



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO
CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

**SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE CAMARÕES DENDROBRANCHIATA SOB
ASPECTOS EVOLUTIVOS: PADRÕES MORFO-HISTOLÓGICOS E RECONSTRUÇÃO
DE ESTADO ANCESTRAL DE CARÁTER**

FERNANDA CRISTINA SALTI

**Rio Claro – SP
2020**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE CAMARÕES DENDROBRANCHIATA SOB ASPECTOS EVOLUTIVOS: PADRÕES MORFO-HISTOLÓGICOS E RECONSTRUÇÃO DE ESTADO ANCESTRAL DE CARÁTER

FERNANDA CRISTINA SALTI

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO JOSÉ ZARA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

S177s Salti, Fernanda Cristina
 Sistema reprodutor masculino de camarões
Dendrobranchiata sob aspectos evolutivos: padrões
morfo-histológicos e reconstrução de estado ancestral de
caráter / Fernanda Cristina Salti. -- Rio Claro, 2022
139 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Fernando José Zara

1. Zoologia. 2. Crustacea. 3. Filogenia. 4.
Dendrobranchiata. 5. Morfologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Sistema reprodutor masculino em Dendrobranchiata sob aspectos evolutivos: padrões morfo-histológicos e reconstrução de estado ancestral de caráter

AUTORA: FERNANDA CRISTINA SALTI
ORIENTADOR: FERNANDO JOSÉ ZARA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO JOSÉ ZARA 
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV/ UNESP

Profa. Dra. ANA FRANCISCA TAMBURUS GOMES 
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP/USP, Ribeirão Preto-SP

Prof. Dr. LUCAS REZENDE PENIDO PASCHOAL 
Campus Passos / Universidade Estadual de Minas Gerais

Rio Claro, 28 de fevereiro de 2020

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus avós que sempre me apoiaram e confiaram em mim.

Agradecimentos

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida (Código de Financiamento 001) e à CAPES Ciências do Mar II pela bolsa de Iniciação Científica (concedida no projeto CIMARII #1989/2014 processo 23038.004309/2014-51).

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

Agradeço ao Convênio CAPES PROAP e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro pelo auxílio financeiro.

Agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- FCAV/UNESP- Jaboticabal pela infraestrutura.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro ao Laboratório de Morfologia de Invertebrados DBAA – FCAV, UNESP Jaboticabal (Biota #201050188-8, Biota Intercrusta #2018/13685-5)

Agradeço ao meu orientador, Fernando José Zara, por todo conhecimento adquirido nestes sete anos, pela paciência, ajuda, por entender minhas dificuldades. Aprendi muito com você e sempre serei muito grata por isso. Obrigada por todas as oportunidades que tive no laboratório. Quero ser zoóloga como você! Obrigada pela orientação e pela amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Domingos Siqueira Tavares e ao Museu de Zoologia da USP- São Paulo por doar as espécies *Benthesicymus* sp. e *Aristaeopsis edwardsiana*, as quais foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Célio Magalhães e ao Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) por nos receber prontamente e doar as espécies de Sergestidae.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Sampaio Sant-Anna por ter nos auxiliado durante a saída de campo em Itacoatiara-AM e ter cedido seu laboratório para processarmos as amostras. Fiquei muito feliz em conhecê-lo depois de ouvir tantos elogios a seu respeito. Sempre serei muito grata por toda

ajuda que nos ofereceu, pelas saídas incansáveis em busca dos *Acetes*. Agradeço também à sua aluna de mestrado Rafaela Fernandes Batista por ter nos ajudado em campo e no laboratório.

Agradeço a todos os meus amigos do Laboratório de Morfologia de Invertebrados - LMI: Abner (*in memorian*), Camila, Bárbara, Maria Alice, Guilherme, Timóteo, Lucas e Leo Jaime (*in memorian*). Obrigada pelas correções, pelos conselhos, coletas. Agradeço em especial à Márcia. Você é o suporte do laboratório.

Agradeço ao Davi Rodrigo Rossatto, primeiramente pela amizade. Obrigada pelos conselhos, por sempre me ouvir. Sou muito grata por confiar tanto em mim (mais do que eu mesma). E obrigada por ter participado da avaliação deste projeto e por me ajudar tanto e sempre.

Agradeço ao professor Dr. Vitor Miranda e toda sua equipe, em especial a Me. Fernanda Rodrigues e Dr. Saura Rodrigues da Silva pelo conhecimento adquirido, auxílio e esclarecimento das questões filogenéticas deste trabalho. Agradeço à Amanda Barbosa e Ana Claudia Calchi pelos auxílios nas análises filogenéticas.

Agradeço a licença concedida para as coletas e transporte dos animais (Fernando José Zara, licença permanente de coleta de material zoológico, MMA-SISBIO número 34587-1).

Agradeço ao Djalma Rosa, vulgo Passarinho pelas coletas.

Agradeço a todas as pessoas - aos pescadores, em especial - que nos ajudaram de alguma maneira durante a coleta na Amazônia.

Agradeço a toda minha família. Este trabalho representa toda luta que tivemos e o resultado está aqui. Conseguimos! Amo vocês!

Auxílio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Brasil- Código de Financiamento 001.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

Resumo geral da dissertação

Estudos relacionando a morfologia funcional do sistema reprodutor masculino com a filogenia molecular podem auxiliar na resolução das relações filogenéticas de Dendrobranchiata, permitindo compreender a evolução de diferentes caracteres. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o sistema reprodutor masculino de várias espécies representantes de todas as famílias de Penaeoidea e Sergestoidea. Adicionalmente, foi realizada a descrição da morfologia do espermatozoide de Sergestoidea, ainda incipiente na literatura e analisada comparativamente com os Penaeoidea descritos na literatura científica. As espécies de Penaeoidea *Pleoticus muelleri*, *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Xiphopenaeus kroyeri*, *Rimapenaeus constrictus*, *Artemesia longinaris*, *Parapenaeus americanus*, *Sicyonia typica*, *Sicyonia dorsalis* e de Sergestoidea, *Belzebub faxoni*, *Acetes americanus* e *Acetes petrunkevitchi* foram coletadas em Ubatuba-SP. Os Sergestidae *Acetes marinus* e *Acetes paraguayensis*, os Penaeoidea *Aristaeopsis edwardsiana* (Aristeidae) e *Benthesicymus* sp. (Benthesicymidae) foram obtidos via doação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Para as rotinas de histologia e microscopia eletrônica de transmissão (exceto as amostras dos museus), o sistema reprodutor masculino foi fixado em paraformaldeído 4% e processado para historesina e fixado em solução Karnovsky para inclusão em Epon-Araldite, respectivamente. O filograma foi construído a partir de sequências concatenadas dos genes 16S rDNA e COI. A morfologia do sistema reprodutor masculino está relacionada com a filogenia do grupo. O estado plesiomórfico do vaso deferente parece ser a presença de dois dutos: o acessório e o espermático, sendo classificado como complexo em Aristeidae e Benthesicymidae (grupos irmãos) Penaeini e Solenoceridae (grupos irmãos) e em Sergestidae. A sinapomorfia do clado formado por Parapenaeini, Trachypenaeini e Sicyoniidae é o vaso deferente simples. A glândula acessória presente na região da ampola terminal é um caráter homoplásico. Com os resultados obtidos, podemos verificar padrões morfoanatômicos do sistema reprodutor masculino para cada grupo. Assim, este trabalho norteará os futuros estudos, tornando possível prever qual morfologia do sistema reprodutor masculino será observada nas espécies a serem estudadas. Além disso, este se trata do primeiro trabalho que analisa a história evolutiva do sistema reprodutor masculino em Dendrobranchiata.

Palavras-chave: espermatozoide, evolução, filogenia, histologia, taxonomia, ultraestrutura.

Abstract

Studies about the functional morphology of the male reproductive system utilizing molecular phylogeny can clarify the relationships of Dendrobranchiata, allowing us to understand the evolution of different characters. Thus, the objective of this work was to characterize the male reproductive system of several species in Penaeoidea and Sergestoidea. Additionally, the description of the sperm morphology of Sergestoidea, still incipient in the literature, was analyzed in comparison with the Penaeoidea described in the scientific literature. The species *Pleoticus muelleri*, *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Xiphopenaeus kroyeri*, *Rimapenaeus constrictus*, *Artemesia longinaris*, *Parapenaeus americanus*, *Sicyonia typica*, *Sicyonia dorsalis* and Sergestoidea species, *Belzebub faxoni*, *Acetes americanus* and *Acetes petrunkevitchi* were collected in Ubatuba-SP. The species *Acetes marinus* and *Acetes paraguayensis*, *Aristaeopsis edwardsiana* (Aristeidae) and *Benthesicymus* sp. (Benthesicymidae) were obtained via donation from the National Institute of Amazonian Research and the USP Zoology Museum - São Paulo. For routine histology and transmission electron microscopy (except museum samples), the male reproductive system was fixed in 4% paraformaldehyde and processed for historesin and fixed in Karnovsky solution for inclusion in Epon-Araldite. The phylogram was constructed from concatenated sequences of the 16S rDNA and COI genes. The morphology of the male reproductive system is related to the phylogeny of the group. The plesiomorphic state of the vas deferens seems to be the presence of two ducts: the accessory and the spermatic, classified as complex in Aristeidae and Benthesicymidae (sister groups), Penaeini and Solenoceridae (sister groups) and in Sergestidae. The synapomorphy of the clade formed by Parapenaeini, Trachypenaeini and Sicyoniidae was the simple vas deferens. The accessory gland present in the region of the ampulla is a homoplastic character. With the results obtained, we can verify morphoanatomical patterns of the male reproductive system for each group. Thus, this work will guide future studies, making it possible to predict which morphology of the male reproductive system will be observed in the species to be studied. Furthermore, this is the first work that analyzes the evolutionary history of the male reproductive system in Dendrobranchiata.

Keywords: evolution, histology, phylogeny, sperm, taxonomy, ultrastructure.

Sumário

Breve introdução do grupo de estudo.....	1
Referências Bibliográficas.....	3
Capítulo 1	6
Resumo	7
Abstract.....	8
Introdução.....	Error! Bookmark not defined.
Material e Métodos	13
<i>Coleta dos animais e dissecação</i>	13
<i>Histologia e Histoquímica</i>	14
<i>Inferência Filogenética e Reconstrução de estado ancestral de caráter</i>	15
Resultados.....	16
<i>Anatomia, Histologia e Histoquímica</i>	16
<i>Análise Filogenética</i>	24
<i>Reconstrução de estado ancestral de caráter</i>	24
Discussão	26
Referências Bibliográficas.....	40
TABELAS	46
FIGURAS E LEGENDAS.....	49
Capítulo 2	74
Resumo	75
Abstract.....	76
Introdução.....	77
Material e Métodos	80
<i>Coleta e dissecação</i>	80
<i>Histologia e histoquímica</i>	81
<i>Ultraestrutura dos Espermatozoides</i>	81
<i>Inferência Filogenética e Reconstrução de estado ancestral de caráter</i>	82
Resultados.....	83
<i>Anatomia, histologia e histoquímica</i>	83
<i>Ultraestrutura dos espermatozoides</i>	88
<i>Análise filogenética</i>	91
<i>Reconstrução de estado ancestral de caráter</i>	92
Discussão	93
Referências Bibliográficas.....	104
TABELAS	112
FIGURAS E LEGENDAS.....	117

Breve introdução do grupo de estudo

Os crustáceos Decapoda estão subdivididos em duas subordens: Dendrobranchiata, a qual é composta pela infraordem Penaeidea, e a subordem Pleocyemata, que agrupa os crustáceos que incubam os ovos e apresentam a zoea após a eclosão, esta é representada pelas infraordens Stenopodidea, Caridea, Astacidea, Thalassinidea, Palinura, Anomura e Brachyura (De Grave e Fransen, 2011). Os Dendrobranchiata são os camarões que apresentam como características compartilhadas as brânquias dendrobranquiadas, os ovos liberados livremente no meio e a eclosão das larvas como náuplios sendo a única exceção a este padrão os camarões da família Luciferidae (Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Atualmente, apresenta aproximadamente, 533 espécies descritas que se organizam em duas superfamílias: Sergestoidea Dana, 1852 e Penaeoidea Rafinesque, 1815 (De Grave e Fransen, 2011). Os camarões Sergestoidea são planctônicos, semitransparentes e diminutos, sendo compostos pelas famílias Luciferidae e Sergestidae. No Brasil, a família Sergestidae Dana, 1852 é representada por quatro espécies, sendo *Acetes americanus americanus* Ortmann, 1893 e *Acetes petrunkevitchi* (Burkenroad, 1945), coletados majoritariamente no verão e em águas rasas na região costeira do estado de São Paulo (Simões et al., 2013). Dentro desta família há ainda duas espécies com ocorrência no Brasil, as quais são adaptadas a baixos níveis de salinidade, como *Acetes marinus* Omori, 1975 com ocorrência em águas salobras na região hidrográfica do Tocantins-Araguaia, e *Acetes paraguayensis* Hansen, 1919, o único camarão Dendrobranchiata dulcícola, com distribuição nas bacias Amazônica e do Paraná (Omori, 1975; Xiao e Greenwood, 1993). A família Luciferidae De Haan, 1833, por sua vez, é composta apenas pelos gêneros *Belzebub* Vereshchaka, Olesen e Lunina, 2016 e *Lucifer* Thompson, 1829, com duas espécies abundantes no litoral do estado de São Paulo *Belzebub faxoni* (Borradaile, 1915) e *Lucifer typus* Milne Edwards, 1837 (Teodoro et al., 2012; Vereshchaka et al., 2016).

Em Penaeoidea, são encontradas cinco famílias: Penaeidae, Sicyoniidae, Solenoceridae, Aristeidae e Benthescymidae, totalizando mais de 500 espécies de camarões com distribuição

cosmopolita (Pérez-Farfante e Kensley, 1997; Costa et al., 2003; De Grave e Fransen, 2011). A família Penaeidae Rafinesque, 1815 possui aproximadamente 33 gêneros e 215 espécies de camarões (Pérez-Farfante e Kensley, 1997; De Grave e Fransen, 2011), as quais estão divididas em três tribos: Penaeini, Parapenaeini e Trachypenaeini. Recentemente, Ma et al. (2009), Camargo et al. (2016, 2017) e Cheng et al. (2018) baseados em dados moleculares, morfológicos e ultraestruturais do espermatozoide, indicaram diferenças significativas entre estes grupos, propondo que as tribos de Penaeidae sejam elevadas à famílias, uma vez que a família Sicyoniidae Ortmann, 1898 é grupo irmão de Trachypenaeini. Entretanto, apesar de vários trabalhos caracterizando a morfologia do sistema reprodutor masculino realizados com Penaeini (Malek e Bawab, 1974; Ro et al., 1990; Bauer e Cash, 1991; Chow et al. 1990; Fransozo et al., 2016), Trachypenaeini (Bauer e Min, 1993), Solenoceridae (Díaz et al., 2002) e Sicyoniidae (Bauer, 1991; Subramoniam, 1995) e diferentes propostas sobre a evolução do sistema reprodutor terem sido levantadas (Bauer, 1991), até o momento, nenhum trabalho comparativo mais amplo envolvendo as características anatômicas, histológicas e histoquímicas do sistema reprodutor masculino com todas as famílias de Dendrobranchiata foi realizado, o que dificulta o mapeamento de tais características para uma proposta sobre a evolução deste sistema, incluídos os espermatozoides. Assim, com a análise comparativa da morfologia do sistema reprodutor masculino para várias espécies de cada família de Dendrobranchiata poderá ser possível auxiliar na resolução de questões taxonômicas propostas na literatura e, ao mesmo tempo, propor um modelo mais abrangente sobre a evolução do sistema reprodutor e das células germinativas masculinas para estes camarões.

Desta maneira os objetivos da presente dissertação foram caracterizar a morfologia do sistema reprodutor masculino de Penaeoidea e Sergestoidea, além de propor a história evolutiva das características obtidas, incluído a ultraestrutura do espermatozoide, a fim de auxiliar no esclarecimento das relações de parentesco do grupo e inferir como se deu a evolução do sistema reprodutor masculino e do espermatozoide. Para a conclusão deste objetivo, este trabalho foi

dividido em dois capítulos. No capítulo I figura a evolução do sistema reprodutor masculino em Penaeoidea, obtido por meio do mapeamento de características morfológicas e histoquímicas com representantes de todas as famílias. No capítulo II foi realizado, pela primeira vez, o estudo do sistema reprodutor masculino em Sergestoidea, com a adição das características ultraestruturais do espermatozoide das espécies brasileiras, as quais foram associadas aos dados ultraestruturais obtidos na literatura, tornando possível analisar a história evolutiva dos camarões com brânquias dendríticas, por meios deste sistema e seus espermatozoides.

Referências Bibliográficas

Bauer, R. T. 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimps: a functional and phylogenetic perspective. *Crustacean Sexual Biol.* 183-207.

Bauer, R. T., Cash, C. E. 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 110:144-162.

Bauer, R. T., Min, L. J. 1993. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): formation in the male reproductive tract and disposition in their seminated female. *Biol. Bull.* 185:174-185.

Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. 2016. Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology.* 135:67-81.

Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. 2017. Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod. Struct. Dev.* 46:588-600.

Cheng, J., Chan, T. Y., Zhang, N., Sun, S., Sha, Z. L. 2018. Mitochondrial phylogenomics reveals insights into taxonomy and evolution of Penaeoidea (Crustacea: Decapoda). *Zool. Scr.* 47:582-594.

Chow, S. Dougherty, M. M., Dougherty, W. J., Sandifer, P. A. 1991. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *J. Crustac. Biol.* 11:201-216.

Costa, R. C. D., Fransozo, A., Melo, G. A. S., Freire, F. A. D. M. 2003. An illustrated key for Dendrobranchiata shrimps from the northern coast of São Paulo state, Brazil. *Biota Neotrop.* 3: 1-12.

De Grave, S., Fransen, C. H. J. M. 2011. Carideorum catalogus: the recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procaridean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). *Zool. Med.* 85:195-589.

Díaz, A. C., Fernandez-Gimenez, A. V, Petriella, A. M., Fenucci, J. L. 2002. Morphological and functional study of the male reproductive tract in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea). *Invertebr. Reprod. Dev.* 42:69-74.

Fransozo, V., Fernandes, A. B., Lopez-Greco, L. S., Zara, F. J., Santos, D. C. 2016. Functional morphology of the male reproductive system of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) (Crustacea, Penaeoidea) compared to other *Litopenaeus*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 60:161-174.

Ma, K. Y., Chan, T. Y., Chu, K. H. 2009. Phylogeny of penaeoid shrimps (Decapoda: Penaeoidea) inferred from nuclear protein-coding genes. *Mol. Phylogenetics Evol.* 53:45-55.

Malek, S. R. A., Bawab, F. M. 1974. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775) (Decapoda, Penaeidae): The initial formation of a sperm mass. *Crustaceana.* 26:273-285.

Omori, M. 1975. The systematics, biogeography, and fishery of epipelagic shrimps of the genus *Acetes* (Crustacea, Decapoda, Sergestidae). *Bull. Ocean Res.* 7:1-91.

Pérez-Farfante, I., Kensley, B. 1997. Penaeoid and Sergestoid shrimp and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. *Mém. Mus. natl. hist. nat.* 175:1-233.

Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J., Lawrence, A. L. 1990. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1–3. *J. Fish. Biol.* 10:455-468.

Simões, S. M., Castilho, A. L., Fransozo, Negreiros-Fransozo, M. L., Costa, R. C. A. 2013. Distribution related to temperature and salinity of the shrimps *Acetes americanus* and *Peisos petrunkevitchi* (Crustacea Sergestoidea) in the south-eastern Brazilian littoral zone. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 93:753-759.

Subramoniam, T. 1995. Light and electron microscopic studies on the seminal secretions and the vas deferens of the penaeiodean shrimp, *Sicyonia ingentis*. *J. Biosci.* 20:691-706.

Teodoro, S. S. A., Fransozo, M. L. N., Simões, S. M., Lopes, M., Costa, R. 2012. Population ecology of the planktonic shrimp *Lucifer faxoni* Borradaile, 1915 (Crustacea, Sergestoidea, Luciferidae) on the southeastern coast of Brazil. *Braz. J. Oceanogr.* 60:245-253.

Vereshchaka, A. L., Olesen, J., Lunina, A. A. 2016. A phylogeny-based revision of the family Luciferidae (Crustacea: Decapoda). *Zool. J. Linn. Soc.* 178:15-32.

Xiao, Y., Greenwood, J. G. 1993. The biology of *Acetes* (Crustacea, Sergestidae). *Oceanogr. Mar. Biol.* 31:259-444.

Capítulo 1

Evolução do sistema reprodutor masculino em camarões Penaeoidea (Dendrobranchiata) a partir de dados morfológicos e moleculares

Resumo

Trabalhos recentes demonstram inconsistências na filogenia de Penaeoidea, como a parafilía de Penaeidae. No presente estudo caracterizamos a morfologia do sistema reprodutor masculino de Penaeoidea e mapeamos os caracteres na filogenia molecular. O sistema reprodutor masculino de *Pleoticus muelleri*, *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepeneaeus brasiliensis*, *Xiphopenaeus kroyeri*, *Rimapeneaeus constrictus*, *Artemesia longinaris*, *Parapeneaeus americanus*, *Sicyonia typica*, *Sicyonia dorsalis*, *Aristaeopsis edwardsiana* e *Benthesicymus* sp. foi processado para historesina. A árvore evolutiva foi construída a partir do método de Inferência Bayesiana. Em Benthesicymidae e Aristeidae (grupos irmãos), Solenoceridae e Penaeini (grupos irmãos) o vaso deferente médio (MVD) apresenta os dutos acessório e espermático, sendo a sinapomorfia dos clados e a plesiomorfia de Penaeoidea. O clado formado por Trachypeneaeini, Parapeneaeini e Sicyoniidae apresenta o MVD com um ducto. Em Penaeini a glândula acessória é simples em *F. brasiliensis*, e complexa, com diversas câmaras glandulares em *L. schmitti*. Benthesicymidae, Aristeidae, Solenoceridae e Sicyoniidae não apresentam câmara glandular, sendo uma homoplasia. Em Trachypeneaeini e Parapeneaeini a glândula acessória é simplificada, sendo um caráter homoplásico. Em relação ao espermátóforo, a plesiomorfia parece ser a formação de um espermátóforo complexo. As análises filogenéticas mostraram que Penaeidae é um grupo parafilético e as tribos apresentam muitas diferenças no sistema reprodutor masculino, reforçando a necessidade de serem elevadas a famílias.

Palavras-chave: filogenia, histologia, Penaeidae, reconstrução de estado ancestral de caráter, vaso deferente.

Abstract

Recent studies shows inconsistencies in the phylogeny of Penaeoidea, such as the paraphyletic of Penaeidae group. In this study, we characterized the male reproductive system morphology of Penaeoidea and traced the ancestral evolutionary history. The studied species were *Pleoticus muelleri*, *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Xiphopenaeus kroyeri*, *Rimapenaeus constrictus*, *Artemesia longinaris*, *Parapenaeus americanus*, *Sicyonia typica*, *Sicyonia dorsalis*, *Aristaeopsis edwardsiana* and *Benthesicymus* sp. and the samples were processed for historesin. The evolutionary tree was built using the Bayesian Inference. In Benthesicymidae and Aristeidae (sister groups), Solenoceridae and Penaeini (sister groups) the median vas deferens (MVD) shows accessory and sperm ducts, that was the synapomorphy of the clades and the plesiomorphy of Penaeoidea. The clade formed by Trachypenaeni, Parapenaeni and Sicyoniidae presents the MVD with a single duct. In Penaeini, the accessory gland is simple in *F. brasiliensis*, and complex, with several glandular chambers in *L. schmitti*. Benthesicymidae, Aristeidae, Solenoceridae and Sicyoniidae not have a glandular chamber that was a homoplastic. In Trachypenaeni and Parapenaeni the accessory gland is simplified, being a homoplastic character. The complex spermatophore is the ancestral state. Our results shows that Penaeidae is paraphyletic and each tribe has significant differences in the male reproductive system, reinforced the taxonomic reorganization purposed.

Keywords: histology, Penaeidae, phylogeny, reconstruction of ancestral state of character, vas deferens.

Introdução

A superfamília Penaeoidea agrupa as principais espécies de camarões marinhos as quais são distribuídas em cinco famílias: Penaeidae, Sicyoniidae, Solenoceridae, Aristeidae e Benthescymidae, totalizando mais de 500 espécies registradas (Pérez-Farfante e Kensley, 1997; Costa et al., 2003; De Grave e Fransen, 2011). Penaeidae Rafinesque, 1815 está dividida em três tribos: Penaeini, Parapenaeini e Trachypenaeini, onde encontramos os camarões mais importantes do ponto de vista econômico sendo alvo da frota pesqueira (Severino-Rodrigues et al., 2002; Castilho et al., 2015). A família Sicyoniidae Ortmann, 1898 é composta por camarões conhecidos popularmente como camarões-pedra, importantes constituintes da macrofauna bentônica e fundamentais para as cadeias tróficas marinhas (Castilho et al., 2008a). Os Solenoceridae Wood-Mason e Alcock, 1891 são abundantes em grandes profundidades, entretanto *Pleoticus muelleri* (CS Bate, 1888) é abundante nas águas rasas do litoral paulista e também tem sido alvo da frota pesqueira (Pérez-Farfante, 1975; Severino-Rodrigues et al., 2002; Castilho et al., 2008b). Em Aristeidae Wood-Mason in Wood-Mason e Alcock, 1891 encontram-se espécies de profundidade (200 a 1850 metros) muito exploradas economicamente, principalmente no Mar Mediterrâneo (Belcari et al., 2003). A família Benthescymidae Wood-Mason in Wood-Mason e Alcock, 1891 por sua vez, é representada por espécies de profundidade ainda pouco estudadas.

A morfologia do sistema reprodutor masculino de crustáceos decápodes é muito variável e tem auxiliado na resolução de diversos problemas taxonômicos e evolutivos (Bauer, 1991). Em Penaeoidea, o sistema reprodutor masculino foi parcialmente estudado nos Sicyoniidae como *Sicyonia brevirostris* Stimpson, 1871, com apenas uma região do vaso deferente descrita, e em *Sicyonia ingentis* (Burkenroad, 1938) onde é apresentada a ultraestrutura do vaso deferente (Bauer, 1991; Subramoniam, 1995). Em Solenoceridae, somente *Pl. muelleri* e *Solenocera vioscai* Burkenroad, 1934, foram estudados, sendo que em *S. vioscai* somente uma região do vaso deferente foi descrita (Bauer, 1991; Díaz et al., 2002). Aristeidae apresenta pouquíssima informação, no qual

o sistema reprodutor de *Aristeus alcocki* Ramadan 1938 é apresentado com apenas duas imagens histológicas (Paramasivan et al., 2018). A família Benthescymidae é totalmente desconhecida do ponto de vista histológico existindo poucos estudos abordando a morfologia do petasma (Vereshchaka et al., 2017).

A família Penaeidae, seguindo a nomenclatura dos gêneros proposta por Pérez-Farfante Kensley (1997), é a mais bem estudada do ponto de vista histomorfológico. Para esta família a tribo Penaeini figura como a mais representativa, tendo o sistema reprodutor masculino conhecido para *Melicertus kerathurus* (Forsk., 1775) como *Penaeus kerathurus* em Malek e Bawab (1974), *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) e *Farfantepenaeus aztecus* (Ives, 1891) como *Penaeus duorarum* e *Penaeus aztecus* em Bauer (1991) e Bauer e Cash (1991), *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 (Feng et al., 2018), *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) como *Penaeus setiferus* em Ro et al., (1990), Bauer (1991), Bauer e Cash (1991) e Chow et al., (1991), *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) como *Penaeus vannamei* em Chow et al., (1991) e *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) em Fransozo et al. (2016). A outra tribo estudada foi Trachypenaeini com apenas uma espécie descrita, sendo *Rimapenaeus similis* (Smith, 1885) como *Trachypenaeus similis* em Bauer e Min (1993).

O sistema reprodutor masculino de Penaeoidea está localizado no cefalotórax, sendo constituído por um par de testículos e o par de *vasa deferentia*, os quais se abrem no coxopodito do 5º pereiópodo (King, 1948; Bauer, 1991). Os testículos têm morfologia variável, compostos por 7 a 10 pares de lóbulos testiculares formando uma rede entre o coração e o estômago (Bauer e Min, 1993; Fransozo et al., 2016). O vaso deferente de peneóideos está dividido em três regiões morfológicamente distintas: proximal (PVD), média (MVD) e distal (DVD), sendo o PVD a menor região do vaso deferente e se origina dos testículos (King, 1948; Ro et al., 1990; Bauer e Min, 1993; Fransozo et al., 2016). Esta região recebe os espermatozoides os quais estão imersos em pequena quantidade de secreção na luz do duto único, como descrito para Sicyoniidae, Penaeidae e

Solenoceridae e, portanto, considerada a morfologia padrão de Penaeoidea (Ro et al., 1990; Bauer e Min, 1993; Subramoniam, 1995; Díaz et al., 2002; Fransozo et al., 2016). O MVD pode apresentar variações morfológicas. Em Trachypenaeini e Sicyoniidae este é caracterizado como um ducto único (Bauer 1991; Bauer e Min, 1993; Subramoniam, 1995). Entretanto, nos Penaeini e em Solenoceridae o MVD é complexo e composto por dois ductos paralelos, o espermático e o acessório (Malek e Bawab, 1974; Ro et al., 1990; Bauer e Cash, 1991; Chow et al., 1991; Díaz et al., 2002; Fransozo et al., 2016).

O DVD se estende até a região mais dilatada do vaso deferente, formando a ampola terminal a qual também pode ser tratada como ducto ejaculatório e que possui diferentes complexidades relacionadas com a produção de espermátóforos (Ro et al., 1990; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991). Em *R. similis* a ampola possui organização simples, formada por apenas uma câmara anexa ao vaso deferente e produz a “substância plug”, cuja função é impedir inseminações subsequentes (Bauer e Min, 1993). Em contrapartida, em *L. schmitti*, *L. vannamei* e *L. setiferus* a ampola terminal apresenta maior complexidade, sendo formada por várias câmaras glandulares associadas ao ducto acessório e secretam diferentes materiais que serão subunidades adesivas do espermátóforo complexo nos camarões branco (Ro et al., 1990; Bauer e Cash, 1991; Fransozo et al., 2016), característica considerada plesiomórfica em Penaeoidea (Pérez-Farfante, 1969; Bauer, 1991). Por outro lado, em *F. duorarum* e *F. aztecus* ocorre uma câmara única a qual produz o material do apêndice que será associado ao espermátóforo, sendo este claramente diferente daquele descrito para *Litopenaeus* (Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991). Assim, apesar destes vários estudos, o conhecimento da anatomia e morfologia do sistema reprodutor masculino destes camarões ainda se encontra desconectado e isolado e uma análise comparativa com maior número de espécies de todas as famílias de Penaeoidea, pode tornar mais claras as relações de parentesco e como ocorreu a evolução deste sistema neste grupo.

O material seminal produzido pelos machos é depositado no tólico das fêmeas em Penaeoidea, o qual é classificado como aberto, sem receptáculo seminal (espermateca) ou fechado, com receptáculo seminal (Bauer, 1991; 1994; Pérez-Farfante e Kensley, 1997). O tólico aberto é encontrado nas famílias Solenoceridae, Aristeidae, Benthescymidae e no gênero *Litopenaeus* (Penaeidae). Nestes camarões o material seminal, o espermátóforo, é aderido externamente no corpo da fêmea, sendo considerado complexo devido a sua estrutura para suportar longa exposição ao ambiente (Bauer, 1986, 1991, 1994; Chow et al., 1991; Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Nas espécies com tólico fechado, o material espermático é inserido no receptáculo seminal, classificado como pareado e não pareado (Bauer, 1991, 1994; Pérez-Farfante e Kensley, 1997). No tipo pareado, o receptáculo é formado por duas invaginações separadas em direção ao interior da cavidade cefalotorácica, revestidas por cutícula. Sua abertura é protegida pelas placas do esternito XIII, XIV ou ambos, formando uma fenda transversal ao eixo crânio-caudal do corpo, encontrado em Parapenaeini, Trachypenaeini e Sicyoniidae. No receptáculo seminal não pareado, as invaginações estão ausentes, configurando uma câmara única. As placas laterais do esternito XIV podem se encontrar mesialmente, formando uma fenda longitudinal (crânio-caudal) ou forma uma placa única com abertura na margem anterior, sendo este tipo encontrado em Penaeini (Bauer, 1994; Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Nas espécies com receptáculo seminal pareado, o material espermático transferido é mais simplificado, com pequenos espermátóforos esféricos, como em *R. similis* (Bauer e Min, 1993) ou a massa espermática, característica do espermátóforo de Sicyoniidae, composto por espermatozoides livres no fluido seminal (Bauer, 1991). Esta internalização do espermátóforo ao corpo da fêmea é considerada uma característica derivada (Pérez-Farfante, 1969; Bauer, 1991).

Diversos trabalhos foram realizados a fim de esclarecer a filogenia de Penaeoidea, a qual parece estar bem estabelecida (Ma et al., 2009; Camargo et al., 2017; Cheng et al., 2018, Hurzaid et al., 2020). Ma et al. (2009) realizaram uma análise com base nas sequências do DNA de genes nucleares e mitocondriais e detectaram que Penaeidae é um grupo parafilético, uma vez que

Trachypenaeini é grupo irmão de Sicyoniidae (Ma et al., 2009). Camargo et al. (2016, 2017) por meio da ultraestrutura do espermatozoide associada à filogenia molecular, observaram que Penaeini possui características plesiomórficas, enquanto Trachypenaeini e Sicyoniidae apresentam características mais derivadas corroborando os resultados de Ma et al. (2009). Com base em análises moleculares com genoma mitocondrial, Cheng et al. (2018) corroboraram a monofilia de Penaeoidea e mostraram com alto grau de suporte que as famílias, Solenoceridae, Sicyoniidae, Aristeidae e Benthescymidae são monofiléticas, enquanto Penaeidae foi polifilético, suportando a proposta que as tribos de Penaeidae sejam elevadas a nível taxonômico de família. Recentemente, Hurzaid et al. (2020) também demonstraram a parafilia de Penaeidae, sendo Trachypenaeini grupo irmão de Sicyoniidae. Em adição, apesar de não ter sido discutido nos trabalhos, tanto a ultraestrutura do espermatozoide como a filogenia utilizando o genoma mitocondrial separaram os gêneros *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus* (Camargo et al., 2017; Cheng et al., 2018), os quais foram sinonimizados em *Penaeus* (Ma et al., 2011) sendo ainda mantido como válido.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a evolução do sistema reprodutor masculino de Penaeoidea por meio do mapeamento de características morfológicas e histoquímicas e, adicionalmente, auxiliar no esclarecimento das relações de parentesco e transferência espermática deste grupo.

