

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL

Gláucia Bolzan Cogo

**ALIMENTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE
MACROINVERTEBRADOS LÍMNICOS FRENTE À VARIAÇÃO NA
QUALIDADE DO RECURSO E TEMPERATURA DO AMBIENTE**

Santa Maria, RS
2018

Gláucia Bolzan Cogo

**ALIMENTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MACROINVERTEBRADOS
LÍMNICOS FRENTE À VARIAÇÃO NA QUALIDADE DO RECURSO E
TEMPERATURA DO AMBIENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas - Área Biodiversidade Animal**.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Santos

Santa Maria, RS
2018

Cogo, Gláucia

ALIMENTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MACROINVERTEBRADOS
LÍMNICOS FRENTE À VARIAÇÃO NA QUALIDADE DO RECURSO E
TEMPERATURA DO AMBIENTE / Gláucia Cogo.- 2018.

95 p.; 30 cm

Orientador: Sandro Santos

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2018

1. *Aegla longirostri* 2. Aeglidae 3. *Schizopelex*
festiva 4. Temperature-size rule 5. Trichoptera I.
Santos, Sandro II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2018

Todos os direitos autorais reservados a Gláucia Bolzan Cogo. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: glauciabcogo@gmail.com

Gláucia Bolzan Cogo

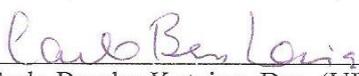
**ALIMENTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MACROINVERTEBRADOS
LÍMNICOS FRENTE À VARIAÇÃO NA QUALIDADE DO RECURSO E
TEMPERATURA DO AMBIENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas - Área Biodiversidade Animal**.

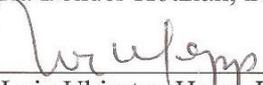
Aprovado em 09 de março de 2018:



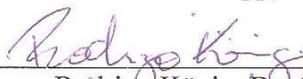
Sandro Santos, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



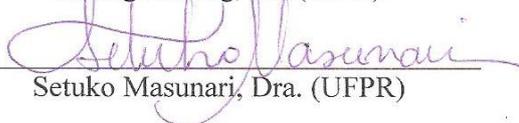
Carla Bender Kotzian, Dra. (UFSM)



Luiz Ubiratan Hepp, Dr. (URI)



Rodrigo König, Dr. (IFFar)



Setuko Masunari, Dra. (UFPR)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Apesar deste item estar aqui no início, é a parte com a qual finalizo a escrita desta tese. Julgo ser das mais difíceis e a mais importante a ser escrita, pois nossas conquistas dependem de muitas pessoas e não somente de análises de variâncias com valor de p. Quero registrar aqui, em palavras (apesar de ser péssima nisso), toda minha gratidão à estas pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese. Foi uma caminhada longa, de altos e baixos, mas acima de tudo de muito aprendizado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal e à Universidade Federal de Santa Maria pela infraestrutura e recursos para o desenvolvimento dessa tese. À CAPES pela bolsa de doutorado e pela bolsa durante o doutorado-sanduíche em Coimbra, Portugal. À Universidade de Coimbra e ao Marine and Environmental Sciences Centre pela infraestrutura concedida. Ao secretário do PPG em Biodiversidade Animal, Sidnei Cruz, pelo auxílio prestado durante a realização do doutorado. À todos os professores e colegas do PPG pelas avaliações, tocas de ideias e disciplinas. À professora Cristiane Pedrazzi e à Marina Gentil pela ajuda nas análises de lignina e holocelulose das folhas. Agradeço à Dr. Vania Loro e ao Eduardo Severo pela realização das análises e colaboração no artigo. Ao Sr. Graciano Sonogo, que permitiu que coletássemos os animais e as espécies vegetais (incluindo muitas frutas!) em sua propriedade.

Agradeço aos membros da banca examinadora Dra. Carla Bender Kotzian, Dr. Luiz Ubiratan Hepp, Dr. Rodrigo König e Dra. Setuko Masunari pela gentileza em contribuir com a avaliação desta tese. Professor Luiz, obrigada também pelo uso do seu laboratório para a análise de dureza das folhas. Agradeço também à Dra. Guendalina Turcato Oliveira, a Dra. Charlene Cavalheiro de Menezes, Dr. Marcelo da Silva Moretti e Dr. José Francisco Gonçalves Júnior que participaram da banca de qualificação.

Agradeço imensamente ao meu orientador de muitos anos, o professor Dr. Sandro Santos. Primeiro por ter me aceitado, no início da graduação, em seu laboratório. Uma guria perdida que só sabia que queria trabalhar com algo de zoologia (lembro-me que antes de ir ao laboratório fui pesquisar o que significava “Carcinologia”). E depois, pela confiança, paciência quando as coisas não ocorriam como planejado e todos os ensinamentos durante esta jornada. Foram anos de muito aprendizado. Muito obrigada!!!

Um enorme agradecimento ao pessoal do laboratório de carcinologia (a propósito, carcinologia é o ramo da zoologia que estuda os crustáceos), mais do que colegas, são meus amigos. Obrigada por todo apoio, conversas científicas, coletas, litros de café, almoços no RU

(e compartilhamento de sobremesas), junções (com direito a Imagem & Ação), piadas ruins entre tantas coisas que fizeram meus dias mais leves e felizes. Obrigada Amanda, Beto, Cícero, Cristina, Diogo, Juliana, Joele e Marcelo Crivellaro.

Alexandre, obrigada por toda ajuda e exemplo de amor e dedicação pela ciência. Fernando, obrigada pelas inúmeras piadas ruins, na companhia do Alexandre e do Marcelo. Bianca, foi muito bom te reencontrar no lab, obrigada pelo exemplo de responsabilidade e dedicação (um dia eu chego lá!). Marcelo, obrigada pelas inúmeras coletas (e foram inúmeras mesmo), pelos cafés (e não chafé), pelas conversas sobre qualquer coisa (cerveja, política, vida, emprego...), por ser meu parceiro para indiadas do lab e por estar sempre pronto a me ajudar. Tu és uma pessoa incrível, (agradecimento especial aos nossos guerreiros carros que nos levaram as coletas – apesar de algumas encrencas). E agora meu agradecimento a pessoa que mais me ajudou durante todo esse tempo, minha eterna gratidão à você, Cris! Obrigada por toda ajuda braçal (não sei quantas coletas e experimentos fizemos juntas) e intelectual, por sempre me acalmar quando as coisas estavam dando errado e me mostrar as coisas positivas dos trabalhos (e por provar que comer muitas paçocas e não faz mal). Obrigada também pelas junções, jantas e inúmeras conversas sobre diversas coisas da vida (um dia teremos nosso lugar ao sol, e provavelmente estaremos comendo algum doce em compota!). Te admiro muito! Enfim, muito obrigada a todos pela colaboração e valiosa amizade!!! Sentirei saudades!

Agradeço muito ao professor Dr. Manuel Graça pela confiança e acolhida em seu laboratório. Obrigada por todo aprendizado e por compartilhar um pouco do seu conhecimento, seja no laboratório, no café ou em coletas. Aprendi muito sobre ciência e fazer ciência. Agradeço ao Jesús Martínez por toda ajuda durante a realização do nosso estudo (e pelo apoio ao ter que subir e descer quilômetros para colocar as armadilhas). Agradeço às colegas do laboratório Ana, Melissa, Raquel e Verónica pela receptividade e por sempre me ajudarem na localização dos materiais no laboratório. Obrigada Olímpia por toda ajuda no laboratório, nas coletas, nos trabalhos de campo (você é uma motorista excepcional!), conversas científicas, jantares, pela amizade e pelos momentos de descontração (sua energia e alegria contagia). Obrigada Sónia por toda ajuda no laboratório, pelas inúmeras conversas filosóficas que tivemos durante esse tempo, pelos jantares no Mondego (ah, os vinhos), pelos passeios de última hora, pelos momentos divertidos que tivemos e por sonhar comigo com um futuro mais leve (e lembre-se: um dia de cada vez). Abraços transatlântico a todos.

Além o meio científico tenho muitas pessoas para agradecer.

Obrigada Mauren, pela longa amizade, pelo apoio nos momentos difíceis e pelos puxões de orelha quando necessários (especialmente na reta final).

Obrigada Bob por ser meu fiel companheiro, por todo carinho e lambidas recebidas, você me traz muita alegria! Obrigada Cláudio por tantos anos de convivência, por toda ajuda (científica ou não), pela paciência (não muita, né) nos momentos mais delicados, pelos desabafos e acima de tudo por me incentivar e acreditar em mim. Muito obrigada!!!

Para finalizar agradeço a quem é a base de tudo, a família. Agradeço ao meu pai Walter e à minha mãe Elaine por toda ajuda e apoio, inclusive científico auxiliando nas coletas de folhas e confecção de artefatos para uso no laboratório. Às minhas irmãs Cristine e Letícia, à Júlia e aos agregados Leandro e Guta por me apoiarem e sempre estarem junto (pelo menos em pensamento). Amos vocês. Vocês foram essenciais para que tudo ocorresse.

RESUMO

ALIMENTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MACROINVERTEBRADOS LÍMNICOS FRENTE À VARIAÇÃO NA QUALIDADE DO RECURSO E TEMPERATURA DO AMBIENTE

AUTOR: Gláucia Bolzan Cogo

ORIENTADOR: Sandro Santos

Os ecossistemas aquáticos apresentam uma diversidade de características bióticas e abióticas, que juntas determinam o seu funcionamento. Nestes ambientes, a comunidade de macroinvertebrados é abundante e depende das condições encontradas nos riachos para sua sobrevivência. Entender estas relações é importante para avançarmos no conhecimento da limnologia. Assim, o objetivo desta tese é investigar aspectos da alimentação e desenvolvimento de macroinvertebrados límnicos frente à variação na qualidade do recurso e temperatura do ambiente. No capítulo 1 analisamos a preferência alimentar do crustáceo *Aegla longirostri* através de experimentos padronizados com diferentes itens de origem vegetal e animal. Para os eglídeos, o condicionamento microbiano sobrepõe-se à qualidade química inicial da folha. Os eglídeos escolheram consumir o tecido animal, seguido de folhas condicionadas e como última opção alimentam-se de folhas não condicionadas, demonstrando preferência pelo item de maior qualidade nutricional. No capítulo 2 verificamos, em condições laboratoriais, se o aumento da temperatura da água modifica o consumo de folhas, a composição de metabólitos no hepatopâncreas e a atividade de *A. longirostri*. O consumo de folhas não diferiu entre as temperaturas estudadas (21 e 24° C). A quantidade de proteína foi maior em 21° C e os níveis de aminoácidos e glicogênio foram maiores em 24° C. Em temperaturas elevadas os eglídeos utilizam, no hepatopâncreas, energia proveniente da quebra de proteínas. Os animais mantidos a 24° C apresentaram menor nível de atividade, possivelmente uma estratégia para economizar energia. Estes resultados indicam que um futuro aumento da temperatura dos riachos, efeito do aquecimento global, afetará as populações de eglídeos alterando seu metabolismo e comportamento. No capítulo 3 investigamos a relação entre temperatura, crescimento e tamanho de adultos tricópteros. Realizamos um estudo em campo para verificar o tamanho dos adultos emergentes em diferentes temperaturas, utilizando o gradiente altitudinal como preditor da temperatura. Para verificar o crescimento em diferentes temperaturas fizemos um estudo experimental em laboratório com o tricóptero *Schizopelex festiva*. Constatamos que os tricópteros estudados seguem a “temperature-size rule - TSR”, pois em temperaturas mais elevadas os animais apresentam um tamanho do corpo menor (experimento em campo) e uma taxa de crescimento maior (experimento em laboratório). Com os resultados desta tese verificamos que o recurso alimentar e a temperatura são fatores que interferem diretamente na vida dos macroinvertebrados nos riachos de pequena ordem. Assim, um futuro aquecimento das massas de águas doce, devido ao aquecimento global, irá modificar suas comunidades, podendo ocorrer desequilíbrios nestes ecossistemas.

Palavras-chave: *Aegla longirostri*. Aeglidae. *Schizopelex festiva*. Temperature-size rule. Trichoptera.

ABSTRACT

FEEDING AND DEVELOPMENT OF LIMNIC MACROINVERTEBRATES RELATION TO RESOURCE QUALITY AND ENVIRONMENT TEMPERATURE

AUTHOR: Gláucia Bolzan Cogo

ADVISOR: Sandro Santos

The aquatic ecosystems exhibit a diversity of biotic and abiotic characteristics, which together determine their functioning. In these environments, the macroinvertebrates community depend on the conditions found in the streams for their survival. Understanding these relationships is important to advance on knowledge of limnology. Thus, the goal of this thesis is to investigate aspects of the feeding and development of limnic macroinvertebrates relation to variation in resource quality and environment temperature. In chapter 1, we analyzed the food preference of the crustacean *Aegla longirostri* through standardized experiments with different plant and animal items. For aeglids, the microbial conditioning overlaps the initial leaf chemical quality. The animals prefer to consume the animal tissue, followed by conditioned leaves and lastly feed on unconditioned leaves, demonstrating preference for higher nutritional quality item. In chapter 2, we verified, under laboratory conditions, if temperature increase modifies leaf consumption, metabolites composition of the hepatopancreas and *A. longirostri* activity. Leaf consumption did not differ between studied temperatures (21 and 24° C). The amount of protein was higher at 21° C, and the amino acid and glycogen levels were higher at 24° C. At high temperatures the aeglids use, in hepatopancreas, energy from protein breakdown. Animals kept at 24° C showed a lower activity level, possibly a strategy to save energy. This study indicates that a future temperature increase of water streams, due to global warming, will impact the aeglids populations by changing their metabolism and behavior. In chapter 3, we investigated the relationship between temperature, adult size and growth rate of caddisflies. We conducted a field study to verify the emergent adult size at different temperatures using the altitudinal gradient as a predictor of temperature. Additionally, we measure under laboratory conditions the temperature dependence growth rates under three temperature regimes with *Schizopelex festiva*. We observed that the animals studied follow the temperature-size-rule, at higher temperatures the animals have a smaller body size (field experiment) and a higher growth rate (laboratory experiment). With the results of this thesis, we verified that the food resource and the temperature are factors that directly interfere in macroinvertebrates life of low orders streams. Thus, future warming of the streams freshwater due to global warming will modify their communities, and imbalances may occur in these ecosystems.

Keywords: *Aegla longirostri*. Aeglidae. *Schizopelex festiva*. Temperature-size rule. Trichoptera.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE *AEGLA LONGIROSTRI*, UM MACROCONSUMIDOR DE RIACHOS SUBTROPICAIS

- Figura 1 – Consumo médio (mg.dia⁻¹) de folhas de *Ficus luschnathiana* não condicionadas ou incubadas no riacho por 8 e 16 dias, por *Aegla longirostri*. Linha contínua: mediana; Barras: quartis. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).....33
- Figura 2 – Consumo médio (mg.dia⁻¹) de folhas de *Luehea divaricata* e *Annona neosalicifolia*, por *Aegla longirostri*. Linha contínua: mediana; Barras: quartis. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).....34
- Figura 3 – Dureza (g) das folhas de *Luehea divaricata* e *Annona neosalicifolia* quando senescentes (T0) e quando condicionada no riacho por 42 dias (*L. divaricata*) ou lixiviadas no laboratório por 4 dias (*A. neosalicifolia*) (T1). * indica diferença significativa ($p < 0,05$).....35
- Figura 4 – Consumo médio (mg.dia⁻¹) de folhas de *Ficus luschnathiana* e filé de peixe, por *Aegla longirostri*. Linha contínua: mediana; Barras: quartis. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).....36

CAPÍTULO 2 - ENVIRONMENTAL WARMING INDUCES BEHAVIORAL AND METABOLIC CHANGES IN A FRESHWATER CRUSTACEAN - AEGLIDS AS A MODEL ORGANISM

- Figure 1 – Consumption and biochemical analyses. Mean \pm standard error of leaf consumption (A), the level of glycogen (B), protein (C) and amino acids (D) in the hepatopancreas of *Aegla longirostri* at 21° C and 24° C. Asterisks indicate significant differences between the groups.....53
- Figure 2 – Behavioral observations. Mean \pm standard error of the average activity scores at 22h (A) and % of time spent in categories (i) latency, ii) manipulate the food and iii) without food in 21° C and 24° C (B). Asterisks indicate significant differences between the groups.....54

CAPÍTULO 3 – TEMPERATURE INFLUENCE IN GROWTH RATE AND BODY SIZE OF CADDISFLIES

- Figure 1 – Traps for adult caddisflies. The trap consists of UV led strips attached to acrylic plates. The leds were fed by a 12 volts battery and rested over a bucket filled with water and some drops of detergent to break the surface tension. Insects attracted to the light fall on the water.....72

Figure 2 –	Right anterior wings of <i>Hydropsyche siltalai</i> and <i>Rhyacophila adjuncta</i> . The dotted line indicates the place of measurement. In <i>Hydropsyche</i> species the wing length was taken from the 2nd apical fork through the discoidal cell. In <i>R. adjuncta</i> wing length was measured 3rd apical fork through the medial cell.....	73
Figure 3 –	Wing size (mean \pm SE) of a) <i>Rhyacophila adjuncta</i> , b) <i>Hydropsyche ambigua</i> , and c) <i>Hydropsyche siltalai</i> collected in 400 (only <i>H. siltalai</i>), 800 e 1200 m of altitude. * = P < 0.05.....	76
Figure 4 –	Growth rates (mean + SE) of <i>Schizopelex festiva</i> kept in the laboratory at 10, 15 and 20° C. * = P < 0.05.....	77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE *AEGLA LONGIROSTRI*, UM MACROCONSUMIDOR DE RIACHOS SUBTROPICAIS

Tabela 1 – Características foliares (média \pm EP) das diferentes espécies analisadas antes da incubação nos riachos. N = nitrogênio, L = lignina, H = holocelulose, D = dureza.....32

CAPÍTULO 2 - ENVIRONMENTAL WARMING INDUCES BEHAVIORAL AND METABOLIC CHANGES IN A FRESHWATER CRUSTACEAN - AEGLIDS AS A MODEL ORGANISM

Table 1 – Description of the behaviors analyzed and their respective scores.....52

Table 2 – Mean \pm standard error of the variables analyzed in *Aegla longirostri* at 21° C and 24° C. CL: cephalothorax length. Time with food: time spent manipulating the food; Time without food: time without manipulating food (videotaped over a period of 600 s, only at night).....55

CAPÍTULO 3 – TEMPERATURE INFLUENCE IN GROWTH RATE AND BODY SIZE OF CADDISFLIES

Table 1 – Location of sites where adult caddisflies were sampled. Average air temperature was obtained from WorldClim database.....71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS E RECURSO ALIMENTAR.....	16
1.2 CRESCIMENTO E METABOLISMO	18
1.3 TEMPERATURA COMO FATOR REGULADOR.....	19
1.4 MACROINVERTEBRADOS UTILIZADOS COMO MODELO NOS ESTUDOS	21
1.5 ESTRUTURA DA TESE	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 CAPÍTULO 1 - PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE <i>AEGLA LONGIROSTRI</i>, UM MACROCONSUMIDOR DE RIACHOS SUBTROPICAIS	25
3.1 RESUMO	26
3.2 INTRODUÇÃO.....	27
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.3.1 Experimento 1 - O condicionamento microbiano da folha realmente é importante na escolha do recurso para os macroconsumidores?.....	29
3.3.2 Experimento 2 - O que é mais importante na escolha do recurso, o condicionamento microbiano ou qualidade inicial da folha?	30
3.3.3 Experimento 3 - Material animal ou vegetal condicionado?	30
3.3.4 Análise dos dados.....	31
3.4 RESULTADOS	31
3.4.1 Análise das características foliares	31
3.4.2 Experimento 1	32
3.4.3 Experimento 2	33
3.4.4 Experimento 3	35
3.5 DISCUSSÃO	36

3.6 AGRADECIMENTOS	39
3.7 REFERÊNCIAS	39
4 CAPÍTULO 2 - ENVIRONMENTAL WARMING INDUCES BEHAVIORAL AND METABOLIC CHANGES IN A FRESHWATER CRUSTACEAN - AEGLIDS AS A MODEL ORGANISM.....	43
4.1 ABSTRACT	46
4.2 INTRODUCTION	47
4.3 METHODS	49
4.3.1 Collection and maintenance of shredders	49
4.3.2 Experiment 1 - fragmentation and biochemical analyses	50
4.3.3 Experiment 2 - behavior	51
4.3.4 Statistical analysis.....	52
4.4 RESULTS	53
4.4.1 Experiment 1 - fragmentation and biochemical analyses	53
4.4.2 Experiment 2 - behavior	54
4.5 DISCUSSION.....	55
4.6 ACKNOWLEDGMENTS	59
4.7 REFERENCES	60
5 CAPÍTULO 3 – TEMPERATURE-SIZE RULE IN CADDISFLIES ALONG AN ALTITUDINAL GRADIENT	67
5.1 ABSTRACT	68
5.2 INTRODUCTION	69
5.3 MATERIAL AND METHODS.....	70
5.3.1 Field survey	70
5.3.2 Laboratorial experiment.....	73
5.3.3 Data analysis	74
5.4 RESULTS	75
5.4.1 Field survey	75

5.4.2 Laboratorial experiment	77
5.5 DISCUSSION.....	77
5.6 ACKNOWLEDGEMENTS	80
5.7 REFERENCES	80
6 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	87
7 REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS E RECURSO ALIMENTAR

Os ecossistemas fluviais variam em muitas características, desde a transparência da água até a composição da comunidade aquática. Esta diversidade de atributos e suas interações determinam o funcionamento dos rios e riachos. Os macroinvertebrados aquáticos, que compreendem principalmente insetos, crustáceos, anelídeos e moluscos, estão adaptados ao seu ambiente e apresentam diferentes habilidades de obtenção de alimento e modos de alimentação. Assim, são classificados dentro dos grupos alimentares funcionais (GAF) (CUMMINS, 1973; CUMMINS et al., 2005). Os raspadores pastam na superfície de pedras, plantas e folhas; os fragmentadores consomem matéria orgânica particulada grossa (MOPG), especialmente folhas; os coletores alimentam-se de matéria orgânica particulada fina (MOPF) da coluna de água (filtradores) ou do substrato (catadores); e os predadores alimentam-se de tecidos de outros animais.

