global biogeography, cryptic species and systematic issues in the shrimp genus *Hippolyte* Leach, 1814 (Decapoda: Caridea: Hippolytidae) by multimarker analyses. *Scientific Reports*, 7, 6697.
- TIMM, L. E., BRACKEN-GRISSOM, H. D., SOSNOWSKI, A., BREITBART, M., VECCHIONE, M., & JUDKINS, H. (2020). Population genomics of three deep-sea cephalopod species reveals connectivity between the Gulf of Mexico and northwestern Atlantic Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 158, 103222.
- TISEO, G. R.; MANTELATTO, F. L. & ZARA, F.J. (2014). Is cleistosperry and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*, 34, 704-716.
- VENCES, M.; THOMAS, M.; BONETT, R. M. & VIEITES, D. R. (2005). Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 360, 1859-1868.
- VERA-SILVA, A. L. & MANTELATTO, F. L. (2022). Taxonomic revision of *Isocheles* Stimpson, 1858 and *Loxopagurus* Forest, 1964 (Decapoda: Anomura: Diogenidae) using morphological and multigene data, with the description of a new Eastern Pacific species. *Journal of Crustacean Biology*, 42(4), 1-25.
- VERGAMINI, F.G.; PILEGGI, L.G. & MANTELATTO, F.L. (2011). Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contributions to Zoology*, 80(1), 67-83.
- WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R. & HEBERT, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.
- YANG, Z. & RANNALA, B. (1997). Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14(7), 717-724.
- YUAN, J., YU, Y., ZHANG, X., LI, S., XIANG, J., & LI, F. (2023). Recent advances in crustacean genomics and their potential application in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*.
- ZARA, F. J., GAETA, H. H., COSTA, T.M., TOYAMA, M. H. & F. H. CAETANO. (2013). The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae). *Acta Zoologica*, 94, 134-146.
- ZARA, F. J., TOYAMA, M. H., CAETANO, F. H. & L. S. LÓPEZ-GRECO. (2012). Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*, 32, 249-262.
- ZARA, F. J.; PEREIRA, G. R. R. & SANT'ANNA, B. S. (2014). Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius*. *Biological Bulletin*, 227, 19-32.
- ZHANG, Y. M., WILLIAMS, J. L., & LUCKY, A. (2019). Understanding UCEs: a comprehensive primer on using ultraconserved elements for arthropod phylogenomics. *Insect Systematics and Diversity*, 3(5), 3.