Material e Métodos

Coleta dos animais e dissecação

As espécies de camarão *L. schmitti*, *F. brasiliensis*, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), *Rimapenaeus constrictus* (Stimpson, 1871), *Artemesia longinaris* CS Bate, 1888, *Sicyonia typica* (Boeck, 1864), *Sicyonia dorsalis* Kingsley, 1878 e *Pl. muelleri* foram coletadas no Município de Ubatuba, Estado de São Paulo, Brasil (25°07'38,5''S/47°52'50,8''W), entre Março de 2015 a Janeiro de 2019, utilizando-se barco de pesca camaroeira com o auxílio de redes do tipo “double

rig”, realizando arrastos por cerca de 20 minutos. Exemplares de *Parapenaeus americanus* Rathbun, 1901 foram coletados em Agosto de 2015 por meio de arrasto no Município de São Sebastião, Estado de São Paulo, Brasil (24°07′36,5″S/44°40′10″W) durante cruzeiro oceanográfico com o navio de pesquisa “Soloncy Moura” (CEPSUL/ICMBio/MMA). As espécies *Aristaeopsis edwardsiana* (Johnson, 1868) e *Benthesicymus* sp. CS Bate, 1881 foram doadas pelo Museu de Zoologia da USP - São Paulo. Os animais foram transportados vivos (exceto as espécies doadas) até o laboratório de Morfologia de Invertebrados da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP ou processados no navio. Os indivíduos foram anestesiados por choque térmico (-20°C) durante 15 minutos (López Greco et al., 1999) e dissecados para a remoção do sistema reprodutor masculino. A coleta e transporte dos indivíduos obedeceram às leis brasileiras (licença permanente de coleta de material zoológico concedida ao Prof. Dr. Fernando José Zara, MMA-SISBIO número 34587-2).

Histologia e Histoquímica

Para a caracterização morfológica e histoquímica, o sistema reprodutor masculino dos machos maduros (n= 4) das espécies foi fixado em paraformaldeído 4% em água do mar (pH 7,4) durante 24 a 48 horas. As espécies obtidas no Museu de Zoologia da USP (*Ari. edwardsiana*, n= 1; e *Benthesicymus* sp., n= 2) estavam preservadas em álcool 70% e passaram pelo processo de reidratação e posteriormente, foram fixadas em paraformaldeído 4% em água destilada. Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) e novamente desidratadas em séries crescentes de etanol (70 a 95%), embebidos e incluídos em resina glicol-metacrilato Leica®, seguindo rotina indicada pelo fabricante. Os cortes seriados de 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo. Para descrição histológica geral o material foi corado com hematoxilina e eosina (Junqueira e Junqueira, 1983). Para as análises histoquímicas utilizou-se a técnica de Xylidine Ponceau para proteínas (Mello e Vidal, 1980) e Ácido Periódico de

Shiff (PAS) para polissacarídeos neutros. As lâminas foram fotografadas e digitalizadas no microscópio de luz Leica DM 2000 com uso do programa Leica IM50.

Inferência Filogenética e Reconstrução de estado ancestral de caráter

Para as inferências filogenéticas foram construídos filogramas utilizando sequências concatenadas dos genes 16S rDNA e COI mtDNA de todas as espécies do presente trabalho disponibilizadas na plataforma GenBank (Tabela 1). O alinhamento das sequências foi feito utilizando o software Clustal/W (Thompson et al., 1994) via Bioedit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Os alinhamentos salvos em “FASTA” foram convertidos em formato “NEXUS” no Alignment Transformation Environment (Glez-Peña et al., 2010). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi encontrado seguindo o critério de AIC no software jModelTest 2 (Guindon e Gascuel, 2003), resultando no modelo GTR+G+I. A hipótese filogenética foi reconstruída com o método de Inferência Bayesiana utilizando o software MrBayes 3.2.2 on XSEDE (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) via plataforma online CIPRES (Miller et al., 2010) com 9×10^6 de gerações e 25% de burn-in. A edição das árvores filogenéticas, assim como o enraizamento utilizando sequências de camarões da família Sergestidae (via grupo externo), foi realizada utilizando o software FigTree 1.3.1 (Rambaut, 2009). Posteriormente, foi construída uma matriz contendo os dados histomorfológicos do sistema reprodutor masculino das espécies estudadas no presente trabalho e a partir da literatura científica disponível (Malek e Bawab, 1974; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Bauer e Min 1993; Fransozo et al., 2016; Feng et al., 2018). Nesta matriz, os caracteres selecionados por meio dos cortes histológicos foram o vaso deferente, glândula acessória na região da ampola terminal e espermatóforo. Para designar o estado do caráter, foram atribuídos números, sendo: “vaso deferente” podendo ser simples (1) ou complexo (2), a glândula acessória podendo estar ausente (0), ser simples (1) ou complexa (2) e o espermatóforo foi classificado como simples (1), unidades esféricas (2) ou complexo (3). Nas espécies com dados insuficientes, o estado

atribuído foi o símbolo “?” (Tabela 2). A espécie *Benthesicymus* sp. não foi incluída na filogenia molecular devido a ausência de sequências disponibilizadas no GenBank. Entretanto, a mesma foi incluída no mapeamento morfológico. A matriz, juntamente com a árvore gerada pela Inferência Bayesiana, foi carregada no software Mesquite v.3.04 (Maddison e Maddison, 2015) para a reconstrução da história do caráter pelo critério de parcimônia.

Resultados

Anatomia, Histologia e Histoquímica

O sistema reprodutor masculino do solenocerídeo *Pl. muelleri* é constituído por um par de testículos e de *vasa deferentia* que se estendem até a região da ampola terminal (Fig. 1 A). O testículo forma uma massa única, não apresentando lóbulos digitiformes (Fig. 1 A). O PVD é delgado e convoluto enquanto o MVD é dilatado e curto (Fig. 1 A). Na região distal do vaso deferente, nota-se a dilatação da ampola terminal (Fig. 1 A). Por meio da histologia, observa-se que o PVD de *Pl. muelleri* apresenta um duto único e simples, com epitélio estratificado (Fig. 1B). No entanto, a partir do MVD, o vaso deferente apresenta dois dutos: o espermático e o acessório (Fig. 1C). No duto espermático observam-se espermatozoides empacotados em estruturas semelhantes a “espermatóforos” esféricos a elípticos imersos em secreção granular basófila. Esses espermatóforos estão conectados uns aos outros, formando um longo cordão espermático (Fig. 1C e D). Esta observação foi obtida após a análise do material espermático no interior do espermatóforo aderido ao externo da fêmea (não documentado aqui). Ao redor da secreção granular basófila, nota-se secreção levemente acidófila formando uma camada com massas semelhantes a grânulos mucosos, perfazendo a secreção tipo I (s1), com uma camada intensamente acidófila em uma só margem do epitélio do duto espermático, formando a secreção tipo II (Fig. 1 C). O duto espermático é separado do duto acessório por um tiflossole, ambos com epitélio estratificado com núcleos altos (Fig. 1 D e E). No duto acessório, observa-se um terceiro tipo de secreção, sendo a mais externa com maior

intensidade de reação a eosina (Fig. 1 E). As secreções granulares do ducto espermático são fortemente reativas para proteínas na periferia dos grânulos e menos reativa nas porções centrais, sendo o resultado inverso para os polissacarídeos neutros (Fig. 1 F e G). As secreções do ducto acessório apresentaram forte reação para proteínas e polissacarídeos neutros, sendo uma glicoproteína, porém a capa de secreção mais externa, fortemente acidófila é somente positiva para polissacarídeos neutros (Fig. 1 E - G). Na região do DVD, os ductos justapostos permanecem totalmente separados estendendo-se até a região da ampola terminal, a qual é dilatada, porém sem a presença de câmaras glandulares ou únicas, que serão tratados nesse trabalho como glândula acessória (Fig. 1 H). Apesar de não apresentar uma câmara glandular, o epitélio da região da ampola apresenta grande atividade secretora, produzindo outro tipo de secreção acidófila que é adicionada ao cordão espermático, o que faz este cordão permanecer cercado em ambos os lados por secreção acidófila (Fig. 1 H e I). Desta maneira, o espermátóforo desta espécie é formado por quatro tipos de secreções, sendo duas provenientes do ducto espermático, uma produzida no ducto acessório e a secreção da ampola terminal (Fig. 1 I). Sobre o epitélio colunar, nota-se o tecido muscular bastante desenvolvido (Fig. 1 I). A histoquímica da região da ampola mostrou que a secreção produzida pelo epitélio da ampola foi fortemente positiva para proteínas e polissacarídeos neutros, porém o material granular do ducto espermático encontra-se com a mesma característica histoquímica da região anterior (Fig. 1 J e K).

Nos representantes da tribo Penaeini, *L. schmitti* e *F. brasiliensis*, o sistema reprodutor masculino também segue o padrão pareado de testículos e *vasa deferentia* (Fig. 2 A). O testículo apresenta lóbulos digitiformes e com tamanho proporcional, sem alteração cefalo-caudal (Fig. 2 A). O PVD nessas espécies é um túbulo convoluto e delgado, já o MVD é curto e claramente dilatado, principalmente quando comparado com a próxima região (Fig. 2 A). O DVD é um túbulo delgado que se estende e sofre uma dilatação acentuada para formar a ampola terminal (Fig. 2 A). Nos cortes histológicos, o PVD é caracterizado por um ducto simples e único, apresentando um epitélio

colunar simples, com células portando núcleos basais, sendo o ducto envolto por espessa musculatura (Fig. 2 B). O lúmen contém pequena quantidade de secreção acidófila e glicoproteica, onde os espermatozoides imaturos, devido à ausência do espinho, encontram-se livres (Fig. 2 B - D). Na região do MVD, o vaso deferente encontra-se dividido em dois ductos, o espermático e o acessório, justapostos, independentes e separados por tecidos epitelial e conjuntivo que formam o tiflossole. Ambos os ductos apresentam epitélio estratificado com células altas (Fig. 2 E e I). No ducto espermático encontram-se os espermatozoides que são circundados por secreções homogêneas e acidófilas reativas a proteínas e polissacarídeos neutros, imersos em secreção tipo I, reativa para proteínas e polissacarídeos neutros (Fig. 2 E - K). No ducto acessório evidencia-se outro tipo de fluido seminal, mais compacto e homogêneo, fortemente acidófilo e glicoproteico na periferia, fracamente positivo para proteínas e polissacarídeos neutros na porção central (Fig. 2 I - K). Os espermatozoides de *F. brasiliensis* ainda estão imaturos no MVD, não apresentando o espinho, enquanto em *L. schmitti* os espermatozoides estão maduros, com o espinho nesta região (Fig. 2 H e L).

A ampola terminal dos Penaeini estudados apresenta dois padrões, sendo um mais complexo na espécie de tético aberto e um simplificado, observado na espécie de tético fechado. Em *F. brasiliensis* a região da ampola terminal possui três câmaras: duas são extensões do DVD, sendo os ductos espermático e acessório, e a terceira é formada pela glândula acessória simples e com câmara única (Fig. 3 A). No ducto espermático encontram-se os espermatozoides imersos em secreção basófila, a secreção tipo I (s1), e esta é circundada por uma secreção acidófila, a secreção tipo II (s2) (Fig. 3 B). As secreções do ducto espermático e acessório de *F. brasiliensis* mantiveram as mesmas características químicas da região anterior (Fig. 3 C e D). A glândula acessória é formada por uma câmara simples, totalmente isolada do ducto acessório com somente um ponto de conexão com este ducto, próximo da abertura do gonóporo, sempre circundada por uma espessa camada de musculatura (Fig. 3 E). A secreção da glândula em *F. brasiliensis* é acidófila, sendo reativa para

proteínas e negativa para polissacarídeos neutros (Fig. 3E, F e G). Assim, o espermátforo de *F. brasiliensis* apresenta quatro tipos de secreções, sendo duas secreções do ducto espermático, a secreção do ducto acessório e a secreção da glândula acessória. Em *L. schmitti* também se observam as três câmaras, entretanto, a glândula acessória é mais especializada, formada por dobras internas formando várias câmaras glandulares, as quais liberam seus produtos de secreção de maneira independente sendo a secreção no ducto acessório isolada por um segundo tiflossole, que se sobrepõe ao primeiro tiflossole que vem desde a região mediana do vaso deferente (Fig. 3 H). O epitélio das câmaras glandulares é simples colunar e produz secreção eosinófila, fortemente positiva para proteínas (Fig. 3 I e J). No ducto espermático, notam-se os espermatozoides imersos em secreção acidófila (s1), circundada por uma camada delgada de secreção basófila (s2) e externamente há uma camada de secreção fortemente acidófila, a secreção do tipo III (s3) (Fig. 3 K). Sendo assim, o espermátforo de *L. schmitti* é composto por cinco tipos de secreções: três secreções do ducto espermático, uma secreção do ducto acessório e a secreção da glândula. A s1 apresenta reação positiva para proteínas e polissacarídeos neutros, a s2 é fortemente positiva para proteínas e negativa para polissacarídeos neutros e a s3, por sua vez, é fracamente positiva para proteínas e negativa para polissacarídeos neutros (Fig. L e M).

A anatomia do sistema reprodutor masculino nos Parapeneaeini *A. longinaris* e *Pa. americanus*, segue o padrão até agora descrito, caracterizada também pelo sistema reprodutor masculino bilateral, pareado de testículos e vaso deferente (Fig. 4 A). O testículo forma uma massa única devido à fusão dos lóbulos recobertos por tecido conjuntivo, não evidenciando assim as estruturas digitiformes, porém mais estreito em direção cefálica (Fig. 4 A). O PVD é bastante convoluto e delgado e o MVD é dilatado e curto (Fig. 4 A). O DVD tem sua porção bastante longa e torna-se dilatada na ampola terminal, a qual se encontra no coxopodito do quinto par de pereiópodos (Fig. 4 A). A histologia e histoquímica do sistema reprodutor masculino foram muito semelhantes nas duas espécies. O vaso deferente possui apenas um ducto único simples, que se

estende até a região da ampola terminal. O PVD possui epitélio colunar simples produtor de secreção e com núcleos lobulados como se estivessem em alturas distintas (Fig. 4 B e C). No lúmen observa-se somente uma grande massa de espermatozoides livres envoltos por uma secreção acidófila, a s1, reativa para proteínas e fracamente positiva para polissacarídeos neutros (Fig. 4 B-E). O MVD é um ducto simples e dilatado quando comparado ao PVD e possui epitélio pavimentoso simples envolto por musculatura (Fig. 4 F e G). Nesta região, nota-se a presença de outra secreção, a s2, compacta e intensamente acidófila que envolve os espermatozoides imersos na s1, formando uma grande massa espermática (Fig. 4 G). Esta secreção é intensamente positiva para proteínas e negativa para polissacarídeos neutros (Fig. 4 H e I). Na ampola terminal, a dilatação é formada pela extensão do DVD e pela glândula acessória (Fig. 4 J e O). Os espermatozoides no DVD de *Pa. americanus* encontram-se imersos em uma secreção basofílica homogênea (s1), delimitada por uma secreção acidófila (s2). Todo este material é envolto por secreção granulosa, fortemente basófila (s3) (Fig. 4 K). O epitélio do DVD se mantém pavimentoso e circundado por espessa camada de musculatura, a qual é contínua e espessa à da ampola (Fig. 4 K e P). A região da ampola terminal de *Pa. americanus* possui organização simples, contendo apenas uma câmara glandular com epitélio estratificado e no lúmen ocorre secreção homogênea, basófila e glicoproteica (Fig. 4 L - N). A ampola terminal de *A. longinarius* também apresenta a glândula acessória simples (Fig. 4 O). Os espermatozoides estão imersos em secreção acidófila s1, circundada pela secreção s2 fortemente acidófila e nota-se, ainda, a secreção s3 acidófila e granular (Fig. 4 P). Assim, o espermatóforo destas espécies é formado por quatro secreções: três são produzidas no vaso deferente e a quarta é proveniente da glândula acessória. O epitélio da glândula acessória é estratificado, porém, com pequeno número de camadas, sendo a secreção também glicoproteica, com intensidade de reação menor que em *Pa. americanus* (Fig. 4 Q - S).