De acordo com o “River Continuum Concept” de Vannote et al. (1980) os rios e riachos apresentam um gradiente contínuo de condições ambientais, de forma que diferentes locais apresentam grupos alimentares funcionais característicos. A cabeceira dos riachos (regiões de pequena ordem) geralmente é sombreada pela vegetação ripária, por isso a presença de organismos autótrofos é limitada ou ausente. Nestes locais a energia vem do material alóctone e os animais que se alimentam de MOPG e MOPF estão presentes em maior abundância, como fragmentadores e coletores. As regiões de maior ordem possuem maior luminosidade, onde estão presentes organismos autótrofos. Nestes locais os animais raspadores são dominantes, e alimentam-se de perifíton.

Em riachos florestados, a principal fonte de energia das cadeias alimentares são as folhas que caem da vegetação ripária (VANNOTE et al., 1980). Estas folhas são provenientes de diversas espécies arbóreas e, portanto, apresentam variações na sua estrutura e composição química. Assim, há diferenças no recurso alimentar disponível para os detritívoros, que apresentam preferências relacionadas ao consumo de folhas. Características como quantidade de carbono, nitrogênio, fósforo, compostos secundários, lignina, celulose, dureza e o condicionamento microbiano influenciam a escolha destes animais por um ou outro tipo de detrito (GRAÇA, 2001).

A qualidade nutricional de uma folha está relacionada especialmente a quantidade de nitrogênio e fósforo. O nitrogênio está associado às proteínas (FLINDT et al., 1999) e o fósforo

é utilizado na síntese de ATP, RNA, DNA e fosfolipídios (STERNER e ELSER, 2002). Devido a colonização microbiana que ocorre durante o processo de decomposição foliar, a quantidade de nitrogênio tende a aumentar, melhorando a qualidade nutricional da folha para os invertebrados (WEBSTER e BENFIELD, 1986). Detritos com altas concentrações de nitrogênio e baixa relação C:N são considerados mais nutritivos e preferidos pelos macroinvertebrados (GRAÇA et al., 2001).

Os compostos secundários (taninos, lignina, polifenóis) têm distribuição restrita e sua produção ocorre em locais da planta e períodos específicos. Eles funcionam como sinais químicos, como defesa das plantas e como protetores da radiação solar. Dentre os compostos secundários, taninos e lignina são os que mais influenciam na preferência alimentar dos detritívoros. Taninos podem inibir ou retardar a digestão e lignina confere resistência e rigidez para a parede celular, por isso muitos animais evitam alimentar-se de folhas com elevado teor destes compostos (GESSNER, 2005). Além disso, lignina apresenta baixo conteúdo nutricional para os invertebrados (GESSNER, 2005).

A celulose é um polissacarídeo estrutural e o principal componente da parede celular. Apesar de potencialmente representar uma fonte de carboidrato, sua estrutura é de difícil digestão para os animais (LINTON e GREENAWAY, 2007). Celulose e lignina são os principais constituintes estruturais das plantas (PÉREZ et al., 2002). Além de serem de difícil digestão e não preferidos pelos detritívoros, a presença de taninos, lignina e celulose retardam o processo de decomposição foliar (GESSNER, 2005). A dureza das folhas está relacionada a quantidade de lignina e celulose e pode ser estimada como a força necessária para perfurar a folha. Para invertebrados que não possuem aparelho bucal forte o suficiente para processar as folhas, a dureza pode ser uma barreira física que impede seu consumo. Larvas de insetos nos instares iniciais podem ser incapazes de alimentarem-se de folhas duras (NOLEN e PEARSON, 1993).

O condicionamento microbiano é o estabelecimento da comunidade de bactérias e fungos nas folhas, após sua queda dentro do riacho. É um processo importante para a decomposição do detrito foliar pois diminui a dureza e aumenta a qualidade nutricional da folha (CUMMINS, 1974; ALLAN e CASTILLO, 2007), tornando o detrito mais atrativo e preferido pelos fragmentadores (MATHURIAU e CHAUVET, 2002; BASTIAN et al., 2007; CHUNG e SUBERKROPP, 2009). Estudos que avaliaram o papel das bactérias indicam que sua biomassa nas folhas é menor que a de fungos (BALDY et al., 1995; WRIGHT e COVICH, 2005). Os fungos hifomicetos tem a habilidade de degradar lignina e celulose, com isso tornam as folhas mais macias e palatáveis para os fragmentadores (CANHOTO e GRAÇA, 1999). Animais

alimentados somente com folhas não condicionadas têm prejuízo no crescimento (GRAÇA et al., 1993; LAWSON et al., 1984), sobrevivência (BUELER, 1984) e output reprodutivo (GRAÇA et al., 1993). Além de preferir as folhas condicionadas, os fragmentadores são capazes de diferenciar folhas colonizadas por diferentes espécies de fungos, exibindo preferência entre elas (GONÇALVES et al., 2014).

Assim, folhas mais duras (resistentes à abrasão física) e com maiores concentrações de compostos secundários e estruturais podem ser de difícil consumo e restringir a atividade dos fragmentadores (RINCÓN e MARTÍNEZ, 2006). Folhas mais nutritivas (com altas concentrações de nitrogênio e baixa C:N) e condicionadas por fungos hifomicetos aquáticos tornam-se mais palatáveis e atraentes para os fragmentadores (MATHURIAU e CHAUVET, 2002; KONIG et al., 2014).

Folhas são o principal recurso alimentar utilizado pelos detritívoros, mas são de pior qualidade quando comparados com as partes reprodutivas das plantas (sementes, frutos) e com tecido animal. Os tecidos de origem animal são mais nutritivos pois apresentam maior quantidade de N do que o detrito foliar (LINTON e GREENAWAY, 2007). Alguns detritívoros incluem na sua dieta a ingestão de invertebrados, já os que possuem dieta exclusivamente de folhas tentam outras estratégias para obter a quantidade necessária de nutrientes. Foi sugerido que estes consumidores poderiam selecionar recursos com maiores concentrações de nutrientes limitantes (KIMMERER e POTTER, 1987; BUTLER et al., 1989) ou aumentar o consumo de alimentos com baixa qualidade nutricional para garantir a quantidade necessária de nutrientes (FINK e VON ELERT, 2006; KIFFER et al., 2018).

1.2 CRESCIMENTO E METABOLISMO

O crescimento dos animais pode ser expresso através do aumento no comprimento, peso, volume, largura ou demais variáveis do corpo (HARTNOLL, 1982) e é resultante do balanço entre o anabolismo e o catabolismo. Tudo isso é dependente de fatores externos como disponibilidade/qualidade do alimento e temperatura (HARTNOLL, 2001). Uma dieta pobre em itens nutritivos pode reduzir as taxas de crescimento dos consumidores (IVERSEN, 1974). Fragmentadores alimentados com folhas condicionadas e altas concentrações de nitrogênio têm taxas de crescimento maiores (ANDERSON e CUMMINS, 1979; CANHOTO e GRAÇA, 1995). Enquanto os que se alimentam de folhas com elevado teor de compostos refratários, têm crescimento reduzido (CANHOTO e GRAÇA, 1999).

Durante o seu ciclo de vida, os animais utilizam sua energia para atividades básicas como crescimento e reprodução e o excedente é utilizado para criar reservas energéticas. Manter um ambiente interno estável (homeostase) é energeticamente custoso e os organismos fazem isso através da utilização dos estoques de carboidratos, lipídios e proteínas (DALL e MORIARTY, 1983). Modificações na síntese e mobilização destes compostos ocorre durante mudanças no estado fisiológico do indivíduo, como durante a reprodução, muda, locomoção ou diferentes tipos de estresse. A relativa importância destas reservas e a ordem de utilização varia entre as espécies, estágio de vida e tipo de estresse (JIMENEZ e KINSEY, 2015).

Em crustáceos, o principal monossacarídeo presente na hemolinfa é a glicose (CHANG e O'CONNOR, 1983). Em altas concentrações a glicose é estocada na forma de glicogênio, principalmente no hepatopâncreas e músculos (VINAGRE e DA SILVA, 1992; OLIVEIRA et al., 2003; BUCKUP et al., 2008). Os lipídios são principalmente estocados no hepatopâncreas (CHANG e O'CONNOR, 1983; KUCHARSKI e DA SILVA, 1991), enquanto que proteínas são estocadas especialmente nos músculos e hepatopâncreas (CLAYBROOK, 1983; BUCKUP et al., 2008).

1.3 TEMPERATURA COMO FATOR REGULADOR

A temperatura é um fator que influencia desde as reações biológicas dos organismos até o ciclo do carbono nos ecossistemas (BROWN et al., 2004; DEMARS et al., 2011). Devido ao aumento de CO₂ na atmosfera e sua contribuição para o efeito estufa, está previsto um aumento na média da temperatura global do ar de até 4,8° C até 2100 (IPCC, 2014). Existe uma relação direta entre a temperatura do ar e da água (MORRILL et al., 2005), sendo que o aumento de 5° C na temperatura do ar pode levar ao aumento de até 3,3° C na temperatura da água dos rios e riachos (LANGAN et al., 2001; KOYCHEVA e KARNEY, 2009). As alterações globais no clima têm o potencial para trazer modificações a nível de indivíduo, população, comunidade e ecossistema (WALTHER et al., 2002, ACUÑA et al., 2008; DEMARS et al., 2011). Processos ecológicos como a mineralização do carbono e a produção primária são alterados com o aumento da temperatura (ACUÑA et al., 2008; DEMARS et al., 2011). Ao nível de espécies/populações as principais respostas ao aquecimento global são: mudanças no tamanho do corpo, na fenologia e na distribuição geográfica (WALTHER et al., 2002; PARMESAN e YOHE, 2003; DAUFRESNE et al., 2009).

Experimentos confirmam que o aumento da temperatura da água eleva as taxas de decomposição dos detritos vegetais devido ao aumento i) na lixiviação dos compostos solúveis

(CHERGUI e PATTEE, 1990), ii) na fragmentação e consumo por invertebrados (GONZÁLEZ e GRAÇA, 2003; AZEVEDO-PEREIRA et al., 2006) e iii) na atividade microbiana (BUZBY e PERRY, 2000, CANHOTO et al., 2016).

Os ectotérmicos aquáticos estão sob influência das variações térmicas ambientais, que levam a modificações nos seus processos fisiológicos. Dentro dos limites suportados pelas espécies, o aumento da temperatura altera o metabolismo, taxa de ingestão de alimento, taxa de crescimento, tamanho do corpo e o fitness dos animais. Elevações na temperatura da água geralmente aceleram o metabolismo (BROWN et al., 2004) induzindo um maior gasto de energia (FOUCREAU et al., 2014), maior taxa de ingestão de alimento (GONZÁLEZ e GRAÇA, 2003; FOUCREAU et al., 2016) e modificações nas reservas energéticas dos organismos aquáticos (MATOZZO et al., 2011; FOUCREAU et al., 2014).

Redução no tamanho do corpo de animais aquáticos ectotérmicos é considerada uma resposta ecológica universal do aquecimento global (DAUFRESNE et al., 2009). Essa ideia corrobora algumas regras que relacionam o tamanho do corpo e a taxa de crescimento com a temperatura. A regra de Bergmann prediz que as espécies com tamanho do corpo menor são encontradas em regiões com temperatura elevada (BERGMANN, 1847). Numa escala intraespecífica, a regra de James afirma que as populações com menor tamanho médio do corpo são encontradas em ambientes mais quentes (JAMES, 1970). “Temperature-size-rule (TSR)” afirma que, com o aumento da temperatura, o tamanho do corpo de ectotérmicos tende a diminuir e a taxa de crescimento tende a ser maior (ATKINSON, 1994). Maiores taxas de crescimento relacionadas à melhor qualidade do alimento resultam em adultos maiores, mas quando associadas à elevada temperatura resultam em adultos com tamanho reduzido (KINDLMANN et al., 2001). Em insetos aquáticos, crescimentos rápidos no estágio larval podem abreviar o tempo de desenvolvimento dos indivíduos resultando em precoce processo de empupamento, reduzido tamanho dos adultos e menor sucesso reprodutivo (GIBERSON e ROSENBERG, 1992; HOGG e WILLIAMS, 1996; ROFF, 2002; FISCHER e FIEDLER, 2002; SPÄNHOFF, 2005a, 2005b; MAS-MARTI et al., 2015). Elevação das temperaturas também diminuem o sucesso reprodutivo e a sobrevivência de crustáceos de água doce, especialmente os que vivem em locais com temperaturas mais frias (DI LASCIO et al., 2011).

Mudanças na fenologia das espécies estão sendo cada vez mais reportadas. Atualmente, alguns processos como a emergência de insetos adultos, migrações e floração das árvores, estão acontecendo mais cedo do que aconteciam nas últimas décadas (WALTHER et al., 2002; ROOT et al., 2003; PARMESAN e YOHE, 2003; GORDO e SANZ, 2005). Essas mudanças fenológicas podem modificar a dinâmica das interações entre consumidores e recursos nas teias

alimentares aquáticas e terrestres, pois muitas espécies do meio aquático servem de alimento para animais terrestres (MARCZAK e RICHARDSON, 2008; YANG e RUDOLF, 2010; GREIG et al., 2012). Relações entre espécies vegetais e seus polinizadores também podem ser modificadas, prejudicando principalmente os polinizadores mais especializados (MEMMOTT et al., 2007). O impacto das mudanças fenológicas na interação entre as espécies ainda não está bem compreendido (YANG e RUDOLF, 2010).

Outra resposta universal ao aquecimento global é a mudança na distribuição geográfica. As espécies tendem a mudarem seus limites de distribuição para altitudes mais elevadas e em direção aos pólos, onde a temperatura é menor (WALTHER et al., 2002; PARMESSAN e YOHE, 2003; PERRY et al., 2005; MENÉNDEZ et al., 2014). Estes fatos apontam para a importância de se compreender como o aquecimento global pode afetar as comunidades aquáticas e os processos ecossistêmicos que ocorrem nestes ambientes (COLE et al., 2007).

1.4 MACROINVERTEBRADOS UTILIZADOS COMO MODELO NOS ESTUDOS

Na presente tese utilizamos dois grupos distintos de macroinvertebrados: os crustáceos eglídeos e os insetos tricópteros.

A família Aeglidae é constituída por apenas um gênero existente com 85 espécies descritas (MORAES et al., 2017; ver também CRIVELLARO et al., 2017). São endêmicos das regiões temperadas e subtropicais no sul da América do Sul e ocorrem em ambientes de água doce. Diversos estudos indicam que os eglídeos são dependentes das condições ambientais como disponibilidade de oxigênio (DALOSTO e SANTOS, 2011), disponibilidade de matéria orgânica particulada (BÜCKER et al., 2008) e diferentes usos da terra (TREVISAN et al., 2009). *Aegla longirostri*, a espécie estudada, é um importante macroconsumidor omnívoro que atua no processo de fragmentação do detrito vegetal nos riachos (COGO e SANTOS, 2013), além de ser predador de outros organismos (SANTOS et al., 2008; CEREZER et al., 2016).

A ordem Trichoptera constitui um grupo de insetos holometábolos, com mais de 14.500 espécies existente (MORSE, 2018). Apresentam estágio imaturo aquático e adulto terrestre, com poucas exceções. A maioria das larvas se caracterizam pela confecção de casulos com seda e diversos materiais (folhas, pedras, areia), outras constroem redes e algumas não fabricam nada. A maioria dos adultos se distanciam pouco do local onde emergiram, vivem poucas semanas e não se alimentam na fase adulta.

1.5 ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está organizada em capítulos, sendo que cada capítulo é um artigo científico.

No capítulo 1 (Preferência alimentar de *Aegla longirostri*, um macroconsumidor de riachos subtropicais) analisamos a preferência alimentar de *Aegla longirostri* através de experimentos padronizados com diferentes itens de origem vegetal e animal. Acreditamos que, assim como os fragmentadores típicos, os eglídeos preferam detrito vegetal condicionado, com maior quantidade de nitrogênio e menor dureza. Ao ofertarmos material animal e vegetal acreditamos que irão preferir o material animal, visto que é um item mais completo nutricionalmente.

No capítulo 2 (Environmental warming induces behavioral and metabolic changes in a freshwater crustacean - aeglids as a model organism) verificamos, em condições laboratoriais, se o aumento da temperatura da água modifica o consumo de folhas, a composição de metabólitos no hepatopâncreas e a movimentação de *Aegla longirostri*. Esperamos que em temperatura maior do que aquela do ambiente natural o metabolismo dos eglídeos seja acelerado levando a um aumento no consumo de folhas e uma diminuição na reserva de glicogênio. Esperamos que os crustáceos utilizem a quebra do glicogênio para obter energia, sem haver mudanças nos níveis de proteínas e aminoácidos. Esperamos também que em temperatura mais elevada os animais terão redução da atividade locomotora como forma de economia de energia.

No capítulo 3 (Temperature-size rule in caddisflies along an altitudinal gradient) investigamos a relação entre temperatura, crescimento das larvas e tamanho dos adultos de tricópteros. Para isso realizamos um estudo em campo para verificar o tamanho dos adultos emergentes em diferentes temperaturas, utilizando o gradiente altitudinal como preditor da temperatura. Para verificar o crescimento em diferentes temperaturas fizemos um estudo experimental em laboratório com o tricóptero *Schizopelex festiva*. Com base na “temperature-size rule” esperamos que em temperaturas mais elevadas os animais apresentem um tamanho do corpo menor (experimento em campo), mas tenham uma taxa de crescimento maior (experimento em laboratório).

Os capítulos 1 e 2 foram realizados na Universidade Federal de Santa Maria com animais coletados em riachos subtropicais no sul do Brasil. O capítulo 3 foi realizado através do Programa de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE), sob a coorientação do Prof. Dr. Manuel Augusto Simões Graça. Este capítulo foi realizado na Universidade de Coimbra em riachos temperados em Portugal.

Os capítulos 1 e 3 ainda não foram submetidos a revistas, portanto seguem as normas do Manual de Dissertações e Teses da UFSM-2015. O capítulo 2 já está publicado e segue as normas da revista *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, exceto as figuras e tabelas que foram inseridas no corpo do texto para facilitar a leitura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese é investigar aspectos da alimentação e desenvolvimento de macroinvertebrados límnicos frente à variação na qualidade do recurso alimentar e temperatura do ambiente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Capítulo 1: Preferência alimentar de *Aegla longirostri*, um macroconsumidor de riachos subtropicais. Analisar a preferência alimentar de *Aegla longirostri* através de experimentos padronizados com diferentes itens de origem vegetal e animal.

2.2.2 Capítulo 2: Environmental warming induces behavioral and metabolic changes in a freshwater crustacean - aeglids as a model organism. Verificar, em condições laboratoriais, se o aumento da temperatura da água modifica o consumo de folhas, a composição de metabólitos no hepatopâncreas e a movimentação de *Aegla longirostri*.

2.2.3 Capítulo 3: Temperature-size rule in caddisflies along an altitudinal gradient. Investigar a relação entre temperatura, crescimento das larvas e tamanho dos adultos de tricópteros.

**3 CAPÍTULO 1 - PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE *AEGLA LONGIROSTRI*, UM
MACROCONSUMIDOR DE RIACHOS SUBTROPICAIS**

Preferência alimentar de *Aegla longirostri*, um macroconsumidor de riachos subtropicais

Gláucia Bolzan Cogo¹, Cristiane Biasi¹, Sandro Santos¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Departamento de Ecologia e Evolução, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

3.1 RESUMO

A fragmentação das folhas durante o processo de decomposição foliar é realizada principalmente por insetos imaturos, mas além destes há os macroconsumidores omnívoros. Este recurso alimentar disponível nos riachos tem variações na sua estrutura e composição química, e seus consumidores apresentam preferências por determinados detritos. Estudos sobre preferência alimentar com diferentes itens vegetais são abundantes, mas com macroconsumidores omnívoros incluindo itens de origem animal são escassos. Por isso, analisamos a preferência alimentar de *Aegla longirostri*, um macroconsumidor omnívoro, através de experimentos padronizados com diferentes itens de origem vegetal e animal. Realizamos três experimentos com oferta de diferentes itens: folhas não condicionadas, folhas condicionadas e filé de peixe. Para os eglídeos, o condicionamento microbiano sobrepõe-se à qualidade química inicial da folha. Folhas condicionadas apresentam maior qualidade nutricional e menor dureza, sendo preferidas pelos eglídeos. Além disso, o consumo de tecido animal foi maior que o de tecido vegetal. Os eglídeos preferem consumir o tecido animal, seguido de folhas condicionadas e como última opção alimentam-se de folhas não condicionadas, demonstrando preferência pelo item de maior qualidade nutricional.

Palavras-chave: Condicionamento. Detrito vegetal. Fragmentador. Omnivoria. Tecido animal.

3.2 INTRODUÇÃO

A matéria orgânica alóctone proveniente da vegetação ripária é a principal fonte de energia em riachos de pequena ordem, onde a produção primária autóctone é limitada devido ao sombreamento da cobertura vegetal (WALLACE et al., 1997; VANNOTE et al., 1980). Este material alóctone é composto principalmente de folhas (ABELHO e GRAÇA, 1998) e é o principal recurso alimentar da comunidade aquática. Ao cair no riacho, as folhas iniciam o processo de decomposição no qual atuam fungos, bactérias e animais fragmentadores. Os principais processos que contribuem para a degradação do detrito foliar são a lixiviação (eliminação dos compostos solúveis), o condicionamento microbiano (estabelecimento da comunidade de fungos e bactérias) e a fragmentação (quebra da matéria orgânica) (WEBSTER e BENFIELD, 1986).