O sistema reprodutor masculino em Trachypenaeini também é constituído por um par de testículos formado por 6-10 lóbulos, os quais são digitiformes e menores na região cefálica que

desembocam no *vasa deferentia* (Fig. 5 A). O PVD segue o padrão de um túbulo convoluto, o qual parece ser bem longo e esbranquiçado, sendo o MVD mais alongado e menos dilatado quando comparado a outras espécies (Fig. 5 A). O DVD estreito em relação ao MVD se estende até a ampola terminal (Fig. 5 A). Histologicamente, o sistema reprodutor masculino dos Trachypenaeini *X. kroyeri* e *R. constrictus* foram muito similares em termos de formação de espermátóforos, composição química do fluído seminal e organização tecidual (Fig. 5). Nestas espécies o PVD caracteriza-se como um duto único e simples, no qual os espermatozoides provenientes dos testículos ficam imersos em secreção (Fig. 5 B e D). Esta região foi dividida em duas porções, sendo a anterior (PVDa) com a presença de espermatozoides livres imersos na secreção basófila tipo I (s1), proveniente do testículo e envolta por secreção tipo II (s2), menos basófila e coagulada como grânulos (Fig. 5 B e D). A secreção s1 apresentou reação fracamente positiva para proteínas, a qual é produzida pelo epitélio cúbico-colunar simples (Fig. 5 C). A secreção s2 começa a separar os espermatozoides em massas menores, sendo muito reativa para proteínas (Fig. 5D e E). Na porção posterior (PVDp), observa-se o epitélio pavimentoso e nota-se o empacotamento dos espermatozoides em espermátóforos. A secreção s2 é responsável por formar a parede da estrutura transportadora de espermatozoides, o espermátóforo, por aglutinação (Fig. 5G). A s1 é glicoproteica, positiva ao Xylidine Ponceau e PAS, enquanto que a parede é fortemente reativa para proteínas (Fig. 5 G e H). O MVD é um duto simples com lúmen amplo, também delimitado por epitélio pavimentoso contendo numerosos espermátóforos esféricos (Fig. 5 I). As secreções s1 e s2 do MVD apresentaram as mesmas características histoquímicas da região anterior, porém a secreção tipo I foi mais reativa para polissacarídeos neutros ao PAS (Fig. 5J e K). O DVD é caracterizado pelo aumento da camada de musculatura sobre o epitélio, o qual se estende até a região da ampola terminal em ambos Trachypenaeini (Fig. 5 L e Q). O DVD possui epitélio pavimentoso, com lúmen preenchido por secreção e espermátóforos, ambos com a mesma característica histoquímica que o MVD (Fig. 5 N). A ampola terminal é composta pela extensão do

duto simples do DVD e pela glândula acessória simples, contendo somente uma câmara glandular (Fig. 5 L e Q). Para ambas as espécies o conteúdo luminal da glândula acessória é intensamente reativo para proteínas (Fig. 5 O e S). A glândula acessória produz secreção fracamente reativa para polissacarídeos neutros em *X. kroyeri* (Fig. 5 P) e negativa para *R. constrictus* (Fig. 5 T). O espermatóforo destas espécies apresenta três tipos de secreção: uma circundando os espermatozoides no interior das unidades esféricas a qual é o principal componente do fluido seminal, outra secreção que circunda as unidades esféricas e a secreção da glândula acessória.

Em Sicyoniidae, o sistema reprodutor masculino é típico de Penaeoidea, seguindo o padrão das famílias anteriormente descritas (Fig. 6 A). O testículo apresenta lóbulos digitiformes e discretos, sendo menores na região cefálica (Fig. 6 A). Em ambas as espécies de Sicyoniidae, o PVD é convoluto com o diâmetro do duto reduzido (Fig. 6 A). O MVD é longo e convoluto, mais estreito que a região anterior e marcadamente mais esbranquiçado devido à quantidade de secreção luminal (Fig. 6 A). O DVD apresenta uma leve dilatação que está inserida no coxopodito, formando uma discreta ampola, diferente das outras espécies (Fig. 6 A e N). Em *S. typica* e *S. dorsalis* a histologia do sistema reprodutor masculino mostrou ser um duto simplificado desde o PVD até o DVD (Fig. 6 B). Toda a extensão do vaso deferente possui o duto formado por epitélio colunar simples, com a musculatura tornando-se mais espessa desde o MVD para o DVD, sempre com espermatozoides maduros livres imersos em um único tipo de secreção seminal (Fig. 6 B-I). Esta secreção é composta por uma matriz basófila homogênea ao redor dos espermatozoides, com grânulos acidófilos na sua constituição (Fig. 6 C). Tais grânulos são reativos para proteínas (Fig. 6 D). O MVD possui epitélio pavimentoso simples com o mesmo tipo de secreção que o PVD, sendo basófila e fracamente proteica (Fig. 6 E - H). O DVD possui epitélio simples variando de cúbico a achatado com o mesmo tipo de secreção observado nas regiões anteriores (Fig. 6 I e J). Assim, consideramos que o espermatóforo de Sicyoniidae não é estruturado com distintas camadas ou unidades separadas, como nas outras espécies, sendo somente uma massa espermática protéica sem

polissacarídeos neutros e ácidos e, portanto, muito simplificado (Fig. 6 K, L e M). Como descrito na anatomia, na porção mais distal do DVD, o lúmen torna-se bastante amplo, envolto por várias camadas de musculatura formando a ampola ou ducto ejaculatório, sem a presença da glândula acessória (Fig. 6 N, O e P).

O sistema reprodutor masculino de *Ari. edwardsiana*, pertencente à família Aristeidae, é constituído por um testículo pareado formando uma massa única e *vasa deferentia* (Fig. 7 A). O vaso deferente é dividido em PVD, MVD e DVD com a dilatação na porção final do vaso, sendo a ampola terminal (Fig. 7 A), assim como nas demais espécies. O PVD é caracterizado como um ducto simples (Fig. 7 B). Apesar do estado de preservação do material não ter sido o ideal, uma vez que este foi proveniente de museu e fixado em álcool, além de ser uma espécie de grande profundidade, a partir do MVD parece existir o tiflossole dividindo o vaso deferente em dois ductos: acessório e espermático (Fig. 7 C). Na ampola terminal, nota-se a extensão da DVD com o tiflossole presente (Fig. 7 D e E). Não foi observada nenhuma estrutura que se assemelhe à glândula acessória, salvo a condição de preservação do material (Fig. 7 D). Desta maneira, acreditamos que *Ari. edwardsiana* não apresenta a glândula acessória. Em relação ao espermatóforo, não podemos concluir quantas camadas de secreção este apresenta devido à preservação do material ter sido feita em álcool.

Em *Benthesicymus* sp., representante da família Benthesicymidae, o sistema reprodutor masculino é bilateral, sendo um par de testículos com lóbulos digitiformes e *vasa deferentia* (Fig. 8 A). O vaso deferente é dividido em PVD, MVD e DVD, o qual se estende até a região da ampola terminal (Fig. 8 A). O PVD parece ser convoluto, enquanto o MVD e o DVD são alongados (Fig. 8 A). Na histologia, pode-se observar que o PVD é um ducto simples (Fig. 8 B e C). O epitélio desta região parece ser delgado e no lúmen observa-se um material com aspecto granular agrupado em pequenas estruturas esféricas (Fig. 8 D). No MVD, o vaso deferente está dividido em dois ductos: acessório e espermático, separados pelo tiflossole, melhor preservado nesta espécie (Fig. 8 E). Na região da ampola terminal, nota-se uma dilatação, sendo a extensão da DVD (Fig. 8 F). A ampola

terminal é circundada por uma camada de tecido muscular (Fig. 8 G). Acredita-se que esta espécie não apresenta a glândula acessória, mas aparentemente, o epitélio da ampola terminal apresenta atividade secretora, produzindo secreção adicional à do vaso deferente (Fig. 8 G). O espermatóforo desta espécie parece ser um cordão espermático formado por quatro secreções do ducto espermático, uma secreção do ducto acessório e a secreção produzida pelo epitélio da ampola terminal. Entretanto, devido a preservação em álcool, as características do epitélio e das secreções, bem como o empacotamento dos espermatozoides, podem apresentar algumas distorções em relação ao material *in vivo*.

Análise Filogenética

O filograma gerado por Inferência Bayesiana utilizando sequências dos genes 16S rDNA e COI mtDNA mostrou grupos suportados por probabilidade posterior com valores acima de 0,8 (Fig. 10). A partir da topologia apresentada, a monofilia da superfamília Penaeoidea é suportada com probabilidade posterior 1.0. É possível perceber a formação de três clados dentro de Penaeoidea. As famílias Aristeidae e Benthescymidae constituem um clado. A tribo Penaeini e a família Solenoceridae compõem o segundo clado. As tribos Trachypenaeini e Parapenaeini, por sua vez, formam um clado com a família Sicyoniidae. A tribo Trachypenaeini é grupo irmão de Sicyoniidae. Desta maneira, as famílias Aristeidae, Benthescymidae, Solenoceridae e Sicyoniidae apresentaram-se como monofiléticas, em contraposição, Penaeidae é um grupo parafilético (Fig. 10).

Reconstrução de estado ancestral de caráter

A partir da reconstrução de história de caráter, pode-se observar que o “vaso deferente”, classificado como simples, quando possui somente um ducto, ou complexo, com os dutos acessório e espermático está relacionado com a filogenia de Penaeoidea (Fig. 11). A sinapomorfia dos clados formados por Benthescymidae e Aristeidae, Solenoceridae e Penaeini é a presença de dois dutos a

partir do MVD e, portanto, classificado como complexo. Enquanto no clado formado por Parapenaeni, Trachypenaeni e Sicyoniidae, o caráter compartilhado entre eles é a presença de apenas um duto no vaso deferente (Fig. 11).

Em relação à “glândula acessória da região da ampola terminal”, esta aparece como um caráter homoplásico dentro de Penaeoidea (Fig. 12). A sinapomorfia do clado composto por Benthescymidae e Aristeidae é a ausência da glândula acessória. Em Solenoceridae uma das faces do duto acessório produz uma secreção específica como se ocorresse uma glândula, porém sem câmara. Em Sicyoniidae também há ausência da câmara glandular, sendo um caráter homoplásico. Na tribo Penaeini, esta foi classificada como simples no gênero *Farfantepenaeus*. No gênero *Litopenaeus* a glândula é complexa e parece ser uma autapomorfia do gênero. Em relação ao segundo clado, formado por Parapenaeni, Trachypenaeni e Sicyoniidae, a glândula acessória simples é uma característica em comum entre as tribos de Penaeidae (Fig. 12).

O caráter “espermatóforo” pode ser simples, complexo ou em unidades esféricas de acordo com o número de camadas de secreção. O espermatóforo simples apresenta somente uma matriz de secreção com espermatozoides livres. Para as espécies que apresentam quatro tipos de secreção ou mais, este foi classificado como complexo. As unidades esféricas apresentam três tipos de secreção e são empacotados em pequenas estruturas esféricas. Nos clados formados por Benthescymidae e Aristeidae, Solenoceridae e Penaeini este é classificado como complexo. Esta característica é a sinapomorfia dos clados. Em Parapenaeni, o espermatóforo apresenta quatro camadas de secreção e, portanto este foi classificado como complexo (Fig. 13). A tribo Trachypenaeni apresenta o espermatóforo em unidades esféricas, sendo uma característica exclusiva do grupo (Fig. 13). A família Sicyoniidae apresenta redução da complexidade do espermatóforo sendo o espermatóforo simples a característica exclusiva do grupo (Fig. 13).

Discussão

Neste trabalho demonstramos a existência de diferentes padrões histológicos do sistema reprodutor masculino de Penaeoidea, os quais se diferem significativamente entre as famílias e entre as tribos de Penaeidae, para as espécies aqui estudadas, somadas as conhecidas na literatura. O padrão mais complexo foi observado nos membros das famílias Benthescymidae, Aristeidae, Solenoceridae e na tribo Penaeini, pertencente à família Penaeidae. Este padrão complexo é devido a presença de dois dutos no vaso deferente, sendo a secreção do duto espermático formando camadas ao redor da massa de espermatozoides e o duto acessório, apresentando somente secreção, também em camadas. Contudo, a principal diferença notada nos Penaeini foi a presença da glândula acessória na ampola, ausente nas demais famílias. Em Penaeini nota-se uma diferença na glândula acessória, na qual nas espécies de tético aberto a glândula possui várias câmaras glandulares, tornando a estrutura mais complexa, como em *L. schmitti*, enquanto que nas espécies de tético fechado como *F. brasiliensis*, a glândula é mais simples, sem a presença de múltiplas câmaras. As tribos Parapenaeini e Trachypenaeini apresentaram um padrão intermediário, sendo que em Parapenaeini ainda se observa o fluido seminal como massa espermática única envolta por camadas de secreção, sendo mais simples em Trachypenaeini devido ao fluido seminal sem camadas e espermatóforos esféricos. O padrão mais simplificado dentro de Penaeoidea foi observado para a família Sicyoniidae, onde os espermatozoides estão livres no fluido seminal, sem camadas ou espermatóforos circulares. Os padrões registrados estão relacionados à filogenia do grupo. Associado a isso, nossos resultados de inferência filogenética mostram que as famílias Benthescymidae, Aristeidae, Solenoceridae e Sicyoniidae são famílias monofiléticas enquanto que Penaeidae é um grupo parafilético.

Segundo Bauer (1991) há uma enorme variação na complexidade da transferência do material espermático dos camarões Dendrobranchiata. Em Aristeidae, Benthescymidae, Solenoceridae e no gênero *Litopenaeus* (Penaeidae) há produção de um espermatóforo complexo,

com diferentes materiais e secreções produzidas pelo macho. Estes componentes auxiliam na fixação do material espermático sobre corpo da fêmea, uma vez que apresentam téglico aberto (Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Nossos resultados mostraram que os membros da tribo Penaeini apresentam a produção do fluido seminal mais especializada, com o vaso deferente médio apresentando dois dutos paralelos e independentes: o espermático, contendo espermatozoides imersos em secreção e o acessório, o qual contém somente secreção em seu lúmen. Os dutos são separados por tiflossoles. Este padrão morfológico segue o que foi descrito para outros membros da tribo Penaeini, como *L. schmitti*, *L. vannamei*, *L. setiferus*, *F. brasiliensis*, *F. duorarum*, *F. aztecus*, *M. kerathurus* e *P. monodon* (Malek e Bawab, 1974; Ro et al., 1990; Bauer, 1991; Chow et al., 1991; Bauer e Cash, 1991; Fransozo et al., 2016; Feng et al., 2018). Segundo Bauer e Cash (1991), a existência dos tiflossoles subdividindo o MVD está relacionada com a formação de um espermatóforo mais complexo, o que está de acordo com nossos resultados, principalmente aqueles relacionados às espécies de téglico aberto.

A ampola terminal de *L. schmitti* observada no presente trabalho, apresenta várias câmaras na glândula acessória, como anteriormente descrita para esta espécie (Fransozo et al., 2016) e também para *L. vannamei* e *L. setiferus* (como *Penaeus vannamei* e *Penaeus setiferus* em Bauer, 1991; Chow et al., 1991). Tais câmaras glandulares produzem a secreção adesiva que permite o material espermático ser fixado ao téglico aberto da fêmea (Bauer, 1991, Bauer e Cash, 1991; Chow et al., 1991; Fransozo et al., 2016). Bauer e Cash (1991) referem-se às câmaras glandulares como glândulas adesivas formando dutos tubulares que se abrem em um ponto no duto acessório, como ocorre em *L. schmitti*. Quando comparado com *Pl. muelleri*, o epitélio da ampola terminal é espesso e a glândula acessória está ausente, o que não foi notado em outro trabalho com a mesma espécie (Díaz et al., 2002). Assim, o tipo de ampola encontrado no gênero *Litopenaeus* pode ser considerado o mais complexo funcionalmente, o que concorda com propostas anteriores da literatura científica (Alfaro-Montoya, 2010). Em *F. brasiliensis* o vaso deferente é complexo,

também com dois dutos, porém na região da ampola, a glândula acessória é mais simples, contendo somente uma câmara secretora, sem glândulas adesivas, como observado em *L. schmitti*. Este mesmo padrão foi observado em outras espécies de *Farfantepenaeus*, como *F. duorarum* e *F. aztecus* (Bauer e Cash, 1991).

O espermátforo de *L. schmitti* exposto ao meio é, sem dúvida, o mais especializado dentre as espécies de tólico aberto aqui estudadas, e deverá apresentar placa dorsal, abas, flange, asas, massas internas e materiais adesivos em sua estrutura final, como o padrão observado para *L. setiferus* e *L. vannamei* devido à semelhança histológica observada neste gênero (Bauer e Cash, 1991; Chow et al., 1991; Fransozo et al., 2016). O corpo principal do espermátforo é produzido no duto espermático, sendo a massa de espermatozoides circundada por uma espessa camada de secreção (Bauer e Cash, 1991). Nossos resultados demonstram a existência de cinco tipos de secreção que são adicionadas ao espermátforo complexo de *L. schmitti*. Bauer e Cash (1991) também encontraram cinco secreções produzidas no vaso deferente de *L. setiferus*, sendo a massa espermática circundada por material acelular, dois tipos de secreção produzidas no duto acessório e o material adesivo secretado pelas câmaras glandulares. Chow et al. (1991) também mostraram cinco tipos de secreção no espermátforo de *L. setiferus* e *L. vannamei*, porém, a descrição é focada no duto espermático contendo três tipos de secreção, constituindo o espermátforo primário, semelhante ao observado no presente trabalho.

Em *F. brasiliensis* assim como nas outras espécies de *Farfantepenaeus* o espermátforo é formado por quatro tipos de secreções e será inserido no tólico fechado da fêmea (Pérez-Farfante, 1969; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991). Em *M. kerathurus* a massa espermática circundada por duas camadas de secreção no duto espermático e três tipos de secreção no duto acessório, as quais constituem a terceira, quarta e quinta camada de secreção do espermátforo (Malek e Bawab, 1974). O espermátforo de *F. aztecus* e *F. duorarum* apresenta o corpo principal, o qual consiste na massa espermática central cercada por camadas de secreção do duto espermático e do duto

acessório, e o material anexo produzido na glândula acessória da ampola, a qual ainda tem função incerta (Bauer e Cash, 1991). Este material anexo parece ser homólogo ao material adesivo ou gelatinoso encontrado nas câmaras da glândula acessória em *Litopenaeus* spp. (Bauer e Cash, 1991). Em *M. kerathurus* este material é chamado de “asa” e, portanto, são homólogos (Malek e Bawab 1974). Entretanto, a “asa” encontrada no espermatóforo de *L. setiferus* não é homóloga ao material anexo, já que esta parece ser produzida na ampola terminal complexa, nas câmaras glandulares (Bauer e Cash 1991). Apesar do fato deste material poder atuar como parte do espermatóforo de *Farfantepenaeus*, não podemos descartar a hipótese deste material da glândula acessória também poder atuar como um material vedante e protetor da abertura do tético (Bauer, 1991) ou como “plug” espermático, assim como descrito para outras espécies de tético fechado como *R. similis* (Bauer e Min, 1993). Desta maneira, a análise histológica do material transferido ao tético fechado nestas espécies se faz necessário e, talvez seja a chave para resolver as prováveis funções da glândula acessória em Dendrobranchiata.

Feng et al. (2018) caracterizaram o sistema reprodutor masculino do Penaeini *P. monodon* e mostraram que o MVD possui dois dutos, ficando evidente que esta é a característica exclusiva da tribo. Além disso, o espermatóforo de *P. monodon* parece ser constituído de quatro tipos de secreções (Feng et al. 2018). Entretanto, estes autores utilizam seções histológicas que não tornam claro a presença ou não da glândula acessória na região da ampola terminal. Como descrito para demais espécies de Penaeini, tanto espécies de tético aberto como de tético fechado, como é o caso de *P. monodon*, a glândula acessória está presente em todas as espécies, embora apresentem diferentes complexidades. Em um corte longitudinal os autores demonstraram a organização da ampola terminal contendo somente duas câmaras, apontando para a “câmara espermatóforica” e o “corpo principal do espermatóforo”. Entretanto, ao observamos cuidadosamente a imagem, podemos observar que na câmara em que os autores chamam de “corpo principal do espermatóforo”, há uma estrutura semelhante a um duto, não identificada pelos autores. Nós

acreditamos que houve um engano na identificação das estruturas na ampola terminal, sendo que a câmara chamada de “corpo principal do espermatóforo” refere-se à extensão do ducto espermático, a estrutura semelhante a um ducto e não identificada deve ser o ducto acessório em um corte periférico, sendo a “câmara espermatofórica” na verdade a glândula acessória. Desta maneira, nós mapeamos *P. monodon* com o MVD contendo dois ductos e o espermatóforo como complexo, uma vez que os autores evidenciaram quatro tipos de secreções. Porém, não utilizamos a glândula acessória para o mapeamento, uma vez que os autores não deixam claro se há uma câmara glandular ou não.

No Solenoceridae *Pl. muelleri*, o padrão observado foi semelhante à Penaeini: o vaso deferente é dividido em dois ductos justapostos e as fêmeas possuem o tólico aberto. Entretanto, não se observou a glândula acessória típica na região da ampola terminal. O epitélio espesso da região da ampola terminal em *Pl. muelleri* produz uma grande quantidade de secreção e esta se difere das secreções produzidas no vaso deferente. Bauer (1991) apresenta a morfologia do ducto ejaculatório do Solenoceridae *S. vioscai* e assim como observado em *Pl. muelleri*, esta espécie também não apresenta a glândula acessória e o epitélio desta região é mais espesso e secretor de um novo material como ocorre em glândulas acessórias com câmara simples. Portanto, apesar de não apresentar a câmara glandular, como observado nas demais espécies, o epitélio secretor, com um tipo de secreção acidófila adicional, parece cumprir a mesma função, o que pode ser uma característica de espécies com espermatóforo depositado no corpo das fêmeas de tólico aberto. Desta maneira, a ausência da glândula acessória não compromete a complexidade do espermatóforo, uma vez que esta secreção produzida pelo epitélio da ampola terminal soma-se ao fluido dos ductos acessório e espermático. O espermatóforo de *Pl. muelleri*, por sua vez, possui características que relembram um cordão espermático envolto por várias camadas de secreção como observado em Dromiidae, Podotremata (Garcia-Bento et al., 2019). Segundo proposto por Bauer (1991), em *S. vioscai* o empacotamento dos espermatozoides nos parece ser semelhante ao observado em *Pl. muelleri* neste estudo e acreditamos que seja uma característica de Solenoceridae

apresentar espermátóforo como um cordão espermático com várias camadas de secreções periféricas.

A morfologia do sistema reprodutor de *Pl. muelleri* já havia sido descrita por Díaz et al. (2002), entretanto, a divisão do vaso deferente adotada pelos autores foi distinta, sendo: duto coletor, região proximal, região média e região distal com a ampola terminal. Com esta subdivisão, há um problema de interpretação, uma vez que se referem à região proximal contendo os dutos acessório e espermático, quando esta subdivisão é, na verdade, na porção média. Nós dividimos o vaso deferente desta espécie em PVD, MVD com dois dutos e DVD se estendendo até a região dilatada do vaso, com ausência da glândula acessória.

O sistema reprodutor masculino de *Benthescymus* sp. (Benthescymidae) e *Ari. edwardsiana* (Aristeidae) apresenta a complexidade dos dois dutos no vaso deferente, divididos pelos tiflossoles em duto espermático e acessório. Não foi encontrada nenhuma estrutura da câmara glandular na ampola terminal, semelhante ao observado em *Pl. muelleri*. O epitélio da ampola terminal de *Benthescymus* sp. parece ter função secretora, semelhante ao solenocerídeo estudado, adicionando outro tipo de secreção ao espermátóforo. Não foi possível concluir como é estruturado o espermátóforo de *Ari. edwardsiana*, porém, em *Benthescymus* sp. este parece ser um cordão espermático, como observado em *Pl. muelleri*. Nós encontramos quatro tipos de secreção no duto espermático de *Benthescymus* sp., classificando-o como complexo. Assim, acreditamos que Aristeidae também apresenta o espermátóforo complexo, já que esta é uma característica de *Benthescymus* sp., Solenoceridae, Penaeini e Parapenaeini, os quais estão próximos na filogenia. É importante ressaltar que devido ao material estar conservado em álcool, não fixado em paraformaldeído, algumas características podem estar comprometidas como a estrutura do epitélio, as secreções e como os espermatozoides são empacotados. Ainda assim, considerando que estas espécies são oriundas de águas profundas e de difícil coleta, o material proveniente de doação do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo foi essencial para concluirmos como se deu a

evolução dos caracteres aqui estudados em Penaeoidea. Além disso, este representa o primeiro trabalho com a caracterização histológica e histoquímica do sistema reprodutor masculino de representantes de Benthescymidae e Aristeidae. É importante que novos estudos com o sistema reprodutor das famílias Aristeidae e Benthescymidae sejam realizados a fim de preencher as lacunas ainda existentes acerca da morfologia do sistema reprodutor nestes grupos.

Nas espécies em que as fêmeas apresentam o tético fechado, o material espermático é depositado no receptáculo seminal ou espermateca, a qual pode ser pareada ou não pareada (Bauer, 1991; Pérez-Farfante e Kensley, 1997). O sistema reprodutor masculino e a produção do fluido seminal são mais simplificados nas espécies de tético fechado quando comparados às espécies de tético aberto (Bauer, 1991; Bauer e Min 1993). Em Trachypenaeini, Parapenaeini e Sicyoniidae, o vaso deferente apresenta somente um ducto em toda sua extensão. A glândula acessória, presente em Trachypenaeini e Parapenaeini são simplificadas, apresentando somente uma câmara produtora de um tipo de secreção, assim como *F. brasiliensis* e outros *Farfantepenaeus* spp. e *M. kerathurus* (Malek e Bawab, 1974; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991). Em Parapenaeini, *Pa. americanus* e *A. longinarius* os espermatozoides estão imersos formando um grande massa de secreção circundada por quatro tipos de secreção, sendo três produzidas no vaso deferente e a quarta proveniente da glândula acessória. Esta característica é semelhante ao observado em *F. brasiliensis* e, portanto, nós classificamos este espermatóforo como complexo.

Os Trachypenaeini, *R. constrictus* e *X. kroyeri*, apresentam pequenas massas de espermatozoides individualizadas, formando, assim, vários espermatóforos esféricos no fluido seminal, semelhantes aos de Eubrachyura. Estes espermatóforos são extremamente simplificados e é considerada uma característica derivada em Penaeidae (Bauer, 1991; Bauer e Min 1993). O mesmo padrão foi observado em outro Trachypenaeini, *R. similis* (Bauer e Min, 1993). Nesta espécie, após a ejaculação do material seminal, o macho libera a “substância do plug espermático” da glândula acessória, que tem como função impedir inseminações subsequentes (Bauer e Min,

1993). Assim, sugerimos que no caso das espécies com tético fechado de Penaeidae, a secreção da glândula acessória possa funcionar como um “plug” espermático temporário, presente nos momentos iniciais da fertilização, enquanto a fêmea está na muda, desaparecendo na intermuda.

A morfologia do sistema reprodutor dos Sicyoniidae indica o mecanismo de transferência menos especializado dentre todas as espécies estudadas, assim como proposto por Bauer (1991). Em *Sicyonia* spp. há uma leve dilatação na porção distal do ducto ejaculatório, a qual seria um sinônimo para a ampola terminal. Observa-se somente a extensão do vaso deferente mais longa e com espessa camada muscular, a qual se torna mais espessa nas regiões mais distais que auxiliará na ejaculação do material espermático. O espermátóforo é extremamente simplificado, sendo somente fluido seminal com espermatozoides livres, sem camadas de secreção circundante ou espermátóforos arredondados. Além disso, o DVD não apresenta glândula acessória, assim como descrito para *S. brevis* e *S. ingentis* (Bauer, 1991; Subramoniam, 1995). Desta maneira, Sicyoniidae não parece ter a condição de produção do “plug espermático”. Em Sicyoniidae o tético é o mais fechado e complexo de todos os Penaeoidea (Bauer, 1991; Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Além disso, em *S. dorsalis* foram observadas cópulas múltiplas em condições laboratoriais (Bauer, 1992). A ausência de “plug” pode explicar o evento de pausa no crescimento das fêmeas durante os picos reprodutivos, a fim de evitar a perda do material genético presente no tético (Castilho et al., 2008a). Sendo assim, Sicyoniidae apresenta outras estratégias reprodutivas. Neste caso, pela análise morfológica, nota-se que a simplificação do sistema reprodutor está relacionada à diversificação da estratégia reprodutiva permitindo às fêmeas copularem com diferentes machos ao longo da vida.

O tético é a região posteroventral do cefalotórax e o local de aderência e estocagem dos espermatozoides (Bauer, 1994). Neste trabalho, consideramos que o tético é o local de deposição temporária ou prolongada do espermátóforo complexo nas espécies em que a fêmea apresenta o tético aberto, assim como elucidado por Bauer (1991, 1994). Nas espécies com tético fechado, os

espermatozoides são inseridos no receptáculo seminal ou espermateca da fêmea (Bauer, 1991, 1994). Aqui tratamos o receptáculo seminal como espermateca, uma vez que apresenta origem totalmente ectodérmica, buscando manter a mesma nomenclatura observada em *Brachyura*, apesar destas estruturas não terem a mesma origem em termos dos mesmos seguimentos torácicos (Bauer, 1994; Guinot e Quenette, 2005). Este mecanismo de adição de material vedante ou plug, proveniente da glândula acessória parece ocorrer nas espécies em que as fêmeas apresentam o tético fechado, tanto com espermateca pareada dos *Trachypenaeini*, *Parapenaeini* e *Sicyoniidae*, como nas espermatecas não pareadas de *Penaeini*.

No que se refere à filogenia de *Dendrobranchiata* diversos estudos demonstraram a monofilia do grupo, assim como *Penaeoidea* e *Sergestoidea* (Ma et al., 2009; Tavares et al., 2009; Camargo et al., 2017, Cheng et al., 2018, Hurzaid et al., 2020). Dentro de *Sergestoidea*, as famílias *Sergestidae* e *Luciferidae* são monofiléticas, enquanto em *Penaeoidea*, somente *Benthesicymidae* e *Penaeidae* não representam um grupo monofilético (Tavares et al., 2009). Nossos resultados, obtidos a partir da inferência filogenética, mostraram a monofilia de *Penaeoidea*, com a formação de três clados: um clado formado pelas famílias *Aristeidae* e *Benthesicymidae*, sendo grupo irmão dos demais clados. O outro clado é composto pela tribo *Penaeini* e a família *Solenoceridae*, sendo grupo irmão do clado constituído pelas tribos *Parapenaeini* e *Trachypenaeini*, juntamente com *Sicyoniidae*. Ma et al. (2009) realizaram uma análise com base nas sequências do DNA de genes nucleares e mitocondriais (fosfoenolpiruvato carboxiquinase e subunidade alfa da Na/K ATPase) e detectaram duas linhagens dentro da superfamília *Penaeoidea*: a linhagem de camarões semelhantes à aristeídeos, englobando as famílias *Aristeidae*, *Benthesicymidae* e *Solenoceridae*, e camarões semelhantes à peneídeos, se referindo às famílias *Penaeidae* e *Sicyoniidae*. Dentro da linhagem de camarões semelhantes à peneídeos, a família *Penaeidae* é parafilética com *Sicyoniidae* (Ma et al., 2009), o que corrobora o presente trabalho, uma vez que a tribo *Trachypenaeini* forma um grupo irmão com *Sicyoniidae*. Na linhagem de camarões semelhantes à aristeídeos, a família

Solenoceridae apresenta características plesiomórficas e Aristeidae parece ser o grupo com diversificação mais recente (Ma et al., 2009). A tribo Penaeini forma um clado separado das demais tribos de Penaeidae (Ma et al., 2009) assim como demonstrado no presente trabalho.

Cheng et al. (2018) com base em análises moleculares utilizando genoma mitocondrial, observaram a monofilia de Penaeoidea. Em relação às famílias, Solenoceridae, Sicyoniidae, Aristeidae e Benthescymidae obtiveram alto suporte de monofilia, enquanto que Penaeidae foi polifilético (Cheng et al., 2018), assim como demonstrado no presente estudo. A superfamília Penaeoidea foi subdividida em três clados: o clado I formado pela tribo Penaeini, o clado II formado por Solenoceridae, Benthescymidae e Aristeidae, e o clado III formado por Sicyoniidae e as tribos Parapenaeini e Trachypenaeini. Mais recentemente, Hurzaid et al. (2020), reforçaram, por meio de análises filogenéticas utilizando sequências de genes mitocondriais e nucleares, a parafilia de Penaeidae. Os autores demonstraram que Penaeidae é parafilética com Sicyoniidae e que, possivelmente, Parapenaeini, Trachypenaeini e Sicyoniidae apresentam um ancestral em comum, sendo Trachypenaeini grupo irmão de Sicyoniidae (Hurzaid et al., 2020). Penaeini, por sua vez, se alocou em um clado separado das demais tribos. Nossos resultados mostraram que Penaeini está filogeneticamente próxima às famílias Aristeidae, Benthescymidae e Solenoceridae. Além disso, estes grupos apresentam semelhanças na morfologia do sistema reprodutor, como a presença de dois dutos na MVD. Assim como demonstrado por Cheng et al. (2018) e Hurzaid et al. (2020), no presente trabalho evidenciamos a proximidade entre Sicyoniidae e Trachypenaeini, os quais constituem um clado e apresentam semelhanças na morfologia do sistema reprodutor masculino. Sendo assim, embora tenhamos utilizados em nossas análises filogenéticas somente sequências de dois genes mitocondriais, nossos resultados corroboram o trabalho de Cheng et al. (2018) feito com o genoma mitocondrial completo, e Hurzaid et al. (2020) utilizando genes nucleares e mitocondriais, demonstrando a proximidade de Penaeini com Aristeidae, Benthescymidae e Solenoceridae, enquanto Trachypenaeini está intimamente relacionada com Sicyoniidae.