Os fragmentadores típicos são organismos que transformam a matéria orgânica particulada grossa (MOPG) em matéria orgânica particulada fina (MOPF) e no ambiente aquático são representados principalmente por insetos imaturos. Além destes, animais omnívoros de maior porte, denominados macroconsumidores também atuam na fragmentação (CUMMINS, 1974). Nos riachos temperados a taxa de decomposição foliar é principalmente influenciada pela ação dos insetos fragmentadores típicos (WEBSTER e BENFIELD, 1986). Já nos ambientes tropicais e subtropicais os estudos indicam uma importante participação dos macroconsumidores omnívoros, como crustáceos decápodos (CROWL et al., 2001; MARCH et al., 2001; COGO e SANTOS, 2013) e moluscos (CHERGUI e PATTEE, 1991; YULE et al., 2009) e menor participação de insetos fragmentadores (BOYERO et al., 2015). Ambientes tropicais também se diferenciam por apresentarem maior diversidade de espécies na vegetação ripária, ou seja, apresentam maior variedade de detritos foliares para a comunidade aquática (GONÇALVES et al., 2014) do que nos ambientes temperados.

Devido a esta diversidade de espécies vegetais, o recurso alimentar disponível nos riachos tem variações na sua estrutura e composição química, e os detritívoros apresentam preferências relacionadas ao consumo. Características como quantidade de carbono, nitrogênio, fósforo, compostos secundários, lignina, celulose e dureza influenciam a escolha destes animais por um ou outro tipo de detrito (GRAÇA et al., 2001). Os fragmentadores preferem consumir folhas condicionadas (MATHURIAU e CHAUVET, 2002; BASTIAN et al., 2007; CHUNG e SUBERKROPP, 2009), com maior quantidade de nitrogênio (RINCÓN e MARTÍNEZ, 2006; CASSOTTI et al., 2015), menor dureza (LI e DUDGEON, 2008) e menor teor de taninos

(KÖNIG et al., 2014). Estas características tornam as folhas mais palatáveis e nutritivas para os consumidores (GRAÇA et al., 2001).

Grande parte dos estudos de preferência alimentar são realizados com fragmentadores típicos, são poucos os estudos com macroconsumidores omnívoros (EL HAG, 1984; CZERNIEJEWSKI et al., 2010; COLPO et al., 2012; FIDALGO et al., 2013; PELLAN et al., 2016). Apesar destes últimos possuírem dieta que não é restrita a itens de origem vegetal, os estudos abordam a preferência entre estes itens, sendo o material de origem animal geralmente negligenciado. Os tecidos de origem animal são mais nutritivos pois apresentam maior quantidade de N do que o detrito foliar (LINTON e GREENAWAY, 2007). Assim, a questão que se coloca é: as espécies omnívoras têm, de fato, uma preferência alimentar, ou se alimentam de um ou de outro recurso apenas em função de sua disponibilidade no ambiente?

Nos riachos da região sul da América do Sul os crustáceos eglídeos são importantes macroconsumidores omnívoros que atuam no processo de fragmentação do detrito vegetal (COGO e SANTOS, 2013), além de serem predadores de outros organismos (SANTOS et al., 2008; CEREZER et al., 2016). Sabendo-se da importância dos eglídeos na ciclagem de nutrientes e da diversidade de espécies vegetais que há em ambientes subtropicais, analisamos a preferência alimentar de *Aegla longirostri* através de experimentos padronizados com diferentes itens de origem vegetal e animal. Acreditamos que, assim como os fragmentadores típicos, os eglídeos prefiram detrito vegetal condicionado, com maior quantidade de nitrogênio e menor dureza. Ao ofertarmos material animal e vegetal acreditamos que prefiram o material animal, visto que é um item mais nutritivo. Três perguntas embasaram nossos experimentos, são elas: O condicionamento microbiano da folha realmente é importante na escolha do recurso para os macroconsumidores? (Experimento 1). O que é mais importante na escolha do recurso, o condicionamento microbiano ou a qualidade inicial da folha? (Experimento 2). Tendo a opção de se alimentarem com material animal e vegetal condicionado, o que uma espécie omnívora, como o crustáceo *Aegla longirostri*, irá preferir? (Experimento 3).

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Coletamos folhas senescentes das espécies *Annona neosalicifolia* (ariticum), *Ficus luschnathiana* (figueira) e *Luehea divaricata* (açoita-cavalo), algumas espécies vegetais que compõem a vegetação ripária dos riachos onde vivem *Aegla longirostri*, para a caracterização das espécies. Após a coleta, utilizamos uma parte das folhas para as análises e outra parte armazenamos para posterior utilização nos experimentos. Para quantificar a qualidade das

folhas, analisamos o teor de nitrogênio, carbono, lignina, holocelulose e dureza. Quantificamos a concentração de nitrogênio das folhas seguindo o método de Kjeldahl (MIYAZAWA et al., 1999) e de lignina e holocelulose conforme as normas da Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). Determinamos somente o teor de holocelulose das amostras, não sendo diferenciada as porcentagens de hemicelulose e celulose. Calculamos o carbono total das folhas através da quantidade de matéria orgânica (MO) das folhas ($C = 0,47 \times MO$; HAUER e LAMBERTI, 2007). Medimos a dureza das folhas utilizando um penetrômetro construído com duas placas de acrílico com um pino de metal na vertical colado a um suporte de acrílico. Fizemos as medições após hidratação das folhas por 30 minutos. Os resultados são expressos como a massa (em gramas) necessária para o pino de metal (0.9 mm de diâmetro) romper o disco de folha (GRAÇA et al., 2005).

Coletamos os exemplares de *A. longirostri*, levamos ao laboratório e mantivemos os animais aclimatados por sete dias, em aquários individuais, oxigenados, com temperatura de $\sim 18^\circ \text{C}$, com a presença de pedras e alimentação *ad libitum* (folhas condicionadas coletadas no riacho). Utilizamos nos experimentos somente indivíduos machos e em intermuda, visto que antes de ocorrer a muda os animais ficam um período sem alimentação (comunicação pessoal). Após a aclimatação trocamos a água dos aquários, deixamos os animais em jejum por quatro dias e iniciamos o experimento com a adição dos itens alimentares. Em todos os experimentos cortamos as folhas em discos e cada animal recebeu discos dos diferentes itens. Quando consumido aproximadamente 70% de um item, ofertamos novamente para que o indivíduo sempre tivesse os diferentes itens a sua disposição. Além disso, mantivemos um aquário controle com os itens alimentares sem a presença do eglídeo, para verificar a perda de massa devido à lixiviação e ação dos micro-organismos. Após o término do experimento (três ou quatro dias) secamos os discos remanescentes em estufa (45°C por 96h) e calculamos o consumo de cada item.

3.3.1 Experimento 1 - O condicionamento microbiano da folha realmente é importante na escolha do recurso para os macroconsumidores?

Realizamos este experimento para verificar a importância do condicionamento microbiano na preferência dos eglídeos. Para tal oferecemos aos animais folhas de *F. luschnathiana* previamente condicionadas no riacho em malha fina (abertura de malha de $500\mu\text{m}$) por 8 e 16 dias e folhas não condicionadas. Escolhemos esta espécie vegetal especialmente por saber que é uma espécie consumida pelos eglídeos (estudos prévios; COGO

e SANTOS, 2013). Portanto, cada indivíduo recebeu três discos de folhas diferentes para efetuar sua escolha. O experimento teve a duração de três dias e utilizamos 18 exemplares de *A. longirostri*. O tamanho médio do comprimento da carapaça dos animais foi de $20,8 \pm 0,5$ mm.

3.3.2 Experimento 2 - O que é mais importante na escolha do recurso, o condicionamento microbiano ou qualidade inicial da folha?

Realizamos este experimento para verificar se o mais importante para a preferência dos eglídeos é o tempo de condicionamento da folha no riacho ou a qualidade nutricional inicial da folha. Para isso escolhemos duas espécies com teores de lignina e holocelulose semelhantes, mas com diferentes níveis de nitrogênio (lignina: $t = 1,49$; $GL = 3$; $p = 0,23$; holocelulose: $t = -1,11$; $GL = 4$; $p = 0,33$; ver tabela 1). Colocamos a espécie *L. divaricata*, considerada de pior qualidade (menor quantidade de nitrogênio, maior C:N e maior Lignina+Holocelulose/N), condicionar no riacho por 42 dias (em *litter bags* de malha fina de $500\mu\text{m}$). Já a espécie *A. neosalicifolia*, considerada nutritiva (maior quantidade de nitrogênio, menor C:N e menor Lignina+Holocelulose/N), foi apenas lixiviada no laboratório por quatro dias. Para a lixiviação colocamos as folhas em um aquário com oxigenação e realizamos a troca da água diariamente. Após estes processos medimos novamente a dureza das folhas e oferecemos aos eglídeos. O experimento teve a duração de quatro dias e utilizamos 17 exemplares de *A. longirostri*. O tamanho médio do comprimento da carapaça dos eglídeos utilizados neste experimento foi de $19,65 \pm 0,5$ mm.

3.3.3 Experimento 3 - Material animal ou vegetal condicionado?

Realizamos este experimento para verificar a preferência alimentar dos eglídeos entre material de origem animal e vegetal. Para isso ofertamos aos eglídeos filé de peixe vendido comercialmente (porção de 60g contém: valor energético = 64 Kcal; carboidratos = 0g; proteínas = 10g; gorduras totais = 2,4g; sódio = 46mg) e discos de folhas de *F. luschnathiana* previamente condicionadas no riacho por 14 dias (em *litter bags* de malha fina de $500\mu\text{m}$). Utilizamos folhas de *F. luschnathiana* pois baseado nos experimentos 1 e 2 foi o item que teve maior taxa de consumo. Para quantificar o consumo de material animal cortamos o filé de peixe em cubos, pesamos e armazenamos em potes individuais contendo uma etiqueta com sua massa úmida. Ofertamos parte destes cubos de filé de peixe aos eglídeos e a outra parte secamos em estufa para a determinação da massa seca inicial. Com os dados da massa seca realizamos uma

regressão linear e a equação da reta resultante foi utilizada para calcular a massa seca inicial de filé de peixe recebida por cada eglídeo. Diariamente retiramos os itens alimentares remanescentes e adicionamos uma nova porção de cada item. Somente neste experimento trocamos a água dos aquários diariamente, pois a oferta de material animal pode comprometer a qualidade da água. O experimento teve a duração de três dias e utilizamos 11 exemplares de *A. longirostri*. O tamanho médio do comprimento da carapaça dos eglídeos utilizados no experimento foi de $20,31 \pm 0,5$ mm.

3.3.4 Análise dos dados

O consumo dos detritos foliares correspondeu a perda da massa foliar obtida na presença do fragmentador, menos o valor da perda de massa foliar obtida nos aquários sem os eglídeos, dividido pelo número de dias de experimento. Calculamos o consumo do material animal subtraindo a massa seca remanescente da massa seca recebida. Verificamos a normalidade e homocedasticidade dos dados, para posterior escolha de testes paramétricos ou não paramétricos. Para verificar diferenças no consumo dos itens alimentares realizamos o teste de Kruskal-Wallis com posterior teste Dunn com os dados do experimento 1 e o teste t com os dados dos experimentos 2 e 3. Verificamos diferenças na qualidade das folhas através do teste t ou Mann-Whitney. Realizamos todas as análises no programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Análise das características foliares

As folhas de *A. neosalicifolia* foram consideradas o detrito de melhor qualidade por apresentaram maior teor de nitrogênio e menor relação C:N e L+H/N. As folhas de *L. divaricata* apresentaram menor teor de nitrogênio e maior relação C:N e L+H/N, portanto foram consideradas de pior qualidade (Tabela 1).

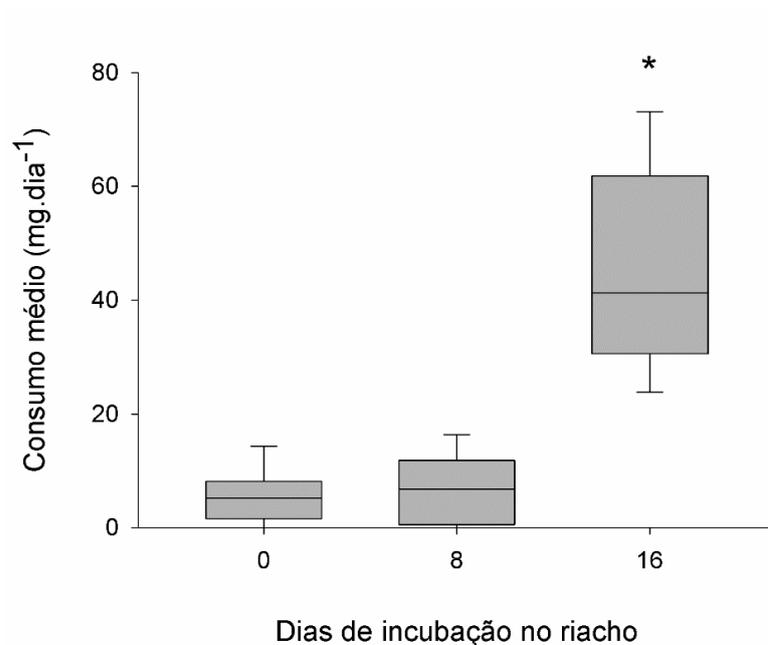
Tabela 1 – Características foliares (média \pm EP) das diferentes espécies analisadas antes da incubação nos riachos. N = nitrogênio (%), C = carbono (%), L = lignina (%), H = holocelulose (%), D = dureza (g).

Espécie	N	C	L	H	C:N	L+H/N	D
<i>Annona neosalicifolia</i>	2,25	41,88	27,64 \pm 0,3	41,67 \pm 0,5	18,6	30,81	170,2 \pm 7,4
<i>Ficus luschnathiana</i>	1,37	42,84	24,64 \pm 0,4	45,39 \pm 0,6	31,4	51,30	313,7 \pm 16,2
<i>Luehea divaricata</i>	1,20	43,28	27,12 \pm 0,1	44,49 \pm 2,5	36,0	59,63	149,9 \pm 6,4

3.4.2 Experimento 1

Houve diferença no consumo das folhas de *F. luschnathiana* com diferentes dias de incubação no riacho (Kruskal-Wallis; $H = 32,38$; $GL = 2$; $p < 0,0001$). O consumo das folhas com 16 dias de incubação foi maior que as demais, mas não houve diferença no consumo entre a folha condicionada por 8 dias no riacho e a folha não condicionada (Figura 1). O consumo médio ($\text{mg}\cdot\text{dia}^{-1}$) foi de $6,21 \pm 1,6$ para folhas não incubadas no riacho, e de $7,38 \pm 1,5$ e $45,53 \pm 4,3$ para folhas incubadas no riacho por 8 e 16 dias, respectivamente.

Figura 1 – Consumo médio ($\text{mg}\cdot\text{dia}^{-1}$) de folhas de *Ficus luschnathiana* não condicionadas ou incubadas no riacho por 8 e 16 dias, por *Aegla longirostri*. Linha contínua: mediana; Barras: quartis. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).



3.4.3 Experimento 2

Houve maior consumo de folhas de *L. divaricata* ($23,23 \pm 2,9 \text{ mg}\cdot\text{dia}^{-1}$) do que de *A. neosalicifolia* ($3,44 \pm 0,7 \text{ mg}\cdot\text{dia}^{-1}$), confirmando uma preferência pela folha condicionada no riacho e que inicialmente apresentava menor qualidade nutricional (Test t; $t = 7,14$; $GL = 16$; $p < 0,0001$) (Figura 2). A dureza das folhas utilizadas no experimento (T1) diferiu, sendo menor em *L. divaricata* (Mann-Whitney; $Z = 3,55$; $p < 0,0004$) (Figura 3). Comparando com os valores de dureza das folhas senescentes (T0), o processo de lixiviação no laboratório não alterou a dureza das folhas de *A. neosalicifolia* (Test t; $t = 1,39$; $GL = 18$; $p < 0,18$), já o condicionamento no riacho diminuiu a dureza das folhas de *L. divaricata* (Mann-Whitney; $Z = 3,46$; $p < 0,0005$).

Figura 2 – Consumo médio ($\text{mg}\cdot\text{dia}^{-1}$) de folhas de *Luehea divaricata* e *Annona neosalicifolia*, por *Aegla longirostri*. Linha contínua: mediana; Barras: quartis. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).

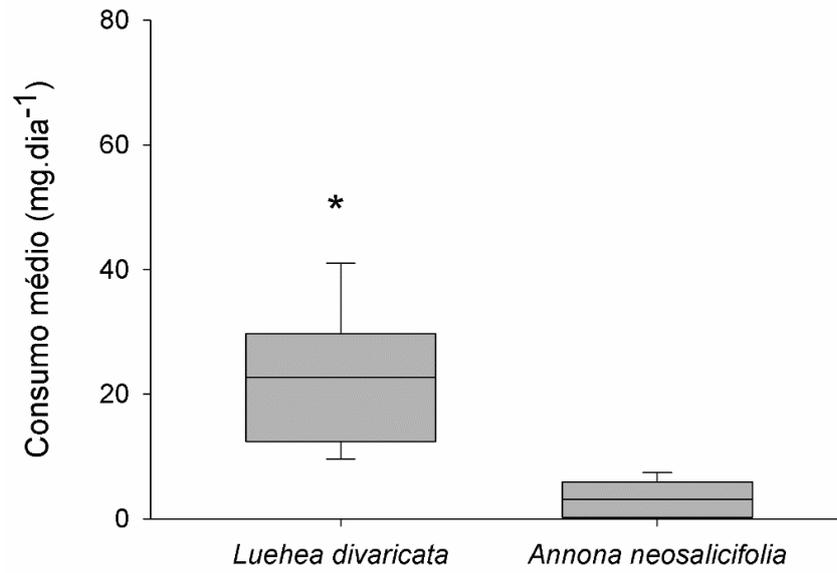
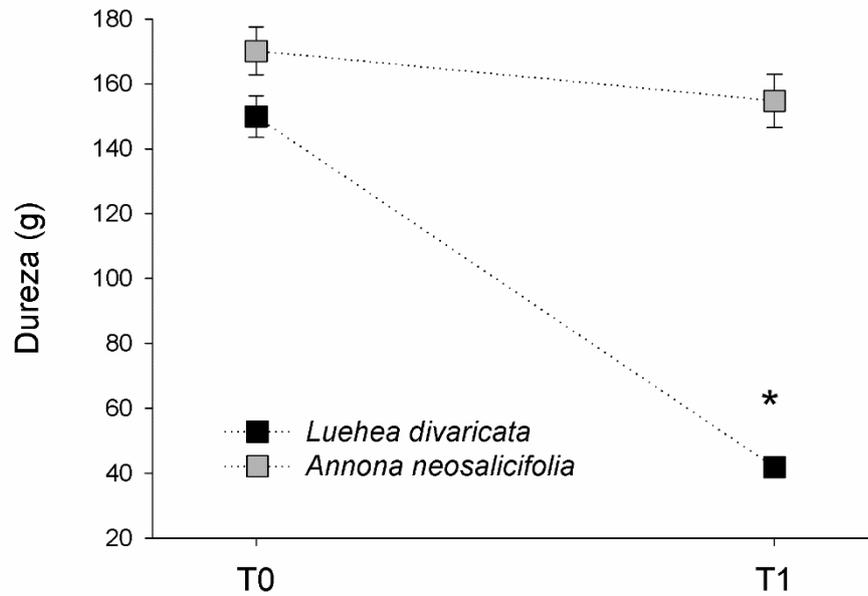


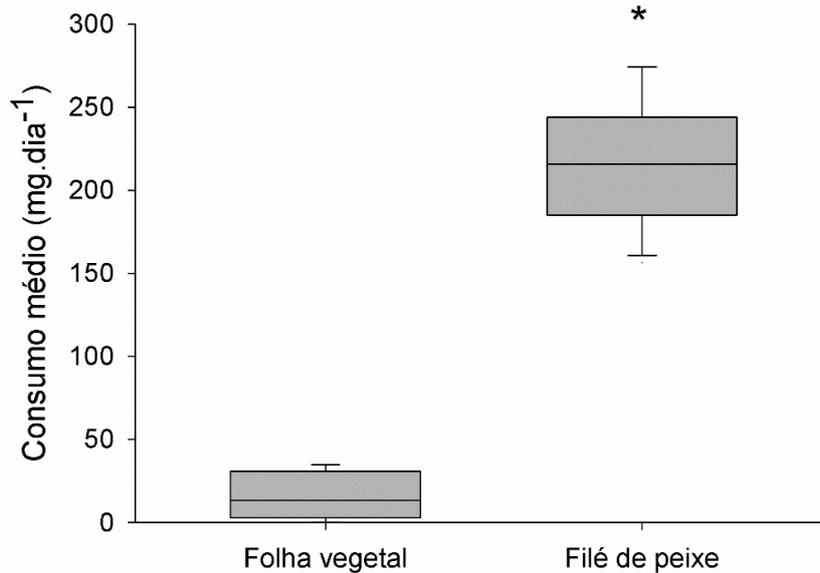
Figura 3 – Dureza (g) das folhas de *Luehea divaricata* e *Annona neosalicifolia* quando senescentes (T0) e quando condicionada no riacho por 42 dias (*L. divaricata*) ou lixiviadas no laboratório por 4 dias (*A. neosalicifolia*) (T1). * indica diferença significativa ($p < 0,05$).



3.4.4 Experimento 3

Os eglídeos consumiram $215,16 \pm 10,9 \text{ mg.dia}^{-1}$ de filé de peixe e $16,07 \pm 4,1 \text{ mg.dia}^{-1}$ de folhas de *F. luschnathiana*, demonstrando preferência pelo material de origem animal (Test t; $t = -17,2$; GL = 10; $p < 0,0001$) (Figura 4).

Figura 4 – Consumo médio ($\text{mg}\cdot\text{dia}^{-1}$) de folhas de *Ficus luschnathiana* e filé de peixe, por *Aegla longirostri*. Linha contínua: mediana; Barras: quartis. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).