Por meio de datação fóssil, Cheng et al. (2018) observaram que o mais recente ancestral de Penaeoidea teve irradiação no final do Devoniano, cerca de 366 milhões de anos a.C. A divergência de Solenoceridae, Benthescymidae e Aristeidae do segundo clado, formado pela tribo Penaeini ocorreu no final do Carbonífero (307 milhões de anos a.C.). A família Solenoceridae teve diversificação há 166 anos a.C., enquanto Aristeidae e Benthescymidae há 122 anos a.C. e 84 anos a.C., respectivamente. Penaeini, por sua vez, teve sua diversificação no final do Jurássico (149 milhões de anos a.C.). O terceiro clado, formado por Parapenaeini, Trachypenaeini e Sicyoniidae se divergiram mais recentemente, no final do Permiano (253 milhões de anos a.C.). Desta maneira, o grupo com origem mais recente é a tribo Penaeini, enquanto Parapenaeini parece ser o grupo com características plesiomórficas dentro de Penaeidae.

Com base na reconstrução de estado ancestral de caráter, o caráter presiomórfico de Penaeoidea parece ser a presença dos dutos acessório e espermático no vaso deferente. Este padrão foi observado em *Pl. muelleri* (Solenoceridae), em *Ari. edwardsiana* (Aristeidae) e *Benthescymus* sp. (Benthescymidae) e nos representantes da tribo Penaeini, sendo a sinapomorfia dos clados formado por Aristeidae e Benthescymidae e Solenoceridae e Penaeini. O caráter compartilhado entre as tribos Parapenaeini, Trachypenaeini e pela família Sicyoniidae, é a presença do ducto simples. O mapeamento dos caracteres “glândula acessória” e “espermatóforo” mostrou que os estados desses caracteres são altamente homoplásicos e significativamente diferente entre as tribos de Penaeidae. Em Benthescymidae, Aristeidae, Solenoceridae e Sicyoniidae a ausência da glândula acessória é uma convergência evolutiva. Em relação às tribos, em Penaeini, os representantes que apresentam o tético fechado, possuem a glândula acessória simplificada, enquanto nas espécies de *Litopenaeus* spp., a presença da glândula complexa parece ser uma autapomorfia dentro de Penaeoidea. Em relação ao caráter “espermatóforo”, as tribos apresentam grande divergência. Em Benthescymidae, Solenoceridae, Penaeini e Parapenaeini, este é classificado como complexo, sendo formado por quatro ou mais tipos de secreção. Em Trachypenaeini, os espermatozoides são

empacotados em pequenos espermátóforos esféricos, sendo uma característica única do grupo. Em Sicyoniidae, os espermatozoides estão imersos num único tipo de secreção e, portanto, o espermátóforo é o mais simples dentro das espécies estudadas. O estado plesiomórfico do espermátóforo pode ser complexo, já que *Benthesicymus* sp. e *Pl. muelleri* apresentam esta característica e são grupos com diversificação anterior à Penaeidae.

Corroborando os dados morfológicos e as análises moleculares aqui obtidos, a ultraestrutura do espermatozoide de Penaeoidea revelou que as três tribos de Penaeidae mostram padrões distintos, sendo Trachypenaeini apresentando a morfologia do espermatozoide mais complexa, semelhante ao da família Sicyoniidae (Camargo et al., 2016; 2017). Nós demonstramos neste trabalho que Trachypenaeini e Sicyoniidae apresentam o sistema reprodutor masculino, a produção do fluido seminal e o mecanismo de transferência espermática mais simplificados dentro de Penaeoidea. Além disso, os órgãos genitais de Sicyoniidae são fortes e rígidos, assim como em Trachypenaeini (Ma et al., 2009). Desta maneira, diversos trabalhos demonstraram semelhanças entre a tribo Trachypenaeini e Sicyoniidae, além de serem grupos irmãos, o que invalida a monofilia de Penaeidae. As espécies de Penaeini formam um clado separado das tribos Parapenaeini e Trachypenaeini (Camargo et al., 2017). Em linha com nossos resultados, a ultraestrutura do espermatozoide de Solenoceridae, incluindo *Pl. muelleri* apresenta grande similaridade com os espermatozoides de Penaeini, tendo corpo principal arredondado, presença de espinho reto, eletrondenso e capuz acrossomal simplificado e eletrondenso, o que é distinto dos demais peneídeos e sicionídeos descritos. A sinapomorfia é a região subacrossomal simplificada, como em Penaeini, e o capuz acrossomal assimétrico (Medina et al., 2006). Estes dados corroboram o estudo morfológico aqui apresentado, no qual Solenoceridae e Penaeini constituem um clado e apresentam semelhança na morfologia do sistema reprodutor masculino.

Diversos autores propuseram a divisão do gênero *Penaeus* s.l. com base em diversos dados morfológicos, como sulcos e cristas na carapaça e a presença do téllico aberto ou fechado

(Burkenroad, 1934; Kubo, 1949; Pérez-Farfante 1969; Pérez-Farfante e Kensley; 1997). Desta maneira, subdividiu-se *Penaeus* Fabricius, 1798 em seis gêneros: *Litopenaeus* Pérez-Farfante, 1969, *Farfantepenaeus* Burukovsky, 1997, *Fenneropenaeus* Pérez-Farfante, 1969, *Marsupenaeus* Tirmizi, 1971, *Melicertus* Rafinesque, 1814 e *Penaeus sensu stricto*. Mais recentemente, Ma et al. (2011) por meio de análises moleculares, constataram a monofilia de *Penaeus* s.l. Entretanto, observou-se a formação de dois clados: *Fenneropenaeus*, *Farfantepenaeus*, *Litopenaeus* e *Penaeus* e outro clado composto por *Melicertus* e *Marsupenaeus*. Com base nesses resultados, Ma et al. (2011) propuseram a restauração do gênero *Penaeus* s.l. Estes autores afirmam que a filogenia molecular pode refletir melhor a história evolutiva do grupo, uma vez que os caracteres morfológicos utilizados para subdividir o gênero podem se tratar de convergências evolutivas. Entretanto, com base em trabalhos morfológicos recentes, destacando o sistema reprodutor masculino e a ultraestrutura do espermatozoide, incluindo o presente trabalho, nota-se que há muitas diferenças entre os subgêneros. No presente trabalho, associamos a filogenia molecular à morfologia e observamos diversas diferenças na morfologia do sistema reprodutor, na produção do fluido seminal e dos espermatóforos, além da morfologia do tético como elucidado por Pérez-Farfante e Kensley (1997) o que inviabiliza a junção dos subgêneros. Além disso, nossas análises moleculares, assim como demonstrado por Cheng et al. (2018) e Hurzaid et al. (2020) mostraram que os gêneros *Farfantepenaeus*, *Litopenaeus* e *Penaeus* formaram grupos monofiléticos com alto grau de suporte de clado e, portanto, trata-se de grupos taxonômicos válidos. Embora os camarões de tético fechado *Farfantepenaeus* spp. e *P. monodon* sejam muito similares do ponto de vista morfológico, estes apresentam a glândula acessória, e se ocorrer em *P. monodon*, estas são muito diferentes do gênero *Litopenaeus*. Desta maneira, nossos dados sugerem que os subgêneros de *Penaeus* s.l. sejam novamente elevados a gêneros.

Dada as características morfológicas das tribos de Penaeidae, tanto na morfologia do sistema reprodutor e na produção do material espermático demonstradas no presente estudo, quanto na

ultraestrutura do espermatozoide (Camargo et al., 2017) pode-se observar que existem diversas diferenças entre elas. Como proposto por Ma et al. (2009), Camargo et al. (2017), Cheng et al. (2018) e Hurzaid et al. (2020) a parafilia entre as tribos de Penaeidae justifica que esta receba o mesmo grau taxonômico de Sicyoniidae e Solenoceridae, uma vez que Penaeidae não se trata de um grupo taxonomicamente válido. Assim, neste trabalho, mostramos que as famílias estudadas de Penaeoidea, além das tribos de Penaeidae, apresentam características únicas na produção do fluido seminal, na formação de espermátóforos e morfologia do sistema reprodutor o que indica que as tribos devam ser tratadas como famílias, concordando assim com os recentes trabalhos.

Este trabalho representa a primeira caracterização do sistema reprodutor masculino a partir da anatomia, histologia e histoquímica de Penaeoidea associando à filogenia molecular onde é discutido como se deu a evolução dos caracteres morfológicos do sistema reprodutor masculino neste grupo. O estado plesiomórfico do vaso deferente em Penaeoidea parece ser a presença de dois dutos, o acessório e o espermático e o espermátóforo complexo com diversos tipos de secreção, sendo que o caráter glândula acessória simplificada (câmara única), por ser homoplásico, nos parece ser a condição plesiomórfica. Além disso, podemos prever o padrão morfológico do sistema reprodutor masculino a ser estudado para diferentes espécies em trabalhos futuros, sendo Penaeini com dois dutos, glândula acessória simples em espécies com télico fechado, e glândula acessória complexa em télico aberto. Em Solenoceridae, Benthescymidae e Aristeidae pode-se prever a ausência de glândula acessória. O vaso deferente simples e glândula acessória com uma só câmara podem ser encontrados em Trachypenaeini, Parapenaeini, sendo a glândula acessória ausente em Sicyoniidae, a qual é a família com a morfologia simples e com diversificação mais recente em Penaeoidea. Nossos dados reforçam a necessidade de alteração do grau taxonômico das tribos de Penaeidae, uma vez que não se trata de um grupo monofilético e, portanto, não é válido taxonomicamente. Considerando as características morfológicas aqui observadas em cada tribo as quais se apresentam como monofiléticas, sugerimos que estas sejam elevadas a grau taxonômico de

família sendo Penaeidae (Penaeini), Trachypenaeidae (Trachypenaeini) e Parapenaeidae (Parapenaeini).

Referências Bibliográficas

Alfaro-Montoya, J. 2010. The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): a review. *Aquac.* 300:1-9.

Bauer, R. T. 1986. Phylogenetic Trends in Sperm Transfer and Storage Complexity in Decapod Crustaceans. *J. Crustac. Biol.* 6:313-325.

Bauer, R. T. 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimps: a functional and phylogenetic perspective. *Crustacean Sexual Biol.* 183-207.

Bauer, R. T., Cash, C. E. 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 144-162.

Bauer, R. T. 1992. Repetitive copulation and variable success of insemination in the marine shrimp *Sicyonia dorsalis* (Decapoda: Penaeoidea). *J. Crustac. Biol.* 12:153-160.

Bauer, R. T., Min, L. J. 1993. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): formation in the male reproductive tract and disposition in their seminated female. *Biol. bull.* 185:174-185.

Bauer, R. T. 1994. Usage of the terms Thelycum and Spermatheca in the reproductive morphology of Decapoda, with special reference to the Penaeoidea. *J. Crustac. Biol.* 14:715-721.

Belcari, P., Viva, C., Mori, M., De Ranieri, S. 2003. Fishery and biology of *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) (Crustacea: Decapoda) in the Northern Tyrrhenian Sea (Western Mediterranean). *J. Northwest. Atl. Fish. Sci.* 31:195-204.

Burkenroad, M. D. 1934. Littoral Penaeidea chiefly from the Bingham oceanographic collection, with a revision of Penaeopsis and descriptions of two new genera and eleven new American species. Bull. Bingham Ocean. Collect. 4:1-109.

Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. 2016. Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). Zoomorphology. 135:67-81.

Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. 2017. Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. Arthropod. Struct. Dev. 46:588-600.

Castilho, A. L., Furlan, M., Costa, R. C. D., Fransozo, V. 2008a. Reproductive biology of the rock shrimp *Sicyonia dorsalis* (Decapoda: Penaeoidea) from the southeastern coast of Brazil. Invertebr. Repr. Dev. 52:59-68.

Castilho, A. L., Pie, M. R., Fransozo, A., Pinheiro, A. P., Costa, R. C. 2008b. The relationship between environmental variation and species abundance in shrimp community (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea) in south-eastern Brazil. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 88:119-123.

Castilho, A. L., Bauer, R. T., Freire, F. A. M., Fransozo, V., Costa, R. C., Grabowski, R. C., Fransozo, A. 2015. Lifespan and reproductive dynamics of the commercially important sea bob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Penaeoidea): synthesis of a 5-year study. J. Crustac. Biol. 35:30-40.

Cheng, J., Chan, T. Y., Zhang, N., Sun, S., Sha, Z. L. 2018. Mitochondrial phylogenomics reveals insights into taxonomy and evolution of Penaeoidea (Crustacea: Decapoda). Zool. Scr. 47:582-594.

Chow, S. Dougherty, M. M., Dougherty, W. J., Sandifer, P. A. 1991. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. J. Crustac. Biol. 11:201-216.

Costa, R. C. D., Fransozo, A., Melo, G. A. S., Freire, F. A. D. M. 2003. An illustrated key for Dendrobranchiata shrimps from the northern coast of São Paulo state, Brazil. *Biota Neotrop.* 3:1-12.

De Grave, S., Fransen, C. H. J. M. 2011. Carideorum catalogus: the recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procaridean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). *Zool. Med.* 85:195-589.

Díaz, A. C., Fernandez-Gimenez, A. V., Petriella, A. M., Fenucci, J. L. 2002. Morphological and functional study of the male reproductive tract in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea). *Invertebr. Reprod. Dev.* 42:69–74.

Feng, T., Paterson, B., Johnston, S. 2018. A morphological study of the male reproductive tract, post-testicular acrosome maturation and spermatophore formation in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *J. Morphol.* 279:1290-1300.

Fransozo, V., Fernandes, A. B., Lopez-Greco, L. S., Zara, F. J., Santos, D. C. 2016. Functional morphology of the male reproductive system of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) (Crustacea, Penaeoidea) compared to other *Litopenaeus*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 60:161-174.

Garcia Bento, M. A., López-Greco, L. S., Zara, F. J. 2019. Seminal fluid production and sperm packaging in dromiid crabs (Brachyura, Podotremata). *Zoology.* 132:17-30.

Glez-Peña, D., Gomez-Blanco, D., Reboiro-Jato, M., Fdez-Riverola, F., Posada, D. 2010. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids. Res.* 38:14-18.

Guindon, S., Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696-704.

Guinot, D., Quenette, G. 2005. The spermatheca in podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implication. *Zoosystema.* 27:267-342.

Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Junqueira, L. C. U., Junqueira, L. M. M. S. 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos.

King, J. E. 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *The Biol. Bull.* 94:244-262.

Kubo, I. 1949. Studies on the penaeids of Japanese and its adjacent waters. *J. Tokyo Univ. Fish.* 36:178-192.

López-Greco, L. S., López, G. C., Rodríguez, E. M. 1999. Morphology of spermathecae in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Grapsidae, Sesarminae). *J. Zool.* 249:469-493.

Ma, K. Y., Chan, T. Y., Chu, K. H. 2009. Phylogeny of penaeoid shrimps (Decapoda: Penaeoidea) inferred from nuclear protein-coding genes. *Mol. Phylogenetics Evol.* 53:45-55.

Ma, K. Y., Chan, T. Y., Chu, K. H. 2011. Refuting the six-genus classification of *Penaeus* s.l. (Dendrobranchiata, Penaeidae): a combined analysis of mitochondrial and nuclear genes. *Zool. Scr.* 40:498-508.

Maddison, W. P., Maddison, D. R. 2015. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. Retrieved from: <http://mesquiteproject.org>

Malek, S. R. A., Bawab, F. M. 1974. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775) (Decapoda, Penaeidae): The initial formation of a sperm mass. *Crustaceana.* 26:273-285.

Medina, A., Scelzo, M. A., Tudge, C. C. 2006. Spermatozoal ultrastructure in three Atlantic solenocerid shrimps (Decapoda, Dendrobranchiata). *J. Morphol.* 267:300-307.

Mello, M. L. S., Vidal, B. C. 1980. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo, Brasil.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 1-8.

Paramasivam, P., Chakraborty, R. D., Gidda, M., Ganesan, K., Ponnathara-Kandankoran, B., Laxmanan, S., Nadakkal, R. 2018. Reproduction in the deep-sea penaeoid shrimp *Aristeus alcocki* Ramadan, 1938 (Decapoda: Penaeoidea: Aristeidae) from southwestern India. J. Crustac. Biol. 38:354-366.

Pérez-Farfante, I. 1969. Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. Fish. Bull. 67:461-590.

Pérez-Farfante, I. 1975. Spermatophores and thelyca of the American white shrimps, genus *Penaeus*. Fish. Bull. 73:463-486.

Pérez-Farfante, I., Kensley, B. 1997. Penaeoid and Sergestoid shrimp and prawns of the world: keys and diagnosis for the families and genera. Mém. Mus. natl. hist. nat. 175:1-233.

Rambaut, A., Drummond, A. J. 2009. FigTree version 1.3. 1. Website <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, last accessed October, 21, 2018.

Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J., Lawrence, A. L. 1990. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1–3. J. Fish. Biol. 10:455-468.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 19:1572-1574.

Severino-Rodrigues, E., Guerra, D. S. F., da Graça-Lopes, R. 2002. Carcinofauna acompanhante da pesca dirigida ao camarão-sete. Bol. Inst. Pesca. 28:33-48.

Subramoniam, T. 1995. Light and electron microscopic studies on the seminal secretions and the vas deferens of the penaeiodean shrimp, *Sicyonia ingentis*. J. Biosci. 20:691-706.

Tavares, C., Serejo, C., Martin, J. 2009. A preliminary phylogenetic analysis of the Dendrobranchiata based on morphological characters. - In: J. W. Martin, K. A. Crandall & D. L. Felder (eds.), Decapod crustacean Phylogenetics. Crust. Issues. 18:255-273.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Res.* 22:4673-4680.

Vereshchaka, A. L., Lunina, A. A., Olesen, J. 2017. The genus *Gennadas* (Benthesicymidae: Decapoda) morphology of copulatory characters, phylogeny and coevolution of genital structures. *Royal Soc. Open Sci.* 4:17 1288.

TABELAS

Tabela 1. Número de acesso do GenBank das sequências concatenadas dos genes 16S rDNA e COI utilizadas neste estudo.

Espécies	Família/Tribo	COI	16S
<i>Rimapenaeus constrictus</i>	Trachypenaeini	KF783863.1	KT959496.1
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>		KX196599.1	AF192093.1
<i>Parapenaeopsis cornuta</i>		KP072694.1	KP059284
<i>Parapenaeopsis stylifera</i>		KF613003.1	HF674732.1
<i>Artemesia longinaris</i>	Parapenaeini	KF572115.1	MF490228.1
<i>Parapenaeus sextuberculatus</i>		KP072693.1	KP059283.1
<i>Parapenaeus fissuroides</i>		KR738732.1	KR738736.1
<i>Parapenaeus americanus</i>		KP072655.1	KP059267.1
<i>Farfantepenaeus duorarum</i>	Penaeini	MH087613.1	AF279812.1
<i>Farfantepenaeus aztecus</i>		KU906027.1	AF192051.1
<i>Litopenaeus setiferus</i>		MH087517.1	AF279819
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>		KF989421.1	AF192053.1
<i>Melicertus kerathurus</i>		JQ623953.1	AF279826
<i>Litopenaeus schmitti</i>		KX196596.1	AF192086.1
<i>Litopenaeus vannamei</i>		AY781297.1	AF192089.1
<i>Penaeus monodon</i>		MF563565.1	MF563557.1
<i>Sicyonia dorsalis</i>	Sicyoniidae	KX196550.1	AY601740.1
<i>Sicyonia typica</i>		KX196577.1	KX196537.1
<i>Sicyonia burkenroadi</i>		KX196545.1	AY601741
<i>Sicyonia carinata</i>		KX196547.1	KX196475
<i>Sicyonia picta</i>		KX196575.1	KT935432.1
<i>Sicyonia mixta</i>		KX196568.1	KT935438.1
<i>Sicyonia martini</i>		KX196566.1	KT935441.1
<i>Pleoticus muelleri</i>	Solenoceridae	KY233184.1	LC121754.1
<i>Hymenopenaeus equalis</i>		KX530789.1	KX530793
<i>Solenocera koelbeli</i>		KU877967.1	KU877984
<i>Solenocera membranacea</i>		JQ305939.1	FR849633.1
<i>Aristaeopsis edwardsiana</i>	Aristeidae	-	AY601734.1
<i>Aristaeomorpha foliacea</i>		JQ305888.1	LC466633.1
<i>Aristeus virilis</i>		MF468107.1	JF899802.1
<i>Gennadas bouvieri</i>	Benthesicymidae	MH572680.1	-
<i>Gennadas valens</i>		MH572544.1	MH543000.1
<i>Bentheogennema intermedia</i>		MH572671.1	-
Outgroup			
<i>Acetes americanus</i>	Sergestidae	KX196595.1	KX196538
<i>Acetes petrunkevitchi</i>		KX196598.1	KX196540
<i>Sergia lucens</i>		AB826490.1	AB705159.1
<i>Deosergestes corniculum</i>		MF197258.1	MF197226.1

Tabela 2. Matriz de estados dos caracteres morfológicos “vaso deferente”, sendo simples (1) e complexo (2), “glândula acessória da ampola”, sendo ausente (0), simples (1) e complexa (2) e “espermatóforo”, sendo simples (1), unidades esféricas (2) e complexo (3). O (*) refere-se à espécie inclusa no mapeamento dos caracteres, mas a mesma não consta na filogenia molecular.

Espécies	Família/Tribo	Vaso deferente	Glândula acessória	Espermatóforo
<i>Rimapenaeus constrictus</i>	Trachypenaeini	1	1	2
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>		1	1	2
<i>Parapenaeopsis cornuta</i>		?	?	?
<i>Parapenaeopsis stylifera</i>		?	?	?
<i>Artemesia longinaris</i>	Parapenaeini	1	1	3
<i>Parapenaeus sextuberculatus</i>		?	?	?
<i>Parapenaeus fissuroides</i>		?	?	?
<i>Parapenaeus americanus</i>		1	1	3
<i>Farfantepenaeus duorarum</i>	Penaeini	2	1	3
<i>Farfantepenaeus aztecus</i>		2	1	3
<i>Litopenaeus setiferus</i>		2	2	3
<i>Penaeus monodon</i>		2	?	3
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>		2	1	3
<i>Melicertus kerathurus</i>		2	?	3
<i>Litopenaeus schmitti</i>		2	2	3
<i>Litopenaeus vannamei</i>		2	2	3
<i>Sicyonia dorsalis</i>	Sicyoniidae	1	0	1
<i>Sicyonia typica</i>		1	0	1
<i>Sicyonia burkenroadi</i>		?	?	?
<i>Sicyonia carinata</i>		?	?	?
<i>Sicyonia picta</i>		?	?	?
<i>Sicyonia mixta</i>		?	?	?
<i>Sicyonia martini</i>		?	?	?
<i>Pleoticus muelleri</i>	Solenoceridae	2	0	3
<i>Hymenopenaeus equalis</i>		?	?	?
<i>Solenocera koelbeli</i>		?	?	?
<i>Solenocera crassicornis</i>		?	?	?
<i>Solenocera membranacea</i>		?	?	?
<i>Aristaeopsis edwardsiana</i>	Aristeidae	2	0	?
<i>Aristaeomorpha foliacea</i>		?	?	?
<i>Aristeus virilis</i>		?	?	?
<i>Gennadas bouvieri</i>	Benthesicymidae	?	?	?
<i>Gennadas valens</i>		?	?	?
<i>Benthesicymus</i> sp. *		2	0	3

FIGURAS E LEGENDAS

Figura 1. Sistema reprodutor masculino de *Pleoticus muelleri* (Solenoceridae). **A.** Anatomia do sistema reprodutor masculino, o qual é constituído por um par de testículos e vasos deferentes. **B.** Vista geral do PVD, evidenciando o único ducto contendo secreção e o epitélio estratificado, HE. **C.** MVD subdividida em dois ductos independentes separados pelo tiflossole (cabeça de seta): espermático e acessório. Notam-se o cordão espermático imerso em secreção basófila (s1) e esta circundada por uma secreção homogênea acidófila (s2) (seta preta), HE. **D.** Detalhe do ducto espermático mostrando a secreção granular (s1) (cabeça de seta) e o epitélio estratificado, HE. **E.** Detalhe do ducto acessório contendo secreção acidófila. Nota-se o epitélio estratificado e o tiflossole, HE. **F.** Caráter proteico da secreção dos ductos espermático (cabeça de seta) e acessório (seta preta), Xylidine Ponceau. **G.** Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros da secreção do ducto espermático (cabeça de seta) e fortemente positiva para a secreção do ducto acessório (seta preta), PAS. **H.** Ampola terminal formada pela extensão dos ductos acessório e espermático, HE. **I.** Detalhe do epitélio estratificado da ampola terminal. Nota-se a secreção granular basófila s1 (seta preta), a secreção granular acidófila s2 (seta branca) e a secreção acidófila s3 produzida pelo epitélio secretor (cabeça de seta). **J.** Reação positiva para proteínas das secreções do ducto acessório (seta branca) e espermático (seta preta) na região da ampola terminal, Xylidine Ponceau. **K.** Técnica de PAS evidenciando reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros da secreção granular no ducto espermático (cabeça de seta) e fortemente positiva para a secreção produzida pelo epitélio da ampola terminal (seta preta).

ad= ducto acessório; at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; mc= musculatura; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; s= secreção; sd= ducto espermático; sp= espermatóforo; s1= secreção do tipo I; s2= secreção do tipo II; s3= secreção do tipo III; t= testículo; tp= tiflossole.

Fig. 1

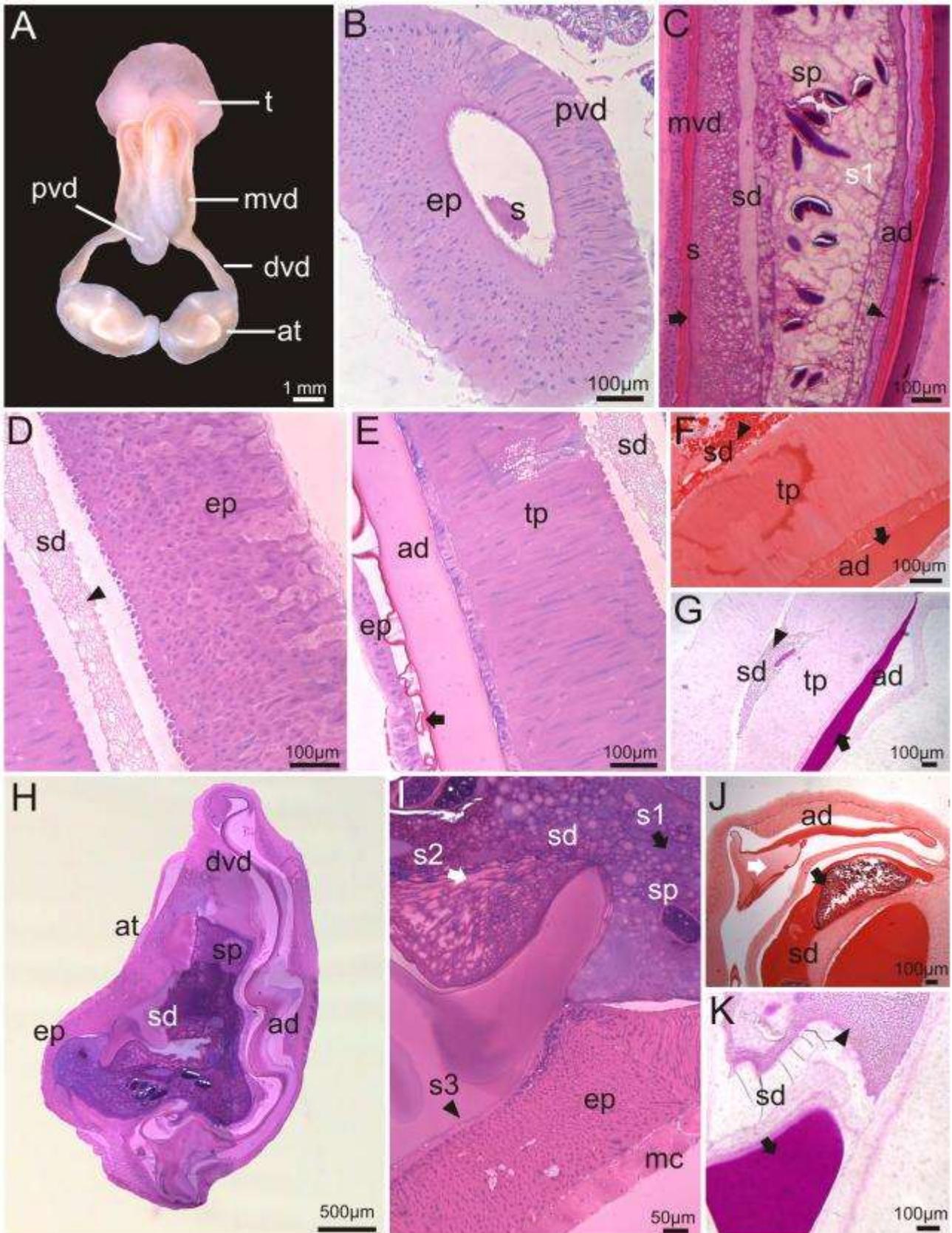


Figura 2. Sistema reprodutor masculino de Penaeidae (tribo Penaeini). A. Anatomia do sistema reprodutor masculino de *Farfantepenaeus brasiliensis* constituído por um par de testículos e um par de vasos deferentes. B. PVD de *F. brasiliensis* possui um ducto contendo espermatozoides livres imersos em secreção, HE. C. Reação fracamente positiva para proteínas na secreção do PVD de *F. brasiliensis* (cabeça de seta). Os espermatozoides foram corados pelo Xylidine Ponceau (seta preta). D. Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros no PVD pela técnica de PAS (cabeça de seta). E. MVD de *F. brasiliensis* apresentando dois ductos justapostos: espermático e acessório. No ducto espermático contém espermatozoides livres (cabeça de seta) e no ducto acessório contém apenas secreção acidófila (seta preta). O epitélio do MVD é estratificado, HE. F. Reação positiva para proteínas na secreção do ducto acessório (seta preta) e do ducto espermático (cabeça de seta) sob a técnica de Xylidine Ponceau. G. Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros no MVD de *F. brasiliensis* (seta preta), PAS. H. Espermatozoides imaturos de *F. brasiliensis* na região do MVD. I. MVD de *Litopenaeus schmitti* mostrando os dois ductos justapostos: acessório e espermático. No ducto espermático nota-se a secreção acidófila do tipo I (seta branca) e espermatozoides livres (cabeça de seta). No ducto acessório há apenas secreção fortemente acidófila (seta preta). Observa-se a presença do tiflossole que divide os dois ductos, HE. J. Ambas as secreções dos ductos acessório (seta preta) e espermático (cabeça de seta) apresentam o caráter proteico, Xylidine ponceau. K. Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros no ducto acessório (seta preta) e espermático (cabeça de seta) de *L. schmitti*, PAS. L. Espermatozoides de *L. schmitti* com o espinho formado (seta preta) na região do MVD, HE.

ad= ducto acessório; at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; s=secreção; sd= ducto espermático; sz= espermatozoide; t= testículo; tp = tiflossole.