3.5 DISCUSSÃO

Corroborando seu status de omnívoro oportunista, *Aegla longirostri* consumiu os vários itens alimentares oferecidos nos experimentos, entretanto, demonstrou preferência por tecido animal. Nosso estudo (experimentos 1 e 2) demonstrou que, para os eglídeos, o condicionamento microbiano sobrepõe-se à qualidade química inicial da folha. O condicionamento é o estabelecimento da comunidade microbiana, especialmente fungos hifomicetos, nas folhas (CUMMINS, 1974). Diversos estudos indicam a preferência dos detritívoros por folhas condicionadas do que não condicionadas (GRAÇA et al., 1993; FRIBERG e JACOBSEN, 1994; GRAÇA et al., 2001). Este processo aumenta a palatabilidade das folhas através da diminuição da dureza, aumento da quantidade de nitrogênio e degradação dos compostos secundários através da liberação de enzimas produzidas pelos fungos (SUBERKROPP, 1998; GRAÇA et al., 1993; GRAÇA, 2001), tornando-as um recurso atrativo. O consumo de folhas não condicionadas e de folhas com 8 dias de condicionamento no riacho não diferiu (experimento 1). Este resultado sugere que 8 dias no riacho não foi tempo suficiente

para o estabelecimento da comunidade microbiana ou eliminação dos compostos secundários, tornando estas folhas semelhantes em sua qualidade nutricional. Tonin et al. (2014) observaram, em espécies de famílias diferentes deste estudo, que compostos secundários como taninos e polifenóis totais diminuíram consideravelmente a partir de sete dias de imersão no riacho.

Apesar da espécie *Annona neosalicifolia* apresentar melhor qualidade química inicial, os eglídeos preferiram a espécie *Luehea divaricata* condicionada no riacho (experimento 2). A principal diferença entre as folhas senescentes destas espécies era a quantidade de N, o que provavelmente tornou-se semelhante com o condicionamento de *L. divaricata*. Assim, a preferência deve-se especialmente a diminuição da dureza promovida pelo condicionamento. Inicialmente ambas espécies apresentavam níveis parecidos de dureza, lignina e holocelulose, mas após o condicionamento a dureza das folhas de *L. divaricata* diminuiu consideravelmente, tornando-se mais macias que as folhas de *A. neosalicifolia*. A dureza, que está relacionada a quantidade de lignina e celulose, diminuiu durante o condicionamento pois estes compostos foram degradados pela comunidade de fungos hifomicetos (SUBERKROPP, 1998; GESSNER et al., 1999; ABMANN et al., 2011). Detritos com maior tempo de condicionamento tornam-se mais macios e são preferidos pelos detritívoros (LIGEIRO et al., 2010; BIASI et al., 2013). Outros estudos sugerem que a dureza, mais do que a qualidade nutricional e teor de compostos secundários das folhas é determinante na preferência alimentar de detritívoros e nas taxas de decomposição foliar (ARDÓN e PRINGLE, 2008; FERREIRA et al., 2012; KIFFER et al., 2018). Apesar dos eglídeos possuírem quelas e mandíbulas que os auxiliam a cortar as folhas, eles consideraram a dureza das mesmas na escolha do detrito.

Fragmentadores tem diferenças na habilidade de digerir compostos como taninos, lignina, celulose (BÄRLOCHER e PORTER, 1986). Alguns conseguem digerir a celulose através da atividade de microrganismos simbióticos no intestino, enquanto outros são capazes de produzir enzimas específicas. É reportado a presença de enzimas digestivas de celulose ou a presença do gene que sintetiza estas enzimas para várias espécies de crustáceos (LINTON e GREENAWAY, 2007). Não sabemos ainda sobre a capacidade dos eglídeos de digerir celulose, mas acreditamos que algum mecanismo existe, já que o detrito foliar é bastante comum na dieta destes animais. Entretanto, mesmo que tenham essa capacidade eles preferiram folhas mais condicionadas, com menor teor de celulose.

De uma forma geral, os estudos indicam que folhas mais duras, com maiores concentrações de compostos secundários e estruturais podem ser de difícil consumo e restringir a atividade dos detritívoros. Ao contrário, folhas mais nutritivas (com altas concentrações de nitrogênio e baixa C:N) e condicionadas por fungos aquáticos tornam-se mais palatáveis e

atraentes para os fragmentadores (MATHURIAU e CHAUVET, 2002; RINCÓN e MARTÍNEZ, 2006; LI e DUDGEON, 2008; LIGEIRO et al, 2010; BIASI et al., 2013; FIDALGO et al., 2013; KONIG et al., 2014; CASOTTI et al., 2015; KIFFER et al., 2018). Nosso estudo corrobora essas afirmações já que indicam uma preferência dos eglídeos, um macroconsumidor omnívoro, por folhas mais condicionadas e com menor dureza. Acreditamos que o fator decisivo seja o estabelecimento da comunidade de fungos nas folhas, o que indiretamente diminui a dureza e aumenta a qualidade nutricional da folha.

Folhas são o principal recurso alimentar utilizado pelos detritívoros, mas são de pior qualidade quando comparados com as partes reprodutivas das plantas e com tecido animal. Além de consumirem detritos (COGO e SANTOS, 2013), os eglídeos incluem na sua dieta material de origem animal, já que são predadores de outros organismos (SANTOS et al., 2008; CEREZER et al., 2016). Quando ofertados ambos itens (experimento 3), os eglídeos consumiram, em maior quantidade, o material de origem animal. Esta preferência pode ser explicada pela maior qualidade nutricional dos tecidos animais, que apresentam maior quantidade de N do que o detrito foliar (LINTON e GREENAWAY, 2007). Embora o recurso de origem animal fosse abundante e de fácil acesso, os eglídeos não deixaram de consumir o recurso vegetal. Isto indica que apesar de não ser a fonte de alimento mais nutritiva ela deve ser considerada na sua dieta. Santos et al. (2008) encontraram maior abundância de detrito vegetal no conteúdo estomacal de *Aegla longirostri* e no presente estudo encontramos preferência por tecido animal. Esta discrepância pode acontecer por dois motivos. Pode ser difícil distinguir, no conteúdo estomacal, o tecido animal digerido do detrito vegetal, especialmente se a presa foi ingerida há bastante tempo. Outro motivo pode ser o hábito omnívoro oportunista dos eglídeos, ou seja, alimentam-se conforme a disponibilidade/abundância dos recursos. Durante o experimento, o tecido animal era de fácil acesso e abundante, mas no ambiente natural os eglídeos necessitariam capturar suas presas, o que é mais custoso e possivelmente explicaria a baixa abundância deste material no conteúdo estomacal. O detrito vegetal no ambiente em que estes animais vivem está presente durante o ano todo (COGO e SANTOS, 2013). O consumo de tecido animal neste estudo pode estar superestimado devido à não obrigação dos eglídeos de capturar as presas. Médoc et al. (2011) descobriram que o consumo de presas por gamarídeos foi reduzido quando estas estavam vivas. Experimentos adicionais são necessários para testar se o custo da captura de presas vivas altera a preferência alimentar dos eglídeos.

Em síntese, os eglídeos preferem consumir o tecido animal, seguido de folhas condicionadas e como última opção alimentam-se de folhas não condicionadas. Neste estudo colocamos a seguinte pergunta: as espécies omnívoras têm, de fato, uma preferência alimentar,

ou se alimentam de um ou de outro recurso apenas em função de sua disponibilidade no ambiente? Verificamos que, de fato, os eglídeos apresentam preferência pelo item de maior qualidade nutricional. A questão que fica para estudos futuros é se sua dieta é variável por necessidades nutricionais. Nossos resultados corroboram o status de macroconsumidor omnívoro de *A. longirostri* e reforça a importância destes animais para a ciclagem de nutrientes e para a cadeia trófica de riachos de baixa ordem.

3.6 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa para Gláucia Bolzan Cogo e Cristiane Biasi e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de produtividade para Sandro Santos. Agradecemos também o Sr. Graciano Sonogo por permitir a entrada em sua propriedade para a coleta dos eglídeos.

3.7 REFERÊNCIAS

- ABELHO, M.; GRAÇA, M. A. S. Litter in a first-order stream of a temperate deciduous forest (Margarça Forest, central Portugal). **Hydrobiologia**, v. 386, p. 147–152. 1998.
- ABMANN, C. et al. Consequences of the colonization of leaves by fungi and oomycetes for leaf consumption by a gammarid shredder. **Freshwater Biology**, v. 56, p. 839–852. 2011.
- ARDÓN, M., PRINGLE, C. M. Do secondary compounds inhibit microbial- and insect-mediated leaf breakdown in a tropical rainforest stream, Costa Rica? **Oecologia**, v. 155, p. 311–323. 2008.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: 364 p. 2007.
- BASTIAN, M. et al. Leaf litter diversity and shredder preferences in an Australian tropical rainforest stream. **Journal of Tropical Ecology**, v. 23, p. 219–229. 2007.
- BÄRLOCHER, F.; PORTER, C. W. Digestive enzymes and feeding strategies of three stream invertebrates. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 5, p. 58–66. 1986.
- BIASI, C. et al. The colonisation of leaf litter by Chironomidae (Diptera): the influence of chemical quality and exposure duration in a subtropical stream. **Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters**, v. 43, p. 427–433. 2013.

- BOYERO, L. et al. Leaf-litter breakdown in tropical streams: is variability the norm? **Freshwater Science**, v. 34, p. 759–769. 2015.
- CASOTTI, C. G.; KIFFER, W. P. JR.; MORETTI, M. S. Leaf traits induce the feeding preference of a shredder of the genus *Triplectides kolenati*, 1859 (Trichoptera) in an Atlantic Forest stream, Brazil: a test with native and exotic leaves. **Aquatic Insects**, v. 36, p. 43–52. 2015.
- CEREZER, C. et al. Avoid predation or take risks in basic activities? Predator-prey relationship in subtropical streams between decapods and caddisflies. **Marine and Freshwater Research**, v. 67, p. 1880–1887. 2016.
- CHERGUI, H.; PATTEE, E. The processing of leaves of trees and aquatic macrophytes in the network of the River Rhone. **Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie**, v. 75, p. 281–302. 1990.
- CHUNG, N.; SUBERKROPP, K. Contribution of fungal biomass to the growth of the shredder, *Pycnopsyche gentilis* (Trichoptera: Limnephilidae). **Freshwater Biology**, v. 54, p. 2212–2224. 2009.
- COGO, G. B.; SANTOS, S. The role of aeglids in shredding organic matter in Neotropical streams. **Journal of Crustacean Biology**, v. 33, p. 519–526. 2013.
- COLPO, K. D. et al. Feeding preference of the South American endemic anomuran *Aegla platensis* (Decapoda, Anomura, Aegliidae). **Naturwissenschaften**, v. 99, p. 333–336. 2012.
- CROWL, T. A. et al. Freshwater shrimp effects on detrital processing and nutrients in a tropical headwater stream. **Ecology**, v. 82, p. 775–783. 2001.
- CUMMINS, K. W. Structure and function of stream ecosystems. **Bioscience**, v. 24, p. 631–641. 1974.
- CZERNIEJEWSKI, P.; RYBCZYK, A.; WAWRZYNIAK, W. Diet of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853, and the potential effects of the crab on the aquatic community in the river Odra/Oder estuary (N.-W. Poland). **Crustaceana**, v. 83, p. 195–205. 2010.
- EL HAG, E. A. Food and food selection of the penaeid prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). **Hydrobiologia**, v. 110, p. 213–217. 1984.
- FERREIRA, V.; ENCALADA, A. C.; GRAÇA, M. A. S. Effects of litter diversity on decomposition and biological colonization of submerged litter in temperate and tropical streams. **Freshwater Science**, v. 31, p. 945–962. 2012.
- FIDALGO, M. L.; FERREIRA, C.; SAMPAIO, A. Assessment of the preferences of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) fed with Riparian tree leaves: A microcosm study. **International Review of Hydrobiology**, v. 98, p. 183–190. 2013.
- FRIBERG, N.; JACOBSEN, D. Feeding plasticity of two detritivore-shredders. **Freshwater Biology**, v. 32, p. 133–142. 1994.

- GESSNER, M. O.; CHAUVET, E.; DOBSON, M. A perspective on leaf litter breakdown in stream. **Oikos**, v. 85, p. 377-384. 1999.
- GONÇALVES, J. F. Jr. et al. Relationship between dynamics of litterfall and riparian plant species in a tropical stream. **Limnologica**, v. 44, p. 40–48. 2014.
- GRAÇA, M. A. S. The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams e a review. **International Review of Hydrobiology**, v. 86, p. 383-393. 2001.
- GRAÇA, M. A. S.; BÄRLOCHER, F.; GESSNER, M. O. **Methods to study litter decomposition**. A practical guide. Springer: The Netherlands, Dordrecht, 329 p., 2005.
- GRAÇA, M. A. S.; MALTBY, L.; CALOW, P. Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* I: feeding strategies. **Oecologia**, v. 93, p. 139–144. 1993.
- GRAÇA, M. A. S. et al. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. **Freshwater Biology**, v. 46, p. 947–957. 2001.
- HAUER, R; LAMBERTI, G. A. **Methods in Stream Ecology**. Elsevier: Oxford, 2 ed. 878p., 2007.
- KIFFER, W. P. Jr. et al. Exotic Eucalyptus leaves are preferred over tougher native species but affect the growth and survival of shredders in an Atlantic Forest stream (Brazil). **PLoS ONE**, 13, e0190743. 2018.
- KÖNIG, R.; HEPP, L. U.; SANTOS, S. Colonisation of low- and high-quality detritus by benthic macroinvertebrates during leaf breakdown in a subtropical stream. **Limnologica**, v. 45, p. 61–68. 2014.
- LI, A. O. Y; DUDGEON, D. Food resources of shredders and other benthic macroinvertebrates in relation to shading conditions in tropical Hong Kong streams. **Freshwater Biology**, v. 53, p. 2011–2025. 2008.
- LIGEIRO, R. et al. What is more important for invertebrate colonization in a stream with low-quality litter inputs: exposure time or leaf species? **Hydrobiologia**, v. 654, p. 125–136. 2010.
- LINTON, S. M.; GREENAWAY, P. A review of feeding and nutrition of herbivorous land crabs: adaptations to low quality plant diets. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 177, p. 269–286. 2007.
- MARCH, J. G. et al. Linking shrimp assemblages with rates of detrital processing along an elevational gradient in a tropical stream. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 58, p. 470–478. 2001.
- MATHURIAU, C.; CHAUVET, E. Breakdown of leaf litter in a neotropical stream. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 21, p. 384–396. 2002.
- MÉDOC, V. et al. Parasite-induced changes in the diet of a freshwater amphipod: field and laboratory evidence. **Parasitology**, v. 138, p. 537–546. 2011.

- MIYAZAWA, M. et al. Análises químicas de tecido vegetal. In: SILVA, F. C. (Org.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, cap. 4, p. 171–224. 1999.
- PELLAN, L. et al. Feeding choice and predation pressure of two invasive gammarids, *Gammarus tigrinus* and *Dikerogammarus villosus*, under increasing temperature. **Hydrobiologia**, v. 781, p. 43–54. 2016.
- RINCÓN, J.; MARTÍNEZ, I. Food quality and feeding preferences of *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae) **Journal of North American Benthological Society**, v. 25, p. 209–215, 2006.
- SANTOS, S., et al. Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aegliidae). **Journal of Natural History**, v. 42, p. 1027–1037. 2008.
- SUBERKROPP, K. Effect of dissolved nutrients on two aquatic hyphomycetes growing on leaf litter. **Mycological Research**, v. 102, p. 998–1002. 1998.
- TAPPI Technical Association of the Pulp & Paper Industry. **Tappi Standard Methods**. Atlanta, 1900 p., 2004-2005.
- TONIN, A. M.; RESTELLO, R. M.; HEPP, L. U. Chemical changes of leaves during breakdown affects associated invertebrates in a subtropical stream. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, p. 235–244. 2014.
- VANNOTE, R. L. et al. The river continuum concept. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 37, p. 130–137. 1980.
- WALLACE, J. B. et al. Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. **Science**, v. 277, p. 102–104. 1997.
- WEBSTER, J. R.; BENFIELD, E. F. Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 17, p. 567–594. 1986.
- YULE, C. M. et al. Shredders in Malaysia: abundance and richness are higher in cool upland tropical streams. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 28, p. 404–415. 2009.

4 CAPÍTULO 2 - ENVIRONMENTAL WARMING INDUCES BEHAVIORAL AND METABOLIC CHANGES IN A FRESHWATER CRUSTACEAN - AEGLIDS AS A MODEL ORGANISM

Running title: Global warming induce changes in aeglids

Full title: Environmental warming induces behavioral and metabolic changes in a freshwater crustacean - aeglids as a model organism

Gláucia Bolzan Cogo^{a,*}, Cristiane Biasi^a, Eduardo Stringini Severo^a, Vania Loro^a, Sandro Santos^a

^a Post-graduate Program in Animal Biodiversity, Ecology and Evolution Department, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Brazil. Av. Roraima, 1000, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Corresponding author: Gláucia Bolzan Cogo

E-mail: glauciabcogo@gmail.com

Phone: +55 (55) 3220-8465 - Extension 20

Ann. Limnol. • Int. J. Lim. 2018, 54, 7
© EDP Sciences, 2018
<https://doi.org/10.1051/limn/2017032>

Available online at:
www.limnology-journal.org

RESEARCH ARTICLE

Environmental warming induces behavioral and metabolic changes in a freshwater crustacean – aeglids as a model organism

Gláucia Bolzan Cogo^{*}, Cristiane Biasi, Eduardo Stringini Severo, Vania Loro and Sandro Santos

Post-graduate Program in Animal Biodiversity, Ecology and Evolution Department, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Brazil. Av. Roraima,1000, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

Received: 28 August 2017; Accepted: 8 December 2017

Abstract

Ecological processes in small-order streams are dependent on their community. A threat to the appropriate functioning of these processes is the water warming of streams since changes in temperature can modify the behavior, abundance, and distribution of the species. A way to predict the consequences of global warming on ecological processes in these ecosystems is to study their aquatic community. Here we evaluated behavioral and metabolic changes in *Aegla longirostri* at different (21° C and 24° C) temperatures. Experiments were performed in laboratory conditions. We calculated leaf consumption and quantified glycogen, protein and amino acid composition in the hepatopancreas. We also conducted a behavioral test to investigate the activity level of aeglids. Leaf consumption did not differ between temperatures. However, the amount of protein was higher at 21° C, and the amino acid and glycogen levels were greater at 24° C. In the present study we evaluated only the activity of hepatopancreas, so we can assume that the organ may have used glucose through the breakdown of glycogen and also performed some protein break. However, this hypothesis needs to be confirmed by checking for muscle activity. Animals kept at 24° C showed a lower level of activity. This strategy possibly occurs to save energy, as in elevated temperature crustaceans spend extra energy to maintain their homeostasis. This study indicates that a future increase temperature of streams will impact the populations of aeglids by changing their metabolism and behavior.

Keywords: Aeglidae; Energy reserves; Glycogen; Protein; Shredder.

Introduction

Due to the increase of CO₂ in the atmosphere and its contribution to the greenhouse effect, an increase is estimated in the average global air temperature up to 4.8° C until 2100 (IPCC 2014). There is a direct relationship between air temperature and water temperature (Morrill *et al.* 2005), and an increase of 5° C in air temperature can lead to an increase of up to 3.3° C in the temperature of water from rivers and streams (Langan *et al.* 2001; Koycheva & Karney 2009). Because of the climate changes that have occurred so far, warming of water has already altered the abundance and distribution of some aquatic species such as fish (Perry *et al.* 2005) and mussels (Galbraith *et al.* 2010). For the future, it is believed that these global changes in climate have the potential to cause modifications at the individual, population and community levels (Walther *et al.* 2002). Ecological processes such as carbon mineralization and primary production (Acuña *et al.* 2008; Demars *et al.* 2011) also can be affected. These facts point to the importance of understanding how global warming may affect the aquatic communities and the ecosystem processes that occur in these environments (Cole *et al.* 2007).

In the face of a scenario of climate change, the aquatic communities in small-order streams may be drastically affected, with direct effects on the ecological processes involved (Martinez *et al.* 2014; Ferreira *et al.* 2015). The decomposition of allochthonous plant material from riparian vegetation, which is mainly performed by hyphomycetes (Bärlocher 1992) and invertebrate shredders (Graça 2001), would be one of these processes with potential deleterious effect on the aquatic community. Changes in water temperature in streams can influence the metabolic rates of these organisms (Brown *et al.* 2004), thus inducing modifications in their physiology resulting in alterations in their biochemical composition or even suppression of their activities.

The ability of organisms to maintain the stability of an internal environment (homeostasis) is energetically costly. Crustaceans keep the homeostasis through the control of the levels of carbohydrates, lipids and proteins (Dall & Moriarty 1983). The relative importance of these reserves and the order of use vary among species, stage of life and type of stress (Jimenez & Kinsey 2015). Changes in environmental conditions (temperature, O₂ availability and salinity) and life cycle changes (reproduction and molting) can modify the amount of these compounds in the body of animals. In crustaceans, the main monosaccharide present in the hemolymph is glucose (Chang & O'Connor 1983), which is used in the synthesis of chitin and glycogen and pyruvate formation (Jimenez & Kinsey 2015). When at a high concentration, glucose is stored in the form of glycogen, particularly in the hepatopancreas and muscles (Vinagre & Da Silva 1992; Oliveira *et al.* 2003; Buckup *et al.* 2008). For the most part, lipids are stored in the hepatopancreas (Chang & O'Connor 1983; Kucharski & Da Silva 1991) and proteins, in the hepatopancreas and muscles (Claybrook 1983; Buckup *et al.* 2008).

A way to predict the consequences of a future scenario of global warming on ecological processes in small-order streams is to study their aquatic community. In the headwater streams of southern Brazil, *Aegla longirostri* Bond-Buckup and Buckup, 1994 is an important shredder that participates in the process of leaf litter fragmentation (Cogo & Santos 2013), and it is an essential species in nutrient cycling. These animals live in small-order streams with average annual temperature of 18° C (unpublished results). They are often under rocks, and leaf litter and their diet consist mainly of vegetable tissue and insect larvae, being considered omnivores (Santos *et al.* 2008). Given the above, the objective of this study was to test, under laboratory conditions, if an increase in water temperature will modify leaf consumption, the composition of metabolites in the hepatopancreas and movement of *Aegla longirostri*. Our hypothesis is that at high temperatures, the metabolism of aeglids will be accelerated, causing (1) an increase in leaf consumption and (2) a decrease in glycogen reserves. Assuming that they will use the

breaking of glycogen for energy, (3) there will be no changes in the levels of proteins and amino acids. We also expect that higher temperature will (4) reduce the movement and activity of the animals as a way of saving energy.

Methods

Collection and maintenance of shredders

We collected specimens of *A. longirostri* manually and with traps in May and June 2015 in a small-order stream, located in the southern region of Brazil (Santa Maria; RS; 29°39'49"S; 53°44'34"W). The site features a seasonal semideciduous forest with diverse riparian vegetation and an apparent absence of anthropic impact. The stream has areas of pools and riffles, and the substrate is mainly rocky with the presence of leaf litter and sediment deposits (especially in pools). In the experiments, we used only males at the intermolting stage and collected in the same period. This because there are differences between compounds in the hepatopancreas of males and females, aeglids go through a period of fasting during molting, and the reproductive period can change the energy reserves of the animals (Oliveira *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 2005). After collection, the animals were transported to the laboratory and individually measured for cephalothorax length with a digital caliper (precision: 0.01 mm).

Before the experiment, the animals remained (for at least seven days) in individual aquariums (2 L) with the water temperature of 18° C, constant aeration, controlled photoperiod (12h light; 12h dark), rock for shelter and *ad libitum* food (leaf litter collected in the stream). After that, they were randomly separated into two groups and acclimated (three days) in a BOD incubator, in the same conditions (see above) but unfed. The first group was adapted at 21° C and the second one at 24° C. We chose these temperatures because they are above the average water temperature in streams of the region (18° C) and because at higher temperatures (such as

26° C and 27° C) the aeglids have high mortality (preliminary test). At that time, we also conditioned (three days) leaves of *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq., a plant species used for checking leaf consumption by aeglids. We selected this species because it is abundant in the region and can be found on the banks of debris along the stream. A recent study showed that aeglids consume this species in the natural environment (Cogo & Santos 2013). The senescent leaves of *F. luschnathiana* were previously collected, open air dried, wrapped in fine mesh litter bags (500µ) and incubated in the stream for 14 days to allow microbial conditioning, a step in which the leaves become more palatable to shredders (Graça *et al.* 2015).

Experiment 1 - fragmentation and biochemical analyses

In the experiment, the animals were kept alone in aquariums (2 L) with constant aeration, controlled photoperiod (12h light; 12h dark), rock for shelter. Also, the animals received conditioned leaves discs (12 mm). Each animal received 370.0 ± 15.0 mg of dry mass leaf (DM) for consumption. Overall, we used 12 aquaria/animals at 21° C and 11 aquaria/animals at 24° C. Besides, we have kept a control aquarium, where we placed the leaf discs, without the presence of the shredder, to check leaf mass loss as a result of leaching and the action of microorganisms. After two days, the remaining discs (experimental and control) were dried in an oven (60° C for two days) and weighed for determination of the remaining dry mass. Leaf consumption corresponded to the leaf mass loss that occurred in the presence of the shredder, subtracting the value of leaf mass loss obtained in the control aquarium (without shredder).

For the analyses of energy reserve of aeglids, we chose to evaluate glycogen, protein and amino acids in the hepatopancreas, because this is a place of storage of reserves in aeglids (Oliveira *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 2005). At the end of the experiment, we cryoanesthetized the animals to remove the hepatopancreas, which was stored in a freezer (-20° C) for subsequent

analysis. The level of glycogen in the hepatopancreas was determined by the method described by Bidinotto *et al.* (1997) after addition of KOH and ethanol for glycogen precipitation. The tissue was heated with KOH at 100°C and centrifuged at 10.000 g for 10 min to determine the level of proteins. The supernatant was used to estimate the amount of proteins following the method described by Lowry *et al.* (1951). The neutral supernatant was used for colorimetric determination of amino acids according to Spies (1957).

Experiment 2 - behavior

We made behavioral observations at 10h and 22h for two days. For 10 minutes (600 seconds), the animals ($N = 10$ at 21° C and $N = 8$ at 24° C) were videotaped (Sony® HDR-CX560 handycam) for later analysis. The activity of aeglids was estimated using specific actions, to which we assigned scores, adapted according to Dalosto and Santos (2011) (Table 1). To determine the scores, we divided the 600 s at 10-second intervals (totaling 60), and during each interval, we annotated the score of the predominant activity (at least 5s, except for the tail flipping action, which we took into consideration even if the animal persisted for less than 5s). The final score is the sum of the scores given in each interval (they may vary from 0: inactive animal to 180: maximum activity).

After the observation at 22h of the second day, we performed another behavioral observation (videotaped over a period of 600 s, only at night). On this occasion, we offered food to the animals and checked latency, time spent manipulating the food (time with food) and the time without manipulating food (time without food). For this purpose, we chose animals ($N = 4$) at random in each treatment and offered a mix of four pieces of leaves previously collected in the stream. We opted to observe only at 22h because aeglids are mostly nocturnal animals (Sokolowicz *et al.* 2007). We did these observations at night with the use of incandescent red-

light bulbs, because crustaceans have low sensitivity to this wavelength (Turra & Denadai 2003).

Table 1. Description of the behaviors analyzed and their respective scores.

Behavior	Description	Score
Inactive	Absence of any apparent movement or movement only of cephalic appendages (antennae, antennules and/or maxillipods).	0
Low activity	Movement of the chelipeds, pereopods, pleopods and/or short movements of the animals.	1
Moderate activity	Active movement of the animal along the aquarium.	2
Intense activity	Tail flipping.	3

Adapted from Dalosto and Santos (2011).

Statistical analysis

To test if there was a difference in cephalothorax length, leaf consumption, levels of glycogen, protein and amino acids among treatments, either the t-test or the Mann-Whitney test was performed, depending on the normality of the data. Differences in behavior between day and night within the same treatment were tested using the Wilcoxon signed-rank test for related samples and differences between treatments were tested with the Mann-Whitney test for independent samples. Mann-Whitney test was used to test differences in latency and time spent manipulating the food. The analyses were performed in the software BioEstat 5.0.

Results

Experiment 1 - fragmentation and biochemical analyses

The cephalothorax length of the animals and leaf consumption did not differ between the temperatures (Table 2). However, the level of protein was higher at 21° C while the levels of the amino acids and glycogen were higher at 24° C (Table 2; Fig. 1).

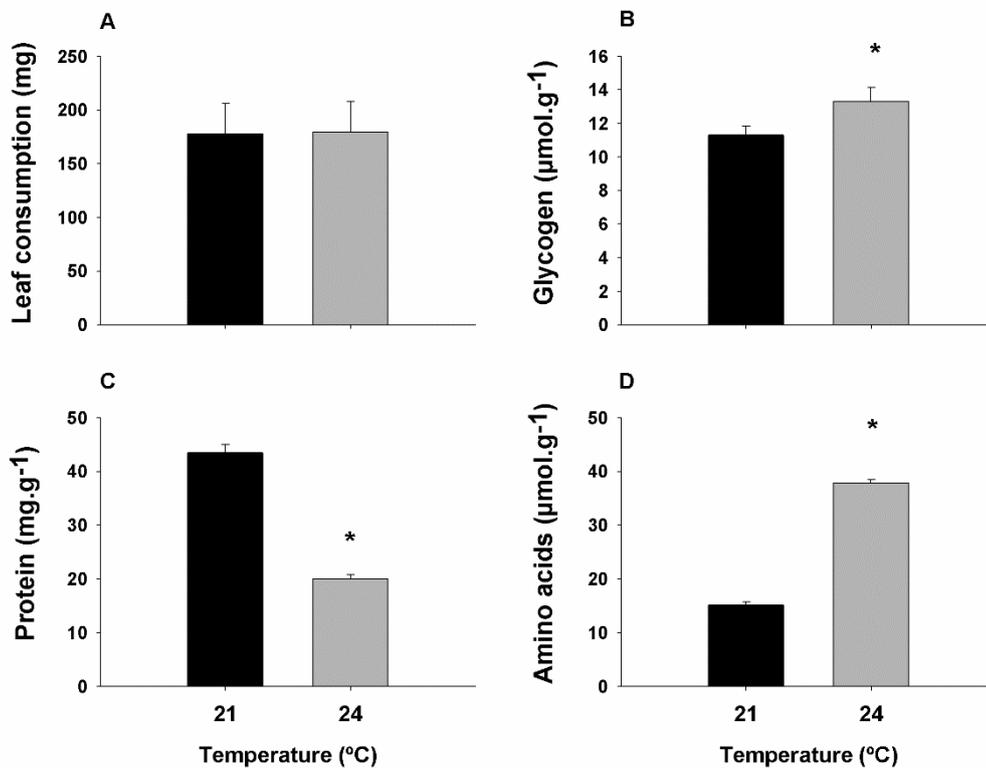


Figure 1. Consumption and biochemical analyses. Mean \pm standard error of leaf consumption (A), the level of glycogen (B), protein (C) and amino acids (D) in the hepatopancreas of *Aegla longirostri* at 21° C and 24° C. Asterisks indicate significant differences between the groups.

Experiment 2 - behavior

There was no difference in the activity of the animals between day and night both at 21° C ($Z = 1.18$, $df = 19$; $P = 0.24$), and in 24° C ($Z = 0.38$, $df = 15$; $P = 0.71$), as well as between the two days of experiments at different temperatures (Table 2). However, during the night (22 hours), the animals at the lowest temperature showed a higher level of activity (Table 2; Fig. 2A).

Concerning observation of animals after the offer of food, we found that the latency period did not differ between the different temperatures, but the animals at a temperature of 21° C spent more time with food than animals at 24° C (Table 2; Fig. 2B).

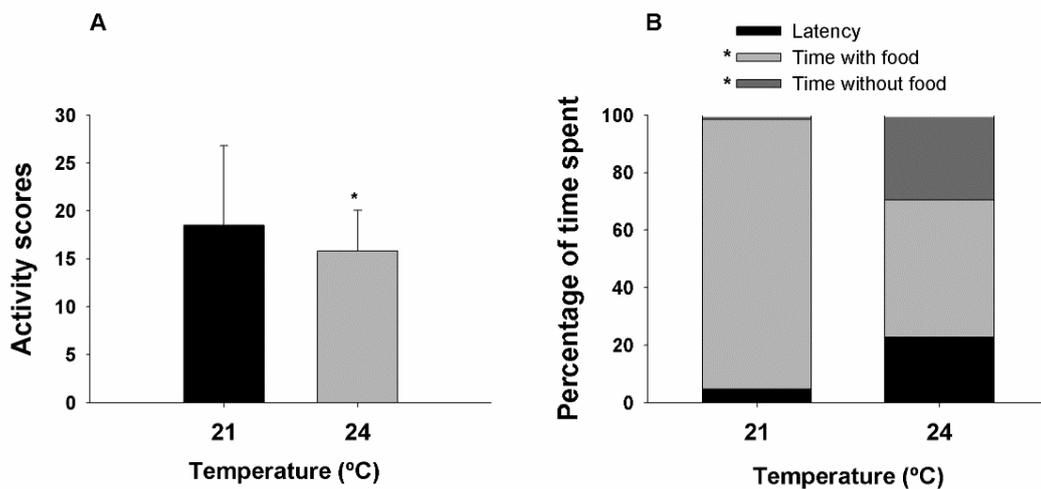


Figure 2. Behavioral observations. Mean \pm standard error of the average activity scores at 22h (A) and % of time spent in categories (i) latency, ii) manipulate the food and iii) without food in 21° C and 24° C (B). Asterisks indicate significant differences between the groups.

Table 2. Mean \pm standard error of the variables analyzed in *Aegla longirostri* at 21° C and 24° C. CL: cephalothorax length. Time with food: time spent manipulating the food; Time without food: time without manipulating food (videotaped over a period of 600 s, only at night).

	21° C	24° C	The test value	p-value
CL (mm)	19.2 \pm 2.2	19.6 \pm 2.4	t = -0.37	P = 0.71
Leaf consumption (mg)	177.6 \pm 97.7	179.6 \pm 94.3	t = -0.04	P = 0.96
Glycogen (μ mol.g ⁻¹)	11.3 \pm 1.8	13.3 \pm 2.8	U = 29.5	P = 0.02
Proteins (mg g ⁻¹)	43.4 \pm 5.2	19.9 \pm 2.5	t = 15.19	P < 0.0001
Amino acids (μ mol.g ⁻¹)	15.1 \pm 1.9	37.8 \pm 2.1	t = -27.20	P < 0.0001
Score 10h	24.2 \pm 8.8	23.2 \pm 8.5	U = 136	P = 0.44
Score 22h	18.5 \pm 8.3	15.8 \pm 4.2	U = 86.50	P = 0.02
Latency (s)	28.5 \pm 25.2	136.7 \pm 93.5	U = 3	P = 0.15
Time with food (s)	562.5 \pm 23.5	286.5 \pm 1.9	U = 1	P = 0.04
Time without food (s)	9.0 \pm 9.0	176.7 \pm 74.7	U = 1	P = 0.04

Discussion

Nutrient cycling in small streams that use allochthonous plant material as the main source of energy depends on their aquatic community. Therefore, changes in these organisms due to heating of the water can cause changes in the decomposition of leaf litter and consequently in nutrient cycling. Experiments with higher temperatures have confirmed this hypothesis (Martínez *et al.* 2014). Increases in water temperature increase the rate of decomposition of leaf litter due to the increase in i) leaching of soluble compounds (Chergui &

Pattee 1990), ii) fragmentation and consumption by invertebrates (González & Graça 2003; Azevedo-Pereira *et al.* 2006), and (iii) microbial activity (Buzby & Perry 2000; Canhoto *et al.* 2016).

Contrary to these results and our initial prediction, the increase in water temperature did not cause an increase in leaf consumption by *A. longirostri*. At the highest temperature, the aeglids metabolism may not have been speeded up enough to foster an increase in leaf consumption, hence using the energy from food and their energy reserves was sufficient. The absence of differences in leaf consumption at different temperatures may also be related to the chemical quality of the plant species. This characteristic must be considered in a scenario of climate change vs. leaf decomposition because interactions with water temperature can modify the quality of the leaf litter as a function of leaching and mainly of microbial conditioning (Ferreira *et al.* 2015). The leaves of *F. luschnathiana* were placed in a natural environment, and only after that, they were offered to the aeglids, under experimental conditions. So, the similar results in both experimental conditions tested in this study may be explained by the similar characteristics of the leaves.

Although we have not confirmed our first hypothesis, on leaf consumption, our results show that changes in water temperature produce differences in the biochemical metabolism and the behavior of aeglids. Crustaceans have no particular or specialized organ to regulate their body temperature; hence their metabolic rates vary according to environmental temperature changes (Vernberg 1982; Lagerspetz & Vainio 2006) and consequently their energy reserves may be altered. In this study, we observed that the levels of glycogen in the hepatopancreas of aeglids were greater at the highest temperature, and the levels of protein and amino acids differed between the temperatures. Thus, we can say that the aeglids have adopted different strategies for support adverse situation at the analyzed temperatures. At 21° C, the animals used glucose probably due to glycogen breakdown. On the other hand, at 24° C, glycogen levels were

higher than in aeglids kept at 21° C, so we suppose that they used some protein hydrolysis. The increase in the level of amino acids at the temperature of 24° C suggests that some proteolysis occurred at this temperature. However, the hypothesis needs confirmation through muscle activity measurements. As the supply and concentration of glucose can be derived both from glycogenolysis and gluconeogenesis (Sánchez-Paz *et al.* 2007), we diagnosed that aeglids used different metabolic pathways. At 21° C, glucose was produced through the breakdown of glycogen (glycogenolysis), while at 24° C, amino acids were the source of energy for metabolism. The use of the gluconeogenesis pathway (generation of glucose from breakdown of proteins or amino acids) has already been reported for *Aegla platensis* fed on some diet rich in protein and low in carbohydrates (Ferreira *et al.* 2005) and for *Neohelice granulata* in different diets (Oliveira & Da Silva 1997).

In different stress conditions, crustaceans use different energy reserves. In this study, at a high temperature, *A. longirostri* decreases its level of proteins, and the same occurs to *Carcinus aestuarii*, which features lower levels of protein in the hemolymph in this condition (Matozzo *et al.* 2011). By contrast, *Gammarus pulex* showed a decrease of its level of glycogen at high temperatures (Foucreau *et al.* 2014). Glycogen and proteins are typically used during periods of intense activity or changes in environmental conditions for crustaceans (Dutra *et al.* 2008). The glycogen is used during the process of molting, in periods of fasting, during hypoxia and anoxia, in osmoregulation and growth (Hu 1958; Chang & O'Connor 1983; Kucharski & Da Silva 1991; Oliveira & Da Silva 2000; Oliveira *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2004). In fasting, amphipod crustaceans primarily use the reserves of glycogen and protein and finally the reserves of lipids, while *Gammarus fossarum* uses the reserves of proteins and lipids (Hervant *et al.* 1999).

Other studies have also found a relation between levels of glycogen and variations in environmental conditions. For example, specimens of *Hyalella curvispina* have lower levels of

glycogen under conditions of increased salinity and lower water volume and temperature (e.g. Dutra *et al.* 2008). The estuarine crab (*Neohelice granulata*) also depends on glycogen for their survival during significant variations in environmental parameters such as temperature, salinity and periods of food shortage (Oliveira & Da Silva 1997). Some studies indicate that seasonal variation in energy reserves of eglids seems to be species-dependent and related to the reproductive period and food availability (Oliveira *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2007). Oliveira *et al.* (2007) suggested that the physiological characteristics of aeglids are related to their success in exploiting resources available in the environment as well as to the ability to survive in some varied environmental conditions.

The thermal control of crustaceans is based only on behavioral mechanisms, such as stimulus-based changes in locomotion. We know that they avoid extreme temperatures due to the changes in their locomotor activity (e.g. Lozán 2000) and their movements increase because of thermal preference (Lagerspetz & Vainio 2006). Aeglids showed less activity at higher temperatures, corroborating our prediction. These animals were dependent on environmental conditions in several studies, such as availability of oxygen (Dalosto & Santos 2011), availability of particulate organic matter (Bücker *et al.* 2008) and different land uses, such as urbanization and agriculture (Trevisan *et al.* 2009). We observed that variations in water temperature influenced the behavior of aeglids, indicating that an increase in global temperature can affect the populations in distinct ways, such as changing the metabolism of animals as well as their behavior (locomotor activity). This strategy may have been used to save energy, because at high temperatures the animals spend extra energy to maintain their homeostasis.

Water temperature is one of the main abiotic factors influencing the survival and growth of decapod crustaceans (Hartnoll 2001). In the short term, the temperature of 24° C caused changes in the metabolism and activity of aeglids but did not affect the survival of these animals. If aeglids become less active at higher temperatures, they may present greater difficulty in

finding food, mainly animal material, since they actively search for food resources. However, additional studies in the long term are required to verify the survival of these animals at high temperatures and the possible consequences for their growth and fitness.

The physiological processes of animals comprise a connection between the characteristics of life history and current environmental conditions. Understanding how these processes respond to climate changes can provide evidence about the implications of global warming predicted in biological communities (Small *et al.* 2015). The present study showed that, as a consequence of global warming, changes might occur in the metabolism and behavior of aeglids. Since these crustaceans are strategic consumers of leaf litter and predators in the streams where they live (Cogo *et al.* 2014; Cerezer *et al.* 2016), changes in their niche can lead to imbalances in biogeochemical cycles and aquatic trophic chains. However, further long-term studies are necessary for a complete understanding of the consequences of the warming of water resulting from climate change in organisms and ecosystem processes of aquatic environments.

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) which offered grants for Gláucia Bolzan Cogo, Cristiane Biasi and Eduardo S. Severo and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), which offered grants for Vania Loro and Sandro Santos. We are thankful to Mr. Graciano Sonogo, who allowed entry into his property for the collection of plant species and aeglids.

References

- Acuña, V., Wolf, A., Uehlinger, U. & Tockner, K. (2008). Temperature dependence of stream benthic respiration in an Alpine river network under global warming. *Freshw. Biol.* **53**, 2076–2088.
- Azevedo-Pereira, H. V. S., Graça, M.A.S. & González, J. M. (2006). Life history of *Lepidostoma hirtum* in an Iberian stream and its role in organic matter processing. *Hydrobiologia* **55**, 183–192.
- Bärlocher, F. (1992). *The ecology of aquatic hyphomycetes*. Berlin: Springer-Verlag.
- Bidinotto, P. M., Moraes, G. & Souza, R. H. S. (1997). Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Bragantia* **10**, 53–60.
- Bond-Buckup, G. & Buckup, L. (1994). A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Arq. Zool.* **32**, 159–346.
- Bücker, F., Gonçalves, R., Bond-Buckup, G. & Melo, A. S. (2008). Effects of environmental variables on the distribution of two freshwater crabs (Anomura: Aeglidae). *J. Crust. Biol.* **28**, 248–251.
- Buckup, L., Dutra, B. K., Ribarcki, F. P., Fernandes, F. A., Noro, C. K., Oliveira, G. T. & Vinagre, A. S. (2008). Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **149**, 59–67.
- Buzby, K. M. & Perry, S. A. (2000). Modeling the potential effects of climate change on leaf pack processing in central Appalachian streams. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**, 1773–1783.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M. & West, G. B. (2004). Towards a metabolic theory of ecology. *Ecology* **85**, 1771–1789.

- Canhoto, C., Gonçalves, A. L. & Barlocher, F. (2016). Biology and ecological functions of aquatic hyphomycetes in a warming climate. *Fungal Ecol.* **19**, 201-218.
- Cerezer, C., Biasi, C., Cogo, G. B. & Santos, S. (2016). Avoid predation or take risks in basic activities? Predator-prey relationship in subtropical streams between decapods and caddisflies. *Mar. Freshw. Res.* **67**: 1880–1887.
- Chang, E. & O'Connor, J. D. (1983). Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In *The Biology of Crustacea: Internal Anatomy and Physiological Regulation*: 263–287. Mantell, L. H. (Ed.). New York: Academic Press.
- Chergui, H. & Pattee, E. (1990). The influence of season on the breakdown of submerged leaves. *Arch. Hydrobiol.* **120**, 1–12.
- Claybrook, D. L. (1983). Nitrogen metabolism. In *The Biology of Crustacea: Internal Anatomy and Physiological Regulation*: 163–202. Mantell, L. H. (Ed.). New York: Academic Press.
- Cogo, G. B. & Santos, S. (2013). The role of aeglids in shredding organic matter in Neotropical streams. *J. Crust. Biol.* **33**, 519–526.
- Cogo, G. B., Biasi, C. & Santos, S. (2014). The effect of the macroconsumer *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda) on the invertebrate community in a subtropical stream. *Acta Limnol. Bras.* **26**, 143–153.
- Cole, J. J., Prairie, Y. T., Caraco, N. F., McDowell, W. H., Tranvik, L. J., Striegl, R. G., Duarte, C. M., Kortelainen, P., Downing, J. A., Middelburg, J. J. & Melack, J. (2007). Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems* **10**, 171–184.
- Dall, W. & Moriarty, D. J. W. (1983). Functional aspects of nutrition and digestion. In *The Biology of Crustacea: Internal Anatomy and Physiological Regulation*: 215–264. Mantell, L. H. (Ed.). New York: Academic Press.

- Dalosto, M. & Santos, S. (2011). Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **160**, 461–466.
- Demars, B. O. L., Manso, J. R., Ólafsson, J. S. & Gíslason, G. M. (2011). Temperature and the metabolic balance of streams. *Freshw. Biol.* **56**, 1106–1121.
- Dutra, B. K., Santos, R. B., Bueno, A. A. P. & Oliveira, G. T. (2008). Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyalella curvispina* (Crustacea, Amphipoda). *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **151**, 322–328.
- Ferreira, B. D. P., Hack, C. S., Oliveira, G. T. & Bond-Buckup, G. (2005). Perfil metabólico de *Aegla platensis* Schmitt, 1942 (Crustacea, Anomura) submetida a dietas ricas em carboidratos ou proteínas. *Rev. Bras. Zool.* **22**, 161–168.
- Ferreira, V., Chauvet, E. & Canhoto, C. (2015). Effects of experimental warming, litter species, and presence of macroinvertebrates on litter decomposition and associated decomposers in a temperate mountain stream. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **72**, 206–216.
- Foucreau, N., Cottin, D., Piscart, C. & Hervant, F. (2014). Physiological and metabolic responses to rising temperature in *Gammarus pulex* (Crustacea) populations living under continental or Mediterranean climates. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **168**, 69–75.
- Galbraith, H. S., Spooner, D. E. & Vaughn, C. C. (2010). Synergistic effects of regional climate patterns and local water management on freshwater mussel communities. *Biol. Conserv.* **143**, 1175–1183.
- González, J. M. & Graça, M. A. S. (2003). Conversion of leaf litter to secondary production by a shredding caddisfly. *Freshw. Biol.* **48**, 1578–1592.
- Graça, M. A. S. (2001). The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams – a review. *Internat. Rev. Hydrobiol.* **86**, 383–393.

- Graça, M. A. S., Ferreira, V., Canhoto, C., Encalada, A. C., Guerrero-Bolaño, F., Wantzen, K. M. & Boyero, L. (2015). A conceptual model of litter breakdown in low order streams *Internat. Rev. Hydrobiol.* **100**, 1–12.
- Hartnoll, R.G. (2001). Growth in Crustacea—twenty years on. *Hydrobiologia* **449**, 111–122.
- Hervant, F., Garin, D., Mathieu, J. & Freminet, A. (1999). Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post-hypoxic recovery. *J. Exp. Biol.* **205**, 579–592.
- Hu, A. S. L. (1958). Glucose metabolism in the crab *Hemigrapsus nudus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 387–395.
- IPCC (2014). Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team, Pachauri, R.K., L.A. Meyer (eds.). IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- Jimenez, A. G. & Kinsey, S. T. (2015). Energetics and metabolic regulation. In Chang ES, Thiel M, eds. *The Natural History of Crustacean Series: Physiology*. Oxford: Oxford University, pp. 389–417.
- Koycheva, J. & Karney, B. (2009). Stream water temperature and climate change – An ecological perspective. *International Symposium on Water Management and Hydraulic Engineering A112*.
- Kucharski, L. C. R. & Da Silva, R. S. M. (1991). Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **100**, 599–602.
- Lagan, S. J., Johnston, L., Donaghy, M. J., Youngson, A. F., Hay, D. W. & Soulsby, C. (2001). Variation in river water temperatures in an upland stream over a 30-year period. *Sci. Total Environ.* **265**, 195–207.

- Lagerspetz, K. Y. H. & Vainio, L. A. (2006). Thermal behaviour of crustaceans. *Biol. Rev.* **81**, 237–258.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Lozán, J. L. (2000). On the Threat to the European Crayfish: A Contribution with the Study of the Activity Behaviour of Four Crayfish Species (Decapoda: Astacidae). *Limnologica* **30**, 156–161.
- Martínez, A., Larrañaga, A., Pérez, J., Descals E. & Pozo, J. (2014). Temperature affects leaf litter decomposition in low-order forest streams: field and microcosm approaches. *FEMS Microbiol. Ecol.* **87**, 257–267.
- Matozzo, V., Gallo C. & Marin, M. G. (2011). Effects of temperature on cellular and biochemical parameters in the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). *Mar. Environ. Res.* **71**, 351–356.
- Morrill, J. C., Bales R. C. & Conklin, M. H. (2005). Estimating stream temperature from air temperature: implications for future water quality. *J. Environ. Eng.* **131**, 139–146.
- Oliveira, G. T. & Da Silva, R. S. M. (1997). Glyconeogeneses in hepatopancreas from *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high- protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **118**, 1429–1435.
- Oliveira, G. T. & Da Silva, R. S. M. (2000). Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol., Part B Biochem. Mol. Biol.* **127**, 375–381.
- Oliveira, G. T., Rossi, I. C. C. & Da Silva, R. S. M. (2001). Carbohydrate metabolism during anoxia and pos-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Mar. Biol.* **139**, 335–342.

- Oliveira, G. T., Fernandes, F. A., Bond-Buckup, G., Bueno A. A. & Da Silva, R. S. M. (2003). Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea:Anomura: Aeglidae). *Mem. Mus. Vic.* **60**, 59-62.
- Oliveira, G. T., Fernandes, F. A., Bueno A. A. & Bond-Buckup, G. (2007). Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae). *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **147**, 600-606.
- Oliveira, G. T., Eichler, P., Rossi, I. C. C. & Da Silva, R. S. M. (2004). Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *J. Exp. Zool., Part A* **301**, 240–248.
- Perry, A. L., Low, P. J., Ellis, J. R. & Reynolds, J. D. (2005). Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science* **308**, 1912–1915.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A. & Yepiz-Plascencia, G. (2007). Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **340**, 184–193.
- Santos, S., Ayres-Peres, L., Cardoso, R. C. F. & Sokolowicz, C. C. (2008). Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). *J. Nat. Hist.* **42**, 1027–1037.
- Small, D. P., Calosi, P., Boothroyd, D., Widdicombe S. & Spicer, J. I. (2015). Stage-Specific Changes in Physiological and Life-History Responses to Elevated Temperature and Pco₂ during the Larval Development of the European Lobster *Homarus gammarus* (L.). *Physiol. Biochem. Zool.* **88**, 494–507.
- Sokolowicz, C. C., Ayres-Peres, L. and Santos, S. (2007). Atividade nictimeral e tempo de digestão de *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Iheringia, Ser. Zool.* **97**, 235–238.

- Spies, J. R. (1957). Colorimetric procedures for amino acids. *Meth. Enzimol.* **3**, 467–477.
- Trevisan, A., Hepp L. U. & Santos, S. (2009). Abundância e distribuição de Aeglidae (Crustacea:Anomura) em função do uso da terra na bacia hidrográfica do Rio Jacutinga, Rio Grande do Sul, Brasil. *Zoologia* **26**, 419–426.
- Turra, A. & Denadai, M. R. (2003). Daily activity of four tropical intertidal hermit crabs from southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.* **63**, 537–544.
- Vernberg, F. J. (1982). Respiratory adaptations. In *The Biology of Crustacea: Environmental Adaptations*: 1–42. Vernberg, F. J. & Vernberg, W. B. (Ed.). New York: Academic Press.
- Vinagre, A. S. & Da Silva, R. S. M. (1992). Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **102**, 579–583.
- Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, K. C., Beebee, T. J. C., Fromentin, J. M., Hoegh-Guldberg, O. & Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**, 389–395.

**5 CAPÍTULO 3 – TEMPERATURE-SIZE RULE IN CADDISFLIES ALONG AN
ALTITUDINAL GRADIENT**

Temperature-size rule in caddisflies along an altitudinal gradient

Gláucia B. Cogo¹, Jesús M. Menéndez², Sandro Santos¹, Manuel A. S. Graça³

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Departamento de Ecologia e Evolução, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, España.

³ MARE-Marine and Environmental Sciences Centre, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Largo Marquês de Pombal, 3004-517, Coimbra, Portugal.

5.1 ABSTRACT

Temperature is an important factor that influences processes ranging from biochemical reactions to the carbon cycle in ecosystems. The body size, growth rate and fitness of animals are also affected by the temperature. A decrease in the body size of aquatic ectotherms is considered a universal ecological response to global warming. The temperature-size rule states that as the temperature increases, the body size tends to decrease, while the growth rate tends to increase. Here, we investigated the relationship between temperature, adult size and growth rate of caddisflies. We conducted a field study to verify the emergent adult size at different temperatures using the altitudinal gradient as a predictor of temperature. Additionally, we measure under laboratory conditions the temperature dependence growth rates under three temperature regimes with *Schizopelex festiva*. We observed that the animals studied follow the temperature-size-rule, at higher temperatures the animals have a smaller body size (field experiment) and a higher growth rate (laboratory experiment). We show that at increased temperature the caddisflies body size will decrease, which may change characteristics such as reproduction and phenology of this organisms.

Keywords: Altitudinal gradient. Temperature-size rule. *Schizopelex festiva*.

5.2 INTRODUCTION

Organisms may experience trade-offs when benefits of one trait result in costs to another trait (STEARNS, 1989). Trade-off between growth and reproduction occurs, when energy allocated into growth results in less energy available for reproduction and vice versa. Growing large may be an advantage since large size results in intraspecific competitive advantage (WOODWARD and HILDREW, 2002; AQUILONI and GHERARDI, 2008). Large size is also frequently correlated with fecundity (ROFF, 2002; ARENDT, 2015). However, deriving energy from growth to reproduction in early stages could also be an advantage since maximizes the probability of reproduction before predation and increase the number of reproductive events per season (ANGILETTA et al., 2004).

Temperature is an important factor influencing the body size. For most organisms, high temperatures result in faster growth rates, but reduced body size at maturity. This is known as the temperature-size rule - TSR (ATKINSON, 1994) and has been observed in a wide range of organisms, from unicellular to multicellular species. Atkinson (1994) estimated that 83.5% of ectotherms had a growth and body sizes according to TSR under laboratory conditions. Many hypotheses have been proposed to explain TSR: oxygen supply (ATKINSON et al., 2006; FORSTER et al., 2012; HORNE et al., 2015; WALCZYNSKA et al., 2015), cellular and molecular process (VAN DER HAVE and DE JONG, 1996), mortality (ATKINSON, 1994), cell size (ATKINSON, 1994; PARTRIDGE et al., 1994; CZARNOLESKI et al., 2013) (see also ATKINSON and SIBLY, 1997; ANGILETTA et al., 2004), but there is lack of a general model to explain the differences across taxa, changes in size during ontogeny and changes in size across generations. Researchers suggest that a simple general explanation for such rules may not exist (ANGILETTA and DUNHAM, 2003; FORSTER et al., 2011).

Temperature decreases with increased latitude. Therefore, according to TSR, we should expect large size organisms poleward. In the field, this pattern between latitude and body size is known as Bergmann's rule (BERGMANN, 1847). This interspecific rule was originally proposed for endotherms in which body larger species tend to be found at higher latitudes/colder temperatures. Currently, this term has been used to describe both inter- and intra-specific latitudinal-size clines and has also been described for ectotherms vertebrates (ASHTON and FELDMAN, 2003) and invertebrates (VAN'T LAND, 1999; ARNETT and GOTELLI, 1999). Data on insects (GHOSH et al., 2013), crustaceans (KIELBASA et al., 2014; WALCZYNSKA et al., 2017), mollusks (ATKINSON, 1994) and fish (RIJN et al., 2017) have a size distribution according to TSR, while this was not observed in other (ATKINSON, 1995; DAVID et al.,

2006; FU et al., 2016). The TSR also predicts faster growth in individuals reared in warmer than colder temperatures. It has been found in crustaceans, mollusks, arthropods, amphibians, and fish (ATKINSON, 1994; CAMPBELL et al., 2001).

Another temperature gradient occurs along altitudinal gradients in mountains where, in general, for every 100 m in elevation increase, there is a $\sim 0.6^\circ\text{C}$ decrease in temperature. Here, the TSR predicts large size organisms with increased altitude. Freshwater invertebrates response to elevation gradients may differ from terrestrial organisms because in freshwaters the temperatures tend to be lower than air temperatures, had a reduced daily and seasonal variation. Moreover, typically the most of freshwater invertebrates are insects with aerial stages and low dispersion. Hence, we would expect a cleared TSR in insects invertebrates along elevational gradients.

Finally, according to TSR, we expect strong biological changes in body size resulting from the global temperature increase, but how they will happen in most species is unknown. Thus, it is important to understand the relationship between temperature, adult size and growth rate of aquatic insects to predict eco-physiological changes in ecosystems under global warming pressure. Here we asked the question whether, (a) caddisflies differ in size along an elevational gradient as expected from the TSR and, (b) document the relationship between growth and temperature for a caddisfly. To address these questions, we sampled adult caddisflies along a 1200 elevational mountain gradient (400 – 1600 m) and related species size variation with elevation. Additionally, we measure, under laboratory conditions the temperature dependence growth rates at three standard temperature.

5.3 MATERIAL AND METHODS

5.3.1 Field survey

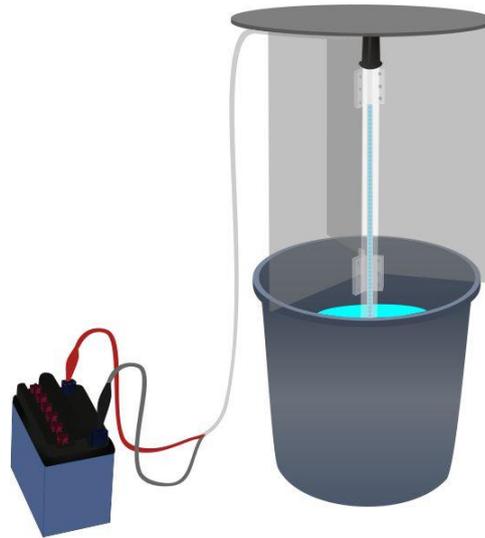
To test the temperature-size relationship in caddisflies we sampled adults along an altitudinal gradient (400 to 1600 m) as a predictor of temperature. Samples were taken at ~ 400 m elevational intervals in four replicate sites each, one trap per site (Table 1) in June and July 2017 in Serra da Estrela, Portugal. Traps consisted of UV led strips attached to acrylic plates. The leds were fed by a 12 volts battery and rested over a bucket filled with water and some drops of detergent to break the surface tension. Insects attracted to the light fall on the water (Figure 1 and Supplementary Material, Figure S1). We deployed the traps from dusk to dawn

(~12 hours). In the morning the specimens in the traps were retrieved and preserved in 80% ethanol and taken to the laboratory for further identification and measurement.

Table 1 – Location of sites where adult trichoptera were sampled. Average air temperature was obtained from WorldClim database.

Elevation (m)	Site	Mean temperature (°C)	Latitude	Longitude
400 (366)	Vila Cova à Coelheira	13.7	40°22'56.54"N	7°43'23.85"W
400 (397)	Alcaria	14.5	40°12'9.10"N	7°31'16.05"W
400 (405)	Tortosendo	14.5	40°14'11.80"N	7°29'28.50"W
400 (441)	Paul	14.2	40°11'47.43"N	7°38'30.00"W
800 (680)	Manteigas	12.6	40°24'4.99"N	7°31'50.03"W
800 (802)	Unhais da Serra	12.2	40°16'37.49"N	7°36'39.45"W
800 (806)	São Romão	11.5	40°24'1.43"N	7°41'4.97"W
800 (814)	Manteigas	11.4	40°22'59.86"N	7°32'45.16"W
1200 (1101)	Manteigas	10.1	40°20'55.79"N	7°33'47.87"W
1200 (1101)	Manteigas	10.1	40°20'58.22"N	7°33'46.59"W
1200 (1113)	Manteigas	10.1	40°20'47.37"N	7°33'52.99"W
1200 (1197)	Santa Maria	10.3	40°17'34.36"N	7°32'25.32"W
1600 (1509)	Cortes do Meio	8.6	40°18'33.92"N	7°33'2.07"W
1600 (1584)	Cortes do Meio	8.1	40°19'1.71"N	7°33'48.78"W
1600 (1584)	Cortes do Meio	8.1	40°19'2.89"N	7°33'48.69"W
1600 (1595)	Lagoa Comprida	8.2	40°21'31.50"N	7°39'14.00"W

Figure 1 – Traps for adult caddisflies. The trap consists of UV led strips attached to acrylic plates. The leds were fed by a 12 volts battery and rested over a bucket filled with water and some drops of detergent to break the surface tension. Insects attracted to the light fall on the water.

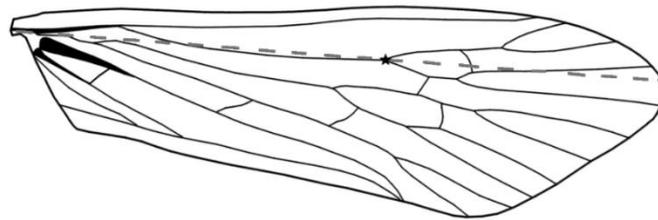


Caddisflies were identified at species level, and only species present in two or more altitudes were measured. As a proxy of animal size, we measured the wing size, from the apical fork through the discoidal/medial cell (Figure 2). The right wing of specimens was removed and photographed under a Leica M80 stereomicroscope attached to a Leica IC80 HD camera. The values of wing size were obtained by measurements of the pictures in the software Digimizer (version 4.6.1).

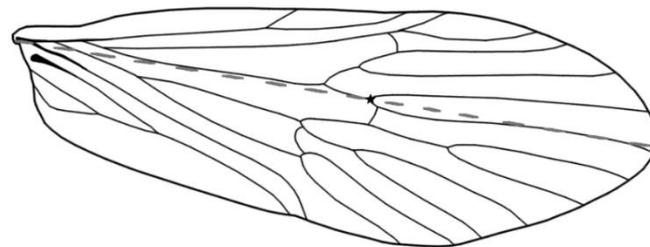
To characterize the environmental thermal conditions for each sampling site, the mean annual temperature was obtained, with the WorldClim database version 2 (FICK and HIJMANS, 2017; <http://worldclim.org/version2>) at the highest resolution (30 seconds) using the software R (R Development Core Team 2010). Although WorldClim climatic variables correspond to air measurements, studies have shown that air temperatures correlate with water temperature (LIVINGSTONE and LOTTER, 1998; WEBB et al., 2003).

Figure 2 – Right anterior wings of *Hydropsyche siltalai* and *Rhyacophila adjuncta*. The dotted line indicates the place of measurement. In *Hydropsyche* species the wing length was taken from the 2nd apical fork through the discoidal cell. In *R. adjuncta* wing length was measured 3rd apical fork through the medial cell.

a) *Hydropsyche siltalai*



b) *Rhyacophila adjuncta*



5.3.2 Laboratory experiment

To assess the relationship between growth and temperature, we reared larvae specimens of *Schizopelex festiva* (RAMBUR, 1842) at three temperatures: 10, 15 and 20° C. *Schizopelex festiva* was locally abundant and easy to maintain under laboratory conditions (GRAÇA and POQUET, 2014). Larvae were collected in May 2017 in small streams in Serra do Caramulo (40°34'03"N; 08°09'02"W). Specimens were acclimated for nine days to laboratory conditions in aerated boxes, and 12 light: 12 dark photoperiod and leaf litter from the stream.

For each temperature, we individually reared 12 specimens in vessels, 23 cm diameter and 10 cm height, with 150 ml of tap water and 10.0 ± 0.5 g of stream sand, previously incinerated in muffle furnace (500° C for 8 h). Aeration was provided by pipette tips connected to an air pump. *Schizopelex festiva* is a shredder, thus the specimens were fed with conditioned *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. leaf discs (10 mm diameter). Senescent leaves of *A. glutinosa* were

collected from a single tree in autumn and stored dry until needed. For the experiments they were leached in tap running water for three days and placed in a 25 liters aquarium with a mixture of stream collected leaves for microbial colonization and under strong turbulence caused by aeration. Conditioning was allowed for 15 days.

We checked food availability every two days and provided more food whenever necessary. We replaced the water and measured size of the specimens once a week. We monitored the animals in the laboratory for 70 days. *Schizopelex festiva* builds a sandy case; to determine the size we measured the specimens case opening from photographs taken under a Leica M80 stereomicroscope attached to a Leica IC80 HD camera. Measurements were obtained from pictures taken with the Digimizer (version 4.6.1) software. To relate the sandy case opening to dry mass, 51 specimens from a range of sizes were measured, uncased, dried at 40 °C for 2 days and weighted. The relationship between the animals' size and dry mass was expressed by the exponential equation $DM = 0.0321 * e^{(1.8888 * CO)}$ (N = 51; P = 0.0008; $r^2 = 94.86\%$) where DM is the animal's dry mass and CO is the diameter of the case opening.

5.3.3 Data analysis

Wing size differences between altitudes were investigated by *t*-test when species occurred in only two altitudes and ANOVA when occurring in more than two altitudes. We performed the statistical analyzes with BioEstat software version 5.0 (AYRES et al., 2007).

Growth (G) was estimated as the difference between the final (M_f) and initial (M_i) mass, divided by the elapsed time (t) in days and the initial mass:

$$G = (M_f - M_i) / (t * M_i)$$

Comparison of growth among the temperatures was done by one-way ANOVA.

5.4 RESULTS

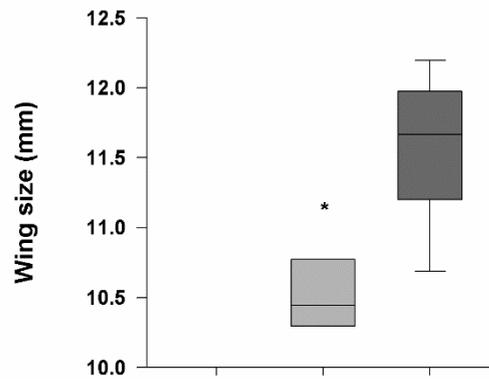
5.4.1 Field survey

We sampled four altitudes categories: 400 (ranged between 366-441 m), 800 (ranged between 802-814 m), 1200 (ranged between 1101-1197 m) and 1600 (ranged between 1584-1595 m). Of all species collected, only *Hydropsyche ambigua* (SCHMID, 1950), *Hydropsyche siltalai* (DÖHLER, 1963) and *Rhyacophila adjuncta* (McLACHLAN, 1884) were present in two or more elevations and the wing size was measured and tested for males.

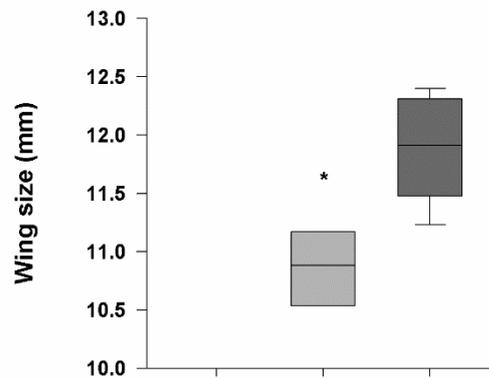
Rhyacophila adjuncta and *H. ambigua* occurred in the altitudes of 800 m (N = 6 and N = 8, respectively) and 1200 m (N = 22 for both species), and both species exhibited a significantly larger size at higher altitudes (Figs 3a and 3b; *H. ambigua*: $P < 0.0001$; $t = -6.2618$; *R. adjuncta*: $P = 0.0002$; $t = -4.4509$). The most abundant species in Serra da Estrela in the sampling dates was *H. siltalai*, collected at 400 m (N = 88), 800 m (N = 79), 1200 m (N = 44), and 1600 m (N = 3). Due to the small number of individuals sampled at 1600 m, we excluded them from the statistical analyses. *Hydropsyche siltalai* specimens collected at 400 m were smaller than those from other altitudes (Fig 3c; $P < 0.0001$; $F = 27.0499$). Overall, all measured species had a larger size at high altitudes compared to low altitudes.

Figure 3 – Wing size (mean \pm SE) of a) *Rhyacophila adjuncta*, b) *Hydropsyche ambigua*, and c) *Hydropsyche siltalai* collected in 400 (only *H. siltalai*), 800 e 1200 m of altitude. * = $P < 0.05$.

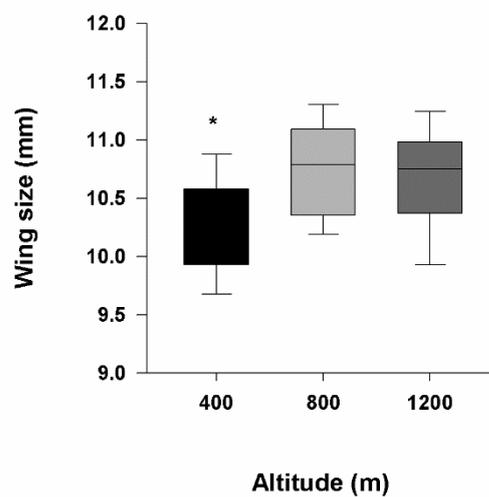
a) *Rhyacophila adjuncta*



b) *Hydropsyche ambigua*



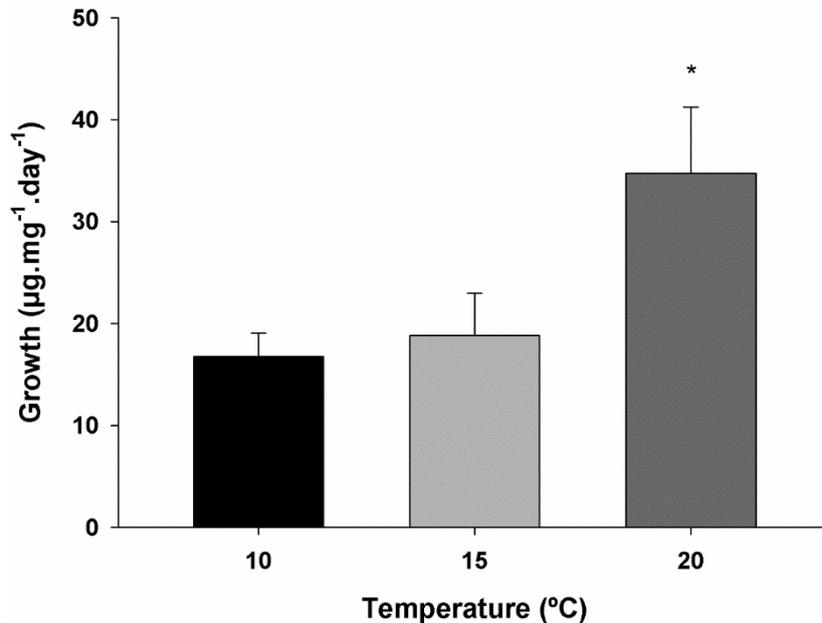
c) *Hydropsyche siltalai*



5.4.2 Laboratory experiment

Growth rates ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) varied significantly among the temperatures. *Schizopelex festiva* grew faster at 20° C (34.72 ± 6.5) than those reared at 15 (18.85 ± 4.1) and 10° C (16.74 ± 2.3) (Fig 4; ANOVA; $P = 0.014$; $F = 5.11$). Survival was moderate with one specimen dead at 10° C, three at 15° C and five at 20° C. During the experiment 12 specimens pupated.

Figure 4 – Growth rates (mean + SE) of *Schizopelex festiva* under laboratory conditions of 10, 15 and 20° C. * = $P < 0.05$.



5.5 DISCUSSION

We investigated the relationship between temperature, adult size and growth rate of caddisflies. If the temperature is a significant influence on body size variation, we might expect a close association between field and laboratory responses. Adult caddisflies exhibited larger body size at higher elevations as predicted by the temperature-size rule (TSR). Additionally, faster growth rates were measured in specimens of *S. festiva* reared at high than low temperatures under laboratory conditions, as expected from the metabolism – temperature

relationship. Thus, we showed that both field and laboratory traits are according to temperature-size rule (TSR).

The Trichoptera is a group of pterigotos insects, holometabolous closed to Order Lepidoptera (KRISTENSEN, 1997; HOLZENTHAL et al., 2011; MALM et al., 2013). There are more than 14.500 species described in the World (MORSE, 2018) of which 1426 are cited in Europe (GRAF et al., 2008). Iberian Peninsula is a special region characterized by the high diversity of species (368 species) and the high level of endemism (GONZÁLEZ et al., 1992; GONZÁLEZ and MARTÍNEZ, 2011).

Scientists have invested a lot effort investigating latitudinal variation in body size. In contrast, altitudinal gradients have been studied much less frequently. However, altitudinal comparisons are particularly interesting because altitudinal variation occurs over shorter distances and the organisms face the same photoperiod conditions. In this study, we used a relatively low elevational gradient (~1200 m), but it was sufficient to obtain differences in body size. The wing size of the caddisfly was higher at high altitude, according to TSR. Studies in altitudinal variations of ~ 2000 m also found the same results for insects wing size (5-1400 m: PÉREZ-VALENCIA and MOYA-RAYGOZA, 2015; 407-2380 m: NORRY et al., 2001; 596-2460 m: DAHLGAARD et al., 2001) and body length (0-1000 m: CHOWN and KLOK, 2003). Variation of body size in altitude has been attributed to seasonality, season length and differences in reproductive strategy (CHOWN and KLOK, 2003; BLANCKENHORN and DEMONT, 2004). In absence of the seasonality in altitudinal gradients, it is expected that temperature can be an essential regulator of growth and development and, the body size according to TSR. In the presence of seasonality, other factors such as resource availability may interfere and another pattern in body size is observed (CHOWN and KLOK, 2003). Season length decreases with increasing altitude, thus in higher altitudes the time available for growth is limiting. For multivoltine species the season length probably not affect the body size and it is predicted growth according to TSR (ATKINSON, 1994). Univoltine species are dependent of season length, therefore they can spend less time to grow and they can be smaller at high altitudes. The most trichopterans are univoltine species (JALÓN, 1986). As the caddisflies shown body size according to TSR we believe that seasonality and season length did not vary significantly in altitudes analyzed and had no influence on growth and development of caddisflies. In this study, temperature seems to be the main factor responsible for the difference in caddisflies wing size.

According to TSR growth rate (mass increment) increases with temperature but development rate (passing through life stages) increase more than growth rate, resulting in

earlier maturation at a smaller size in warmer temperatures (VAN DER HAVE and DE JONG, 1996; LI et al., 2009; FORSTER et al., 2011a; FORSTER et al., 2011b). Here, we analyzed the growth rate of larvae caddisflies at different temperatures and showed higher growth rate in warmer temperatures, according to TSR. Data on other insects shown the same pattern. Some studies report discontinuous patterns in temperature response over ontogeny suggesting that temperature acts differently in growth and development rates (FORSTER et al., 2011b; FORSTER and HIRST, 2012). Thus, the TSR signals that these rates must be decoupled (VAN DER HAVE and DE JONG, 1996; KINGSOLVER and HUEY, 2008). Some crustaceans species do not follow the TSR in the early stages, but in the final stages they corroborate the rule (FORSTER and HIRST, 2012; AGUILAR-ALBEROLA and MESQUITA-JOANES, 2014). We verified the growth rate only during larvae period – the second stage of caddisflies, and our results showed that *Schizopelex festiva* follows the TSR. It is important to highlight that Atkinson (1994) formulated the TSR under conditions not limited by food. Growth and development rates in ephemeropterans increased with increasing temperature and non-limiting food availability. Since kept individuals fed *ad libitum*, this variable did not influence the results of our study and we conclude that temperature is responsible for different growth rates.

Body size variations differs between aquatic and terrestrial environments. Aquatic-developing species show more significant reductions in adult body size, than do air-breathing species (FORSTER et al., 2012; HORNE et al., 2015, HORNE et al., 2017). An explanation may be the oxygen availability because its concentration and diffusivity are lower in water than in air (VERBERK et al., 2011). As the metabolic demand increases with increased size and temperature more than does oxygen availability in water (FORSTER et al., 2012), the aquatic species may have adapted by reducing the body size, or oxygen limitation may have limited the growth. In addition, animals in hypoxic conditions generally have reductions in size especially at warmer temperatures and/or larger body sizes (HOEFNAGEL and VERBERK, 2014).

With the rising levels of atmospheric CO₂, and its contribution to the greenhouse effect, it is predicted that the air temperature may increase up to 4.8° C until 2100 (IPCC, 2014), with a concomitant increase in water temperatures by ~ 3° C. Global warming may, therefore, result in three main changes: geographical distribution, phenology and body size (WALTHER et al., 2002; PARMESAN and YOHE, 2003; DAUFRESNE et al., 2009). Species tend to change their limits towards higher altitudes and towards the poles, where the temperature is lower (WALTHER et al., 2002; PARMESAN and YOHE, 2003; PERRY et al., 2005; MENÉNDEZ et al., 2014). Currently, some processes such as the emergence of adult insects, migrations and tree flowering are happening earlier than in the previous decades (WALTHER et al., 2002;

ROOT et al., 2003; PARMESAN and YOHE, 2003; GORDO and SANZ, 2005). A decrease in the body size of aquatic ectotherms is considered a universal ecological response to global warming (DAUFRESNE et al., 2009). Here, we show that as the temperature increase the caddisfly body size will decrease, what may change characteristics such as reproduction and phenology of this organisms.

Our study provides evidence about changes in caddisflies in a global warming scenario. To have a better knowledge of how global warming could influence the caddisflies, it would be interesting to investigate whether temperature and availability of resources (oxygen and food) affect the whole caddisfly life cycle, from egg to adult phase. The most attractive aspects would be the growth rate, the development time and adults' fitness. These studies would be possible in laboratory experiments.

5.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) through the strategic project UID/MAR/04292/2013 granted to MARE and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) through a scholarship granted to Gláucia Bolzan Cogo (PDSE Process no.: 88881.132244/2016-01). We are thankful to Olímpia Sobral field work support.

5.7 REFERENCES

- AGUILAR-ALBEROLA, J. A.; MESQUITA-JOANES, F. Breaking the temperature-size rule: Thermal effects on growth, development and fecundity of a crustacean from temporary waters. **Journal of Thermal Biology**, v. 42, p. 15–24. 2014.
- AQUILONI, L.; GHERARDI, F. Mutual mate choice in crayfish: large body size is selected by both sexes, virginity by males only. **Journal of Zoology**, v. 274, p. 171–179. 2008.
- ANGILLETTA, M. J.; DUNHAM, A. E. The temperature-size rule in ectotherms: simple evolutionary explanations may not be general. **The American Naturalist**, v. 162, p. 332–342. 2003.
- ANGILLETTA, M. J.; STEURY, T. S.; SEARS, M. W. Temperature growth rate and body size in ectotherms: fitting pieces of a life history puzzle. **Integrative and Comparative Biology**, v. 44, p. 498–509. 2004.
- ARENDET, J. D. Size-fecundity relationships, growth trajectories, and the temperature-size rule for ectotherms. **Evolution**, v. 65, p. 43–51. 2011.

- ARENDDT, J. D. Why get big in the cold? Size-fecundity relationships explain the temperature-size rule in a pulmonate snail (*Physa*). **Journal of Evolutionary Biology**, v. 28, p. 169–178. 2015.
- ARNETT, A. E.; GOTELLI, N. J. Geographic variation in life-history traits of the ant lion, *Myrmeleon immaculatus*: evolutionary implications of Bergmann's rule. **Evolution**, v. 53, p. 1180–1188. 1999.
- ASHTON, K. G.; FELDMAN, C. R. Bergmann's rule in non-avian reptiles: turtles follow it, lizards and snakes reverse it. **Evolution**, v. 7, p. 1151–1163. 2003.
- ATKINSON, D. Temperature and organism size - a biological law for ectotherms? **Advances in Ecological Research**, v. 25, p. 1–58. 1994.
- ATKINSON, D. Effects of temperature on the size of aquatic ectotherms: exceptions to the general rule. **Journal of Thermal Biology**, v. 20, p. 61–74. 1995.
- ATKINSON, D.; MORLEY, S. A.; HUGHES, R. N. From cells to colonies: At what levels of body organization does the “temperature-size rule” apply? **Evolution & Development**, v. 8, p. 202–214. 2006.
- ATKINSON, D.; SIBLY, R. M. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, p. 235–239. 1997.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: 364 p. 2007.
- BERGMANN, C. Über die verhältnisse der wärmeökonomie der thiere zu ihrer grösse. Göttinger Studien, **Göttingen**, v. 3, p. 595–708. 1847.
- BLANCKENHORN, W. U.; DEMONT, M. Bergmann and converse Bergmann latitudinal clines in Arthropods: Two ends of a continuum? **Integrative and Comparative Biology**, v. 44, p. 413–424. 2004.
- BROWN, J. H. et al. Toward a metabolic theory of ecology. **Ecology**, v. 85, p. 1771–1789. 2004.
- CAMPBELL, R. G. et al. Growth and development rates of the copepod *Calanus finmarchicus* reared in the laboratory. **Marine Ecology Progress Series**, v. 221, p. 161–183. 2001.
- CHOWN, S. L.; KLOK, C. J. Altitudinal body size clines: Latitudinal effects associated with changing seasonality. **Ecography**, v. 26, p. 445–455. 2003.
- CZARNOLESKI, M. et al. Flies developed small bodies and small cells in warm and in thermally fluctuating environments. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 2896–2901. 2013.

DAHLGAARD, J.; HASSON, E.; LOESCHCKE, V. Behavioral differentiation in oviposition activity in *Drosophila buzzatii* from highland and lowland populations in Argentina: plasticity or thermal adaptation? **Evolution**, v. 55, p. 738–747. 2001.

DAUFRESNE, M.; LENGFELLNER, K.; SOMMER, U. Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 12788–12793. 2009.

DAVID, J. R.; LEGOUT, H.; MORETEAU, B. Phenotypic plasticity of body size in a temperate population of *Drosophila melanogaster*: when the temperature-size rule does not apply. **Journal of Genetics**, v. 85, p. 9–23. 2006.

FICK, E.; HIJMANS, R. J. Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**. 2017.

FORSTER, J.; HIRST, A. G. The temperature-size rule emerges from ontogenetic differences between growth and development rates. **Functional Ecology**, v. 26, p. 483–492. 2012.

FORSTER, J.; HIRST, A. G.; ATKINSON, D. How do organisms change size with changing temperature? The importance of reproductive method and ontogenetic timing. **Functional Ecology**, v. 25, p. 1024–1031. 2011a.

FORSTER, J.; HIRST, A. G.; ATKINSON, D. Warming- induced reductions in body size are greater in aquatic than terrestrial species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 19310–19314. 2012.

FORSTER, J.; HIRST, A. G.; WOODWARD, G. Growth and development rates have different thermal responses. **The American Naturalist**, v. 178, p. 668–678. 2011b.

FU, D-M. et al. Life-history responses of the rice stem borer *Chilo suppressalis* to temperature change: Breaking the temperature–size rule. **Journal of Thermal Biology**, v. 61, p. 115–118. 2016.

GHOSH, S. M.; TESTA, N. D.; SHINGLETON, A. W. Temperature-size rule is mediated by thermal plasticity of critical size in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings. Biological Sciences**, v. 280, p. 20130174. 2013.

GORDO, O.; SANZ, J. J. Phenology and climate change: a long-term study in a Mediterranean locality. **Oecologia**, v. 146, p. 484–495. 2005.

GONZÁLEZ, M. A.; MARTÍNEZ, J. Checklist of the caddisflies of the Iberian Peninsula and Balearic Islands (Trichoptera). **Zoosymposia**, v. 5, p. 115–135. 2011.

GONZÁLEZ, M. A. et al. **Lista faunística y bibliográfica de los Tricópteros (Trichoptera) de la Península Ibérica e Islas Baleares**. Asociación Española de Limnología, Madrid, 200 pp. 1992.

GRAÇA, M. A. S.; POQUET, J. M. Do climate and soil influence phenotypic variability in leaf litter, microbial decomposition and shredder consumption? **Oecologia**, v. 174, p. 1021–1032. 2014.

- GRAF, W. et al. **Distribution and Ecological Preferences of European Freshwater Organisms**. Volume 1. Trichoptera. Eds. A. Schmidt-Kloiber & D. Hering. Pensoft Publishers. 388 pp. 2008.
- HOEFNAGEL, K. N.; VERBERK, W. Is the temperature- size rule mediated by oxygen in aquatic ectotherms? **Journal of Thermal Biology**, v. 54, p. 56–65. 2015.
- HOLZENTHAL, R. W.; MORSE, J. C.; KJER, K. M. Order Trichoptera Kirby, 1813. **Zootaxa**, v. 3148, p. 209–211. 2011.
- HORNE, C. R.; HIRST, A. G.; ATKINSON, D. Temperature- size responses match latitudinal-size clines in arthropods, revealing critical differences between aquatic and terrestrial species. **Ecology Letters**, v. 18, p. 327–335. 2015.
- HORNE, C. R.; HIRST, A. G.; ATKINSON, D. Seasonal body size reductions with warming co- vary with major body size gradients in arthropod species. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 284, p. 20170238. 2017.
- IPCC. **Climate Change 2014: Synthesis Report**. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team, PACHAURI, R. K.; MEYER L. A. (eds.). IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp. 2014.
- JALÓN, D. G. Los Hydropsychidae (Trichoptera) de la Cuenca del Duero. **Boletín de la Asociación española de Entomología**, v. 10, p. 127–138. 1986.
- KIELBASA, A. et al. Seasonal changes in the body size of two rotifer species living in activated sludge follow the Temperature-Size Rule. **Ecology and Evolution**, v. 4, p. 4678–4689. 2014.
- KINGSOLVER, J. G.; HUEY, R. B. Size, temperature, and fitness: three rules. **Evolutionary Ecology Research**, v. 10, p. 251–268. 2008.
- KRISTENSEN, N. P. Early evolution of the Lepidoptera + Trichoptera lineage: phylogeny and the ecological scenario. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. 173, pp. 253–271. 1997.
- LI, C. et al. Influences of temperature on development and survival, reproduction and growth of a calanoid copepod (*Pseudodiaptomus dubia*). **The Scientific World Journal**, v. 9, p. 866–879. 2009.
- LIVINGSTONE, D. M.; LOTTER, A. E. The relationship between air and water temperatures in lakes of the Swiss Plateau: a case study with palaeolimnological implications. **Journal of Paleolimnology**, v. 19, p. 181–198. 1998.
- MALM, T.; JOHANSON, K. A.; WAHLBERG, N. The evolutionary history of Trichoptera (Insecta): A case of successful adaptation to life in freshwater. **Systematic Entomology**, v. 38, p. 459–473. 2013.

- MENÉNDEZ, R. et al. Climate change and elevational range shifts: evidence from dung beetles in two European mountain ranges. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, p. 646–657. 2014.
- MORSE, J. C. Trichoptera World Checklist. entweb.clemson.edu/database/trichopt/index.htm. Accessed 14 March 2018. 2018.
- NORRY, F. M.; BUBLIY, O. A.; LOESCHCKE, V. Developmental time, body size and wing loading in *Drosophila buzzatii* from lowland and highland populations in Argentina. **Hereditas**, v. 135, p. 35–40. 2001.
- PARMESAN, C.; YOHE, G. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. **Nature**, v. 421, p. 37–42. 2003.
- PARTRIDGE, L. et al. Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. **Evolution**, v. 48, p. 1269–1276. 1994.
- PÉREZ-VALENCIA, L. I.; MOYA-RAYGOZA, G. Body size variation of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) through an elevation gradient. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 108, p. 800–806. 2015.
- PERRY, A. L. et al. Climate change and distribution shifts in marine fishes. **Science**, v. 308, p. 1912–1915. 2005.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://www.r-project.org/>. 2010.
- RIJN, I. V. et al. Large but uneven reduction in fish size across species in relation to changing sea temperatures. **Global Change Biology**, v. 23, p. 3667–3674. 2017.
- ROFF, D. A. **Life History Evolution**. Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, MA. 2002.
- ROOT, T. et al. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. **Nature**, v. 421, p. 57–60. 2003.
- STEARNS, S. C. Trade-offs in life-history evolution. **Functional Ecology**, v. 3, p. 259–268. 1989.
- VAN DER HAVE, T. M.; DE JONG, G. Adult size in ectotherms: temperature effects on growth and differentiation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 183, p. 329–340. 1996.
- VAN'T LAND, J. et al. Latitudinal variation in wild populations of *Drosophila melanogaster*: Heritabilities and reaction norms. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 12, p. 222–232. 1999.
- VERBERK, W. C. E. P. et al. Oxygen supply in aquatic ectotherms: partial pressure and solubility together explain biodiversity and size patterns. **Ecology**, v. 92, p. 1565–1572. 2011.

WALCZYŃSKA, A.; SOBCZYK, L. The underestimated role of temperature-oxygen relationship in large-scale studies on size- to-temperature response. **Ecology and Evolution**, v. 7, p. 7434–7441. 2017.

WALCZYŃSKA, A. et al. The temperature-size rule in *Lecane inermis* (Rotifera) is adaptive and driven by nuclei size adjustment to temperature and oxygen combinations. **Journal of Thermal Biology**, v. 54, p. 78–85. 2015.

WALTHER G-R. et al. Ecological responses to recent climate change. **Nature**, v. 416, p. 389–395. 2002.

WEBB, B. W.; CLACK, P. D.; WALLING, D. E. Water–air temperature relationships in a Devon river system and the role of flow. **Hydrological Processes**, v. 17, p. 3069–3084. 2003.

WOODWARD, G.; HILDREW, A. G. Body-size determinants of niche overlap and intraguild predation within a complex food web. **Journal of Animal Ecology**, v. 71, p. 1063–1074. 2002.

5.8 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1 – UV traps in the field.



6 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Com esta tese avançamos no conhecimento da biologia e ecologia dos macroinvertebrados aquáticos. Sobre o macroconsumidor omnívoro *Aegla longirostri*, mostramos que é uma espécie que apresenta preferência alimentar por determinados itens. Os eglídeos preferem consumir o tecido animal, seguido de folhas condicionadas e como última opção alimentam-se de folhas não condicionadas, demonstrando preferência pelo item de maior qualidade nutricional. Exceto pelo item de origem animal, a preferência dos eglídeos está de acordo com o encontrado para espécies de fragmentadores típicos, que alimentam-se somente de detrito vegetal. Em ambos casos, folhas mais duras, com maiores concentrações de compostos secundários e estruturais podem ser de difícil consumo, enquanto folhas mais nutritivas (com altas concentrações de nitrogênio e baixa C:N) e condicionadas por fungos aquáticos tornam-se mais palatáveis e atraentes. Como estes animais são oportunistas, no ambiente natural eles podem preferir consumir o que estiver em maior abundância ou o que seja mais fácil. Entretanto, para sua sobrevivência não basta os animais terem preferência por determinados itens, eles necessitam ter um adequado crescimento. Assim, seria interessante investigar se o crescimento dos eglídeos é maior ao ingerir os itens preferidos. Outra abordagem interessante é verificar se o custo de capturar as presas vivas altera a preferência alimentar dos eglídeos pelo tecido animal.

Além disto demonstramos que para os eglídeos a temperatura é um fator abiótico que modifica as reservas energéticas do hepatopâncreas e sua atividade locomotora. Animais apresentaram diferentes níveis de glicogênio, proteína e aminoácidos sob diferentes condições de temperatura experimental. Em temperaturas elevadas os eglídeos utilizam a proteólise para obter energia, enquanto consomem o glicogênio em temperaturas menores. Esta mudança nas reservas energéticas pode ser uma adaptação para enfrentarem condições adversas durante seu ciclo de vida. Outra adaptação pode ser a redução na atividade locomotora com o objetivo de economizar energia para manter a homeostase. Estes resultados indicam que um futuro aumento da temperatura dos riachos afetará as populações de eglídeos alterando seu metabolismo e comportamento.

Outro grupo de macroinvertebrado estudado foram os tricópteros. Sobre eles descobrimos que em temperaturas elevadas apresentam um tamanho do corpo menor e uma taxa de crescimento maior. Este resultado está de acordo com a temperature-size rule, uma ideia que tem sido investigada em vários grupos de seres vivos e que ainda não possui uma explicação geral sobre o motivo de sua ocorrência. Novamente encontramos que um futuro aumento da

temperatura da água dos riachos irá modificar o desenvolvimento de mais espécies de macroinvertebrados. Neste caso, modificações nas taxas de crescimento e tamanho do corpo podem ter implicações no fitness das espécies de tricópteros.

Nossos resultados confirmam que a temperatura é um fator importante que influencia diversos aspectos da vida dos macroinvertebrados aquáticos. Os ectotérmicos aquáticos estão sob influência das variações térmicas ambientais e de alguma forma respondem à estas variações, seja através de sua fisiologia ou comportamento. É importante compreender como o aquecimento global pode afetar as comunidades aquáticas e os processos ecossistêmicos que ocorrem nestes ambientes. Esta tese fornece mais dados que fomentam as descobertas de mudanças nas comunidades aquáticas com o crescente aumento na temperatura dos riachos, devido ao aquecimento global.

7 REFERÊNCIAS

- ACUÑA, V. et al. Temperature dependence of stream benthic respiration in an Alpine river network under global warming. **Freshwater Biology**, v. 53, p. 2076–2088. 2008.
- ALLAN, J. D.; CASTILLO, M. M. **Stream ecology**: structure and function of running waters. 2 ed. Dordrecht: Springer, 444p. 2007.
- ANDERSON, N. H.; CUMMINS, K.W. Influence of diet on the life histories of aquatic insects. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 36, p. 335–342. 1979.
- ATKINSON, D. Temperature and organism size - a biological law for ectotherms? **Advances in Ecological Research**, v. 25, p. 1–58. 1994.
- AZEVEDO-PEREIRA, H. V. S.; GRAÇA, M. A. S.; GONZÁLEZ, J. M. Life history of *Lepidostoma hirtum* in an Iberian stream and its role in organic matter processing. **Hydrobiologia**, v. 55, p. 183–192. 2006.
- BALDY, V.; GESSNER, M. O.; CHAUVET, E. Bacteria, fungi and the breakdown of leaf litter in a large river. **Oikos**, v. 74, p. 93–102. 1995.
- BASTIAN, M. et al. Leaf litter diversity and shredder preferences in an Australian tropical rain-forest stream. **Journal of Tropical Ecology**, v. 23, p. 219–229. 2007.
- BERGMANN, C. Über die verhältnisse der wärmeökonomie der thiere zu ihrer grösse. Göttinger Studien, **Göttingen**, v. 3, p. 595–708. 1847.
- BROWN, J. H. et al. Toward a metabolic theory of ecology. **Ecology**, v. 85, p. 1771–1789. 2004.
- BÜCKER, F. et al. Effects of environmental variables on the distribution of two freshwater crabs (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 28, p. 248–251. 2008.
- BUCKUP, L. et al. Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 149, p. 59–67. 2008.
- BUELER, C. M. Feeding preference of *Pteronarcys picteti* (Plecoptera: Insecta) from a small acid woodland stream. **Florida Entomologist**, v.67, p. 393–401. 1984.
- BUTLER, N. M.; SUTTLE, C. A.; NEILL, W. E. Discrimination by freshwater zooplankton between single algal cells differing in nutritional status. **Oecologia**, v. 78, p. 368–372. 1989.
- BUZBY, K. M.; PERRY, S. A. Modeling the potential effects of climate change on leaf pack processing in central Appalachian streams. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 57, p. 1773–1783. 2000.
- CANHOTO, C.; GONÇALVES, A. L.; BARLOCHER, F. Biology and ecological functions of aquatic hyphomycetes in a warming climate. **Fungal Ecology**, v. 19, p. 201–218. 2016.

- CANHOTO, C.; GRAÇA, M. A. S. Food value of introduced eucalypt leaves for a Mediterranean stream detritivore: *Tipula lateralis*. **Freshwater Biology**, v. 34, p. 209–214. 1995.
- CANHOTO, C. M.; GRAÇA, M. A. S. Leaf barriers to fungal colonization and shredders (*Tipula lateralis*) consumption of decomposing *Eucalyptus globulus*. **Microbial Ecology**, v. 37, p. 163–172. 1999.
- CEREZER, C. et al. Avoid predation or take risks in basic activities? Predator-prey relationship in subtropical streams between decapods and caddisflies. **Marine and Freshwater Research**, v. 67, p. 1880–1887. 2016.
- CHANG, E.; O'CONNOR, J. D. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: MANTELL, L. H. (Ed.). **The Biology of Crustacea: Internal Anatomy and Physiological Regulation**: New York: Academic Press p. 263–287. 1983.
- CHERGUI, H.; PATTEE, E. The processing of leaves of trees and aquatic macrophytes in the network of the River Rhone. **Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie**, v. 75, p. 281–302. 1990.
- CHUNG, N.; SUBERKROPP, K. Contribution of fungal biomass to the growth of the shredder, *Pycnopsyche gentilis* (Trichoptera: Limnephilidae). **Freshwater Biology**, v. 54, p. 2212–2224. 2009.
- CLAYBROOK, D. L. Nitrogen metabolism. In: MANTELL, L. H. (Ed.). **The Biology of Crustacea: Internal Anatomy and Physiological Regulation**: New York: Academic Press p. 163–202. 1983.
- COLE, J. J. et al. Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. **Ecosystems**, v. 10, p. 171–184. 2007.
- CRIVELLARO, M. S. et al. Looks can be deceiving: species delimitation reveals hidden diversity in the freshwater crab *Aegla longirostri* (Decapoda: Anomura). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 182, p. 24–37. 2017.
- CUMMINS, K. W. Trophic relations of aquatic insects. **Annual Review of Entomology**, v. 18, p. 183–206. 1973.
- CUMMINS, K. W.; MERRITT, R. W.; ANDRADE, P. C. N. The use of invertebrate functional groups to characterize ecosystem attributes in selected streams and rivers in south Brazil. **Studies Neotropical Fauna Environment**, v. 40, p. 69–89. 2005.
- DALL, W.; MORIARTY, D. J. W. Functional aspects of nutrition and digestion. In: **The Biology of Crustacea: Internal Anatomy and Physiological Regulation**: 215–264. MANTELL, L. H. (Ed.). New York: Academic Press. 1983.
- DALOSTO, M.; SANTOS, S. Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, p. 461–466. 2011.

- DAUFRESNE, M.; LENGFELLNER, K.; SOMMER, U. Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 12788–12793. 2009.
- DEMARS, B. O. L. et al. Temperature and the metabolic balance of streams. **Freshwater Biology**, v. 56, p. 1106–1121. 2011.
- DI LASCIO, A.; ROSSI, L.; COSTANTINI, M. L. Different temperature tolerance of northern and southern European populations of a freshwater isopod crustacean species (*Asellus aquaticus* L.). **Fundamental and Applied Limnology**, v. 179, p. 193–201. 2011.
- FINK, P.; VON ELERT, E. Physiological responses to stoichiometric constraints: nutrient limitation and compensatory feeding in a freshwater snail. **Oikos**, v. 115, p. 484–494. 2006.
- FISCHER, K.; FIEDLER, K. Reactions norms for age and size at maturity in response to temperature: a test of the compound interest hypothesis. **Evolutionary Ecology**, v. 16, p. 333–349. 2002.
- FLINDT, M. R. et al. Nutrient cycling and plant dynamics in estuaries: A brief review. **Acta Oecologica**, v. 20, p. 237–248. 1999.
- FOUCREAU, N. et al. Physiological and metabolic responses to rising temperature in *Gammarus pulex* (Crustacea) populations living under continental or Mediterranean climates. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 168, p. 69–75. 2014.
- FOUCREAU, N. et al. Effects of rising temperature on a functional process: consumption and digestion of leaf litter by a freshwater shredder. **Fundamental and Applied Limnology**, v. 187, p. 295–306. 2016.
- GESSNER, M. O. Ergosterol as a measure of fungal biomass. In: GRAÇA, M. A. S.; BÄRLOCHER, F.; GESSNER, M. O. (eds.). **Methods to Study Litter Decomposition. A Practical Guide**, 329 p. 2005.
- GIBERSON, D. J.; ROSENBERG, D. M. Effects of temperature, food quantity, and nymphal rearing density on life-history traits of a northern population of *Hexagenia* (Ephemeroptera: Ephemeridae). **Journal of the North American Benthological Society**, v. 11, p. 181–193. 1992.
- GONÇALVES A. L. et al. Top-down and bottom-up control of litter decomposers in streams. **Freshwater Biology**, v. 59, p. 2172–2182. 2014.
- GONZÁLEZ, J. M.; GRAÇA, M. A. S. Conversion of leaf litter to secondary production by the shredder caddisfly *Sericostoma vittatum*. **Freshwater Biology**, v. 48, p. 1578–1592. 2003.
- GORDO, O.; SANZ, J. J. Phenology and climate change: a long-term study in a Mediterranean locality. **Oecologia**, v. 146, p. 484–495. 2005.
- GRAÇA, M. A. S. The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams e a review. **International Review of Hydrobiology**, v. 86, p. 383-393. 2001.

GRAÇA, M. A. S.; MALTBY, L.; CALOW, P. Importance of fungi in diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. II. Effects on growth, reproduction and physiology. **Oecologia**, v. 96, p. 304–309. 1993.

GRAÇA, M. A. S. et al. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. **Freshwater Biology**, v. 46, p. 947–957. 2001.

GREIG, H. S. et al. Warming, eutrophication, and predator loss amplify subsidies between aquatic and terrestrial ecosystems. **Global Change Biology**, v. 18, p. 504–514. 2012.

HARTNOLL, R. G. Growth in Crustacea—twenty years on. **Hydrobiologia**, v. 449, p. 111–122. 2001.

HOGG, I. D.; WILLIAMS, D. D. Response of stream invertebrates to a global warming thermal regime: an ecosystem-level manipulation. **Ecology**, v. 77, p. 395–407. 1996.

IPCC. **Climate Change 2014: Synthesis Report**. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team, PACHAURI, R. K.; MEYER L. A. (eds.). IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp. 2014.

IVERSEN, T. M. Ingestion and growth in *Sericostoma personatum* (Trichoptera) in relation to the nitrogen content of ingested leaves. **Oikos**, v. 25, p. 278–282. 1974.

JAMES, F.C. Geographic size variation in birds and its relationship to climate. **Ecology**, v. 51, p. 365–390. 1970.

JIMENEZ, A. G.; KINSEY, S. T. Energetics and metabolic regulation. In: CHANG, E. S.; THIEL, M. (eds.). **The Natural History of Crustacean Series: Physiology**. Oxford: Oxford University, pp. 389–417. 2015.

KIFFER, W. P. Jr. et al. Exotic Eucalyptus leaves are preferred over tougher native species but affect the growth and survival of shredders in an Atlantic Forest stream (Brazil). **PLoS ONE**, 13, e0190743. 2018.

KIMMERER, T. W.; POTTER, D. A. Nutritional quality of specific tissues and selective feeding by a specialist leaf miner. **Oecologia**, v. 71, p. 548–551. 1987.

KINDLMANN, P.; DIXON, A.F.G.; DOSTÁLKOVÁ, I. Role of ageing and temperature in shaping reaction norms and fecundity functions in insects. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 14, p. 835–840. 2001.

KÖNIG, R.; HEPP, L. U.; SANTOS, S. Colonisation of low- and high-quality detritus by benthic macroinvertebrates during leaf breakdown in a subtropical stream. **Limnologia**, v. 45, p. 61–68. 2014.

KOYCHEVA, J.; KARNEY, B. Stream water temperature and climate change – An ecological perspective. **International Symposium on Water Management and Hydraulic Engineering A112**. 2009.

- KUCHARSKI, L. C. R.; DA SILVA, R. S. M. Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 100, p. 599–602. 1991.
- LANGAN, S. J. et al. Variation in river water temperatures in an upland stream over a 30-year period. **Science of the Total Environment**, v. 265, p. 195–207. 2001.
- LAWSON, D. L.; KLUG, M. J.; MERRIT, R. W. The influence of the physical, chemical, and microbiological characteristics of decomposing leaves on the growth of the detritivore *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 62, p. 2339–2343. 1984.
- LINTON, S. M.; GREENAWAY, P. A review of feeding and nutrition of herbivorous land crabs: adaptations to low quality plant diets. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 177, p. 269–286. 2007.
- MARCZAK, L. B.; RICHARDSON, J. S. Growth and development rates in a riparian spider are altered by asynchrony between the timing and amount of a resource subsidy. **Oecologia**, v. 156, p. 249–258. 2008.
- MAS-MARTÍ, E. et al. Effects of increased water temperature on leaf litter quality and detritivore performance: a whole-reach manipulative experiment. **Freshwater Biology**, v. 60, p. 184–197. 2015.
- MATHURIAU, C.; CHAUVET, E. Breakdown of leaf litter in a neotropical stream. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 21, p. 384–396. 2002.
- MATOZZO, V.; GALLO, C.; MARIN, M. G. Effects of temperature on cellular and biochemical parameters in the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). **Marine Environmental Research**, v. 71, p. 351–356. 2011.
- MEMMOTT, J. et al. Global warming and the disruption of plant-pollinator interactions. **Ecology Letters**, v. 10, p. 710–717. 2007.
- MENÉNDEZ, R. et al. Climate change and elevational range shifts: evidence from dung beetles in two European mountain ranges. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, p. 646–657. 2014.
- MORAES, J. C. B.; TAVARES, M.; BUENO, S. L. S. Taxonomic review of *Aegla marginata* Bond-Buckup & Buckup, 1994 (Decapoda, Anomura, Aeglidae) with description of a new species. **Zootaxa**, v. 4323, p. 519–533. 2017.
- MORRILL, J. C.; BALES, R. C.; CONKLIN, M. H. Estimating stream temperature from air temperature: implications for future water quality. **Journal of Environmental Engineering**, v. 131, p. 139–146. 2005.
- MORSE, J. C. Trichoptera World Checklist. entweb.clemson.edu/database/trichopt/index.htm. Accessed 14 March 2018. 2018.

NOLEN, J. A.; PEARSON, R. G. Factors affecting litter processing by *Anisocentropus kirranus* (Trichoptera: Calamoceratidae) from an Australian tropical rainforest stream. **Freshwater Biology**, v. 29, p. 469–479. 1993.

OLIVEIRA, G. T. et al. Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglidae). **Memoirs of Museum Victoria**, v. 60, p. 59–62. 2003.

PARMESAN, C.; YOHE, G. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. **Nature**, v. 421, p. 37–42. 2003.

PERRY, A. L. et al. Climate change and distribution shifts in marine fishes. **Science**, v. 308, p. 1912–1915. 2005.

RINCÓN, J.; MARTÍNEZ, I. Food quality and feeding preferences of *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae) **Journal of North American Benthological Society**, v. 25, p. 209–215. 2006.

ROFF, D. A. **Life History Evolution**. Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, MA. 2002.

ROOT, T. et al. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. **Nature**, v. 421, p. 57–60. 2003.

SANTOS, S., et al. Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). **Journal of Natural History**, v. 42, p. 1027–1037. 2008.

SPÄNHOFF, B. Effect of permanent shading on adult size and biomass of the caddisfly *Lype phaeopa* (Stephens, 1836). (Psychomyiidae). **Hydrobiologia**, v. 549, p. 179–186. 2005a.

SPÄNHOFF, B. Seasonal decline of body mass in adults of the wood-dwelling caddisfly *Lype phaeopa* (Psychomyiidae). **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 163, p. 369–382. 2005b.

STERNER, R. W.; ELSER, J. J. **Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere**. Princeton University Press: Princeton. 2002.

TREVISAN, A.; HEPP L. U.; SANTOS, S. Abundância e distribuição de Aeglidae (Crustacea: Anomura) em função do uso da terra na bacia hidrográfica do Rio Jacutinga, Rio Grande do Sul, Brasil. **Zoologia**, v. 26, p. 419–426. 2009.

VANNOTE, R. L. et al. The river continuum concept. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 37, p. 130–137. 1980.

VINAGRE, A. S.; DA SILVA, R. S. M. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 102, p. 579–583. 1992.

WALTHER G-R. et al. Ecological responses to recent climate change. **Nature**, v. 416, p. 389–395. 2002.

WEBSTER, J. R.; BENFIELD, E. F. Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 17, p. 567–594. 1986.

WRIGHT, M. S.; COVICH, A. P. Relative importance of bacteria and fungi in a tropical headwater stream: leaf decomposition and invertebrate feeding preference. **Microbial ecology**, v. 49, p. 536–546. 2005.

YANG, L. H.; RUDOLF, V. H. W. Phenology, ontogeny and the effects of climate change on the timing of species interactions. **Ecology Letters**, v. 13, p. 1–10. 2010.