Fig. 2

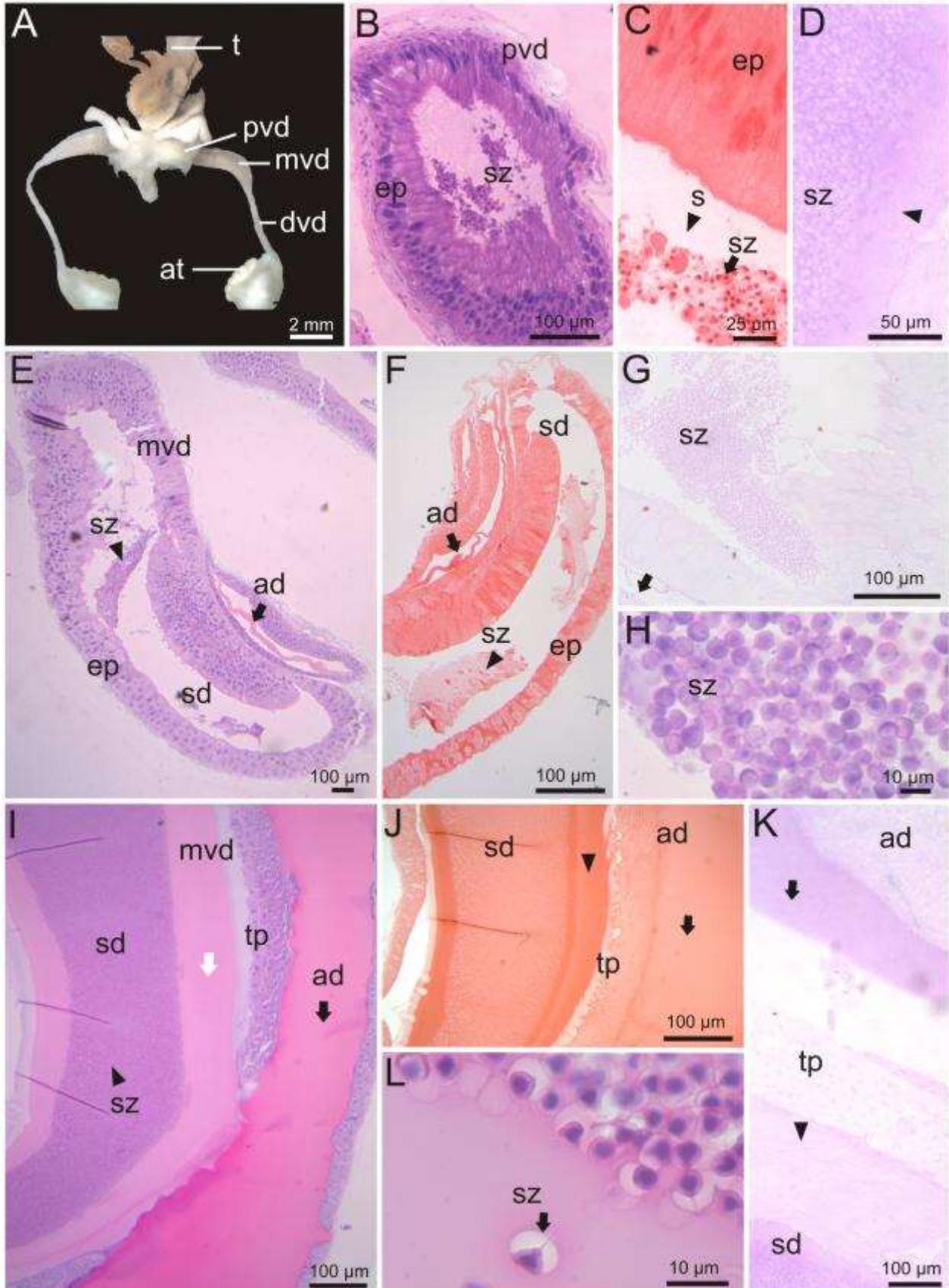


Figura 3. DVD e ampolas terminais de Penaeidae (tribo Penaeini). **A.** Vista geral do DVD e ampola terminal de *Farfantepenaeus brasiliensis*. Notam-se os dutos espermático e acessório parcialmente separados no DVD. A ampola possui apenas uma câmara. **B.** Detalhe do duto espermático com o espermatóforo de *F. brasiliensis*. Notam-se os espermatozoides imersos na secreção fortemente basófila s1 e circundada por secreção acidófila s2 (seta preta), HE. **C.** Reação fracamente positiva para proteínas da secreção basófila (seta preta) e fortemente positiva da secreção acidófila (cabeça de seta), Xylidine Ponceau. **D.** Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros no DVD de *F. brasiliensis* (cabeça de seta), PAS. **E.** Detalhe da glândula acessória de *F. brasiliensis*. Nota-se a secreção acidófila produzida na única câmara circundada por tecido muscular. **F.** Secreção da glândula acessória de *F. brasiliensis* apresenta caráter proteico, Xylidine Ponceau. **G.** Reação negativa para polissacarídeos neutros na glândula de *F. brasiliensis*, PAS. **H.** Vista geral do DVD e ampola terminal de *Litopenaeus schmitti*. Nota-se a complexidade desta porção do vaso. O DVD é formado pelos dutos espermático e acessório contendo secreção fracamente acidófila na qual os espermatozoides estão imersos (cabeça de seta) e a secreção fortemente acidófila mais externamente (setas pretas). Os dutos estão parcialmente separados pelos tiflossoles I e II. O epitélio do DVD é estratificado e envolto por uma camada de musculatura. A ampola terminal é composta por várias glândulas. **I.** Detalhe das câmaras glandulares de *L. schmitti*. **J.** Reação fortemente positiva para proteínas na secreção das glândulas de *L. schmitti*, Xylidine Ponceau. **K.** Espermatóforo de *L. schmitti*. Notam-se espermatozoides imersos em secreção acidófila (s1), circundada por uma camada delgada de secreção basófila (seta preta) e a terceira camada de secreção, fortemente acidófila (s3), HE. **L.** Técnica de Xylidine Ponceau no DVD evidenciando a reação positiva da s1, fortemente positiva para proteínas da s2 (cabeça de seta) e fracamente positiva para a s3 (seta preta). **M.** Técnica de PAS no DVD evidenciando a reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros da s1 enquanto que a s2 (cabeça de seta) e a s3 (seta preta) foram fracamente positivas.

ad= duto acessório; at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; gl= glândula; mc= musculatura; s= secreção; sd= duto espermático; sp= espermatóforo; sz= espermatozoide; s1= secreção do tipo I; s2= secreção do tipo II; s3= secreção do tipo III; tp I= tiflossole I; tp II= tiflossole II.

Fig. 3

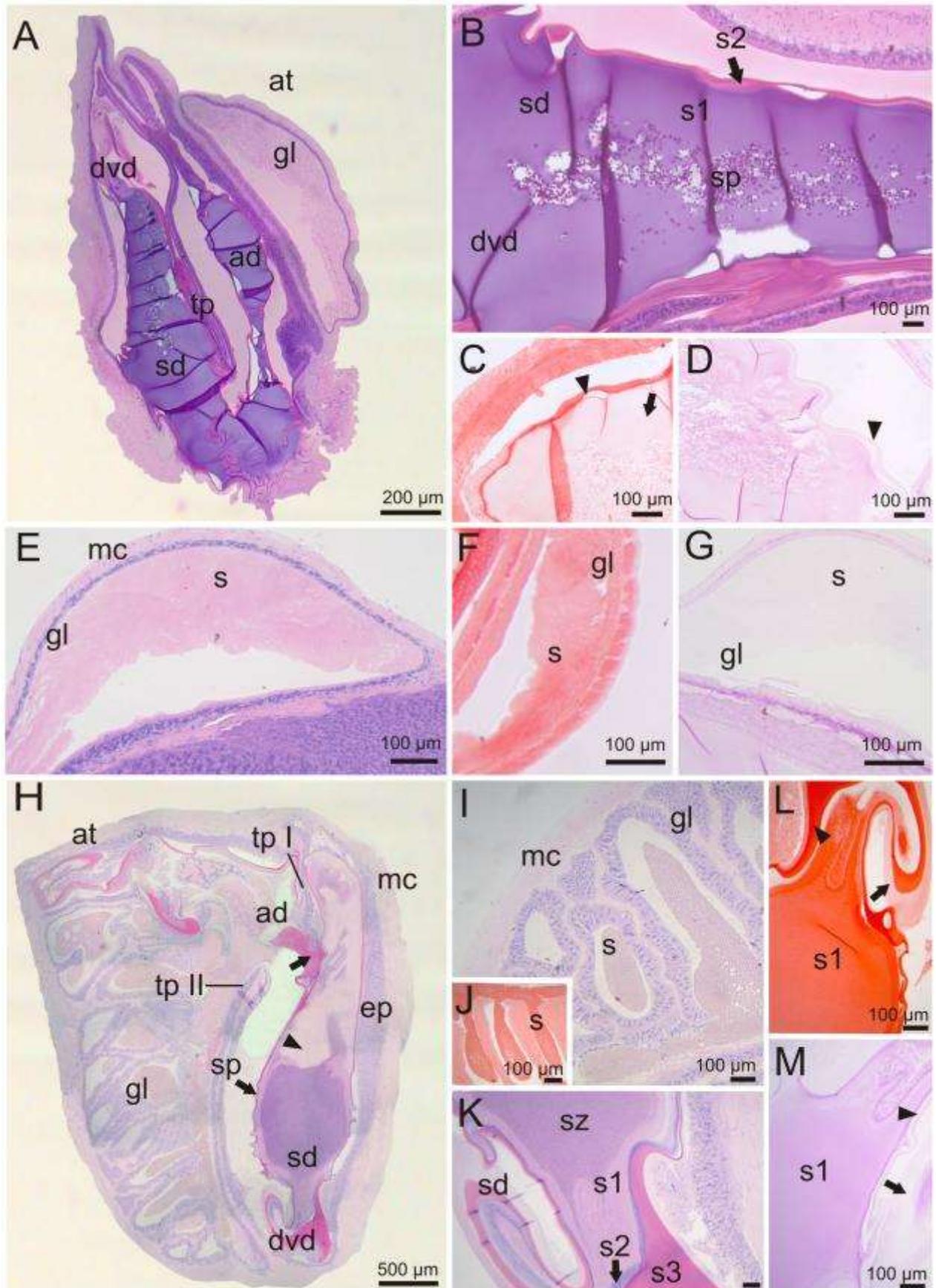


Figura 4. Sistema reprodutor masculino de Penaeidae (tribo Parapenaeni). **A.** Anatomia do sistema reprodutor de *Parapenaeus americanus* formado por um par de testículos e vasos deferentes. **B.** Vista geral do PVD de *Pa. americanus*. Notam-se os espermatozoides livres e imersos em secreção acidófila e homogênea (seta preta), HE. **C.** Detalhe do PVD de *Pa. americanus* com epitélio pseudoestratificado e espermatozoides livres imersos em secreção acidófila homogênea (seta preta) produzida pelo epitélio (cabeça de seta), HE. **D.** Reação positiva para proteínas da secreção homogênea, Xylidine Ponceau. **E.** Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros no PVD de *Pa. americanus*, PAS. **F.** MVD de *Pa. americanus* com um grande volume de espermatozoides imersos em secreção do tipo I (s1). Nota-se uma secreção acidófila ao redor da massa espermática (s2) (seta preta), HE. **G.** Detalhe do MVD de *Pa. americanus*. Observa-se uma camada de musculatura e a secreção acidófila que circunda a massa espermática imersa na s1 homogênea basófila (seta preta). **H.** MVD de *Pa. americanus* evidenciando a reação fortemente positiva para proteínas das secreções S1 (cabeça de seta) e S2 (seta preta), Xylidine Ponceau. **I.** Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros da S2 (seta preta) e positiva para a S1 (cabeça de seta) no MVD de *Pa. americanus*, PAS. **J.** DVD e ampola terminal de *Pa. americanus*. Observa-se o grande volume de espermatozoides no DVD e a camada de tecido muscular (seta preta). **K.** DVD de *Pa. americanus* com epitélio pavimentoso e camada muscular. Nota-se espermatozoides livres e imersos em secreção basófila (s1) (seta preta), externamente nota-se a s2 acidófila (seta branca), circundada pela s3 basófila, HE. **L.** Detalhe da glândula acessória de *Pa. americanus* caracterizada pelo epitélio estratificado e secreção homogênea basófila. Ao redor do epitélio, nota-se uma camada de tecido muscular. **M.** Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros do DVD e glândula acessória de *Pa. americanus* (seta preta), PAS. **N.** Reação positiva para proteínas da secreção da glândula (seta preta) e do DVD de *Pa. americanus*. **O.** Ampola terminal de *Artemesia longinaris*. **P.** Detalhe do DVD de *A. longinaris* com epitélio estratificado circundado por tecido muscular. Os espermatozoides estão livres e imersos em secreção acidófila s1, nota-se a s2 fortemente acidófila (seta preta) e a s3 acidófila e granular, HE. **Q.** Detalhe da glândula acessória de *A. longinaris*, a qual possui epitélio estratificado e camada muscular ao redor. Nota-se a secreção acidófila no lúmen. **R.** DVD e glândula acessória de *A. longinaris* mostrando reação positiva para proteínas, Xylidine Ponceau. **S.** Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros da secreção da glândula acessória de *A. longinaris*, PAS.

at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; gl= glândula; mc= musculatura; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; s= secreção; sz= espermatozoide; s1= secreção do tipo I; s2= secreção do tipo II; s3= secreção do tipo III; t= testículo.

Fig. 4

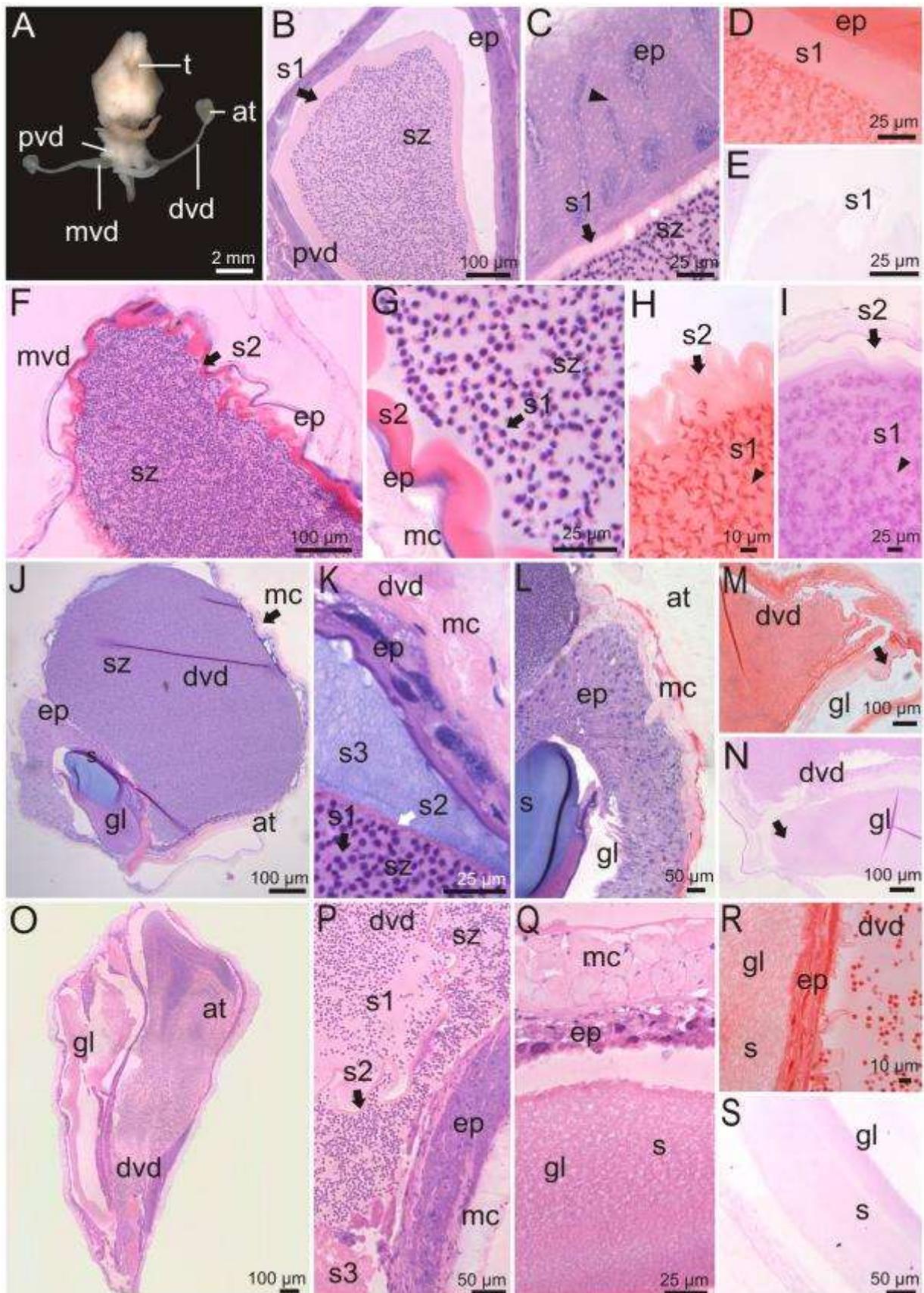


Figura 5. Sistema reprodutor masculino de Penaeidae (tribo Trachypenaeini). **A.** Sistema reprodutor masculino de *Xiphopenaeus kroyeri* constituído por um par de testículos e vasos deferentes. **B.** PVDa em *Rimapenaeus constrictus* com espermatozoides livres imersos na secreção basófila I (s1) (cabeça de seta), HE. **C.** PVDa de *R. constrictus* com s1 fracamente positiva para proteínas (seta preta). **D.** PVDa de *X. kroyeri*, HE. Notam-se os espermatozoides livres e imersos em secreção homogênea tipo I (seta preta), envoltos por secreção acidófila tipo II (cabeça de seta). **E.** PVDa ao Xylidine Ponceau com reação fracamente positiva para proteínas da secreção I (cabeça de seta) e fortemente positiva na secreção II (s2) (seta preta). **F.** PVDp de *X. kroyeri* com espermatozoides empacotados nos espermatóforos e esses imersos em secreção. Nota-se a secreção granular (seta preta) e o epitélio pavimentoso. **G.** Caráter proteico da secreção do PVDp (seta preta), Xylidine Ponceau. **H.** Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros da secreção do PVDp (seta preta), PAS. **I.** MVD de *X. kroyeri* com espermatóforos formados e imersos em secreção basófila e epitélio pavimentoso, HE. **J.** MVD de *X. kroyeri* com forte reação para proteínas (seta preta), Xylidine ponceau. **K.** Detalhe do MVD de *X. kroyeri* evidenciando a reação positiva para polissacarídeos neutros no espermatóforo e secreção ao redor, PAS. **L.** Ampola terminal de *X. kroyeri*. No DVD, notam-se os espermatóforos esféricos. A glândula acessória apresenta uma única câmara contendo secreção acidófila. **M.** Espermatóforos esféricos no DVD de *X. kroyeri*. **N.** Detalhe do epitélio pavimentoso e da musculatura no DVD de *X. kroyeri*. **O.** Forte reação para proteínas da secreção da glândula acessória de *X. kroyeri*, Xylidine Ponceau. **P.** Fraca reação para polissacarídeos neutros da secreção da glândula acessória, PAS. **Q.** Ampola terminal de *R. constrictus*. Nota-se o epitélio estratificado da glândula acessória e o DVD simples com espermatóforos (seta preta) imersos em grande volume de secreção. **R.** Detalhe do DVD de *R. constrictus*, na qual observam-se a secreção do tipo I (s1) e secreção do tipo II (s2) fracamente positivas para polissacarídeos neutros, PAS. **S.** Reação fortemente positiva para proteínas na glândula acessória em *R. constrictus*. **T.** Secreção da glândula acessória apresenta reação negativa para polissacarídeos neutros em *R. constrictus*, PAS.

at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; gl=glândula; mc= musculatura; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; PVDa= porção anterior do vaso deferente proximal; PVDp= porção posterior do vaso deferente proximal; s= secreção; sp= espermatóforo; sz= espermatozoide; t= testículo.

Fig. 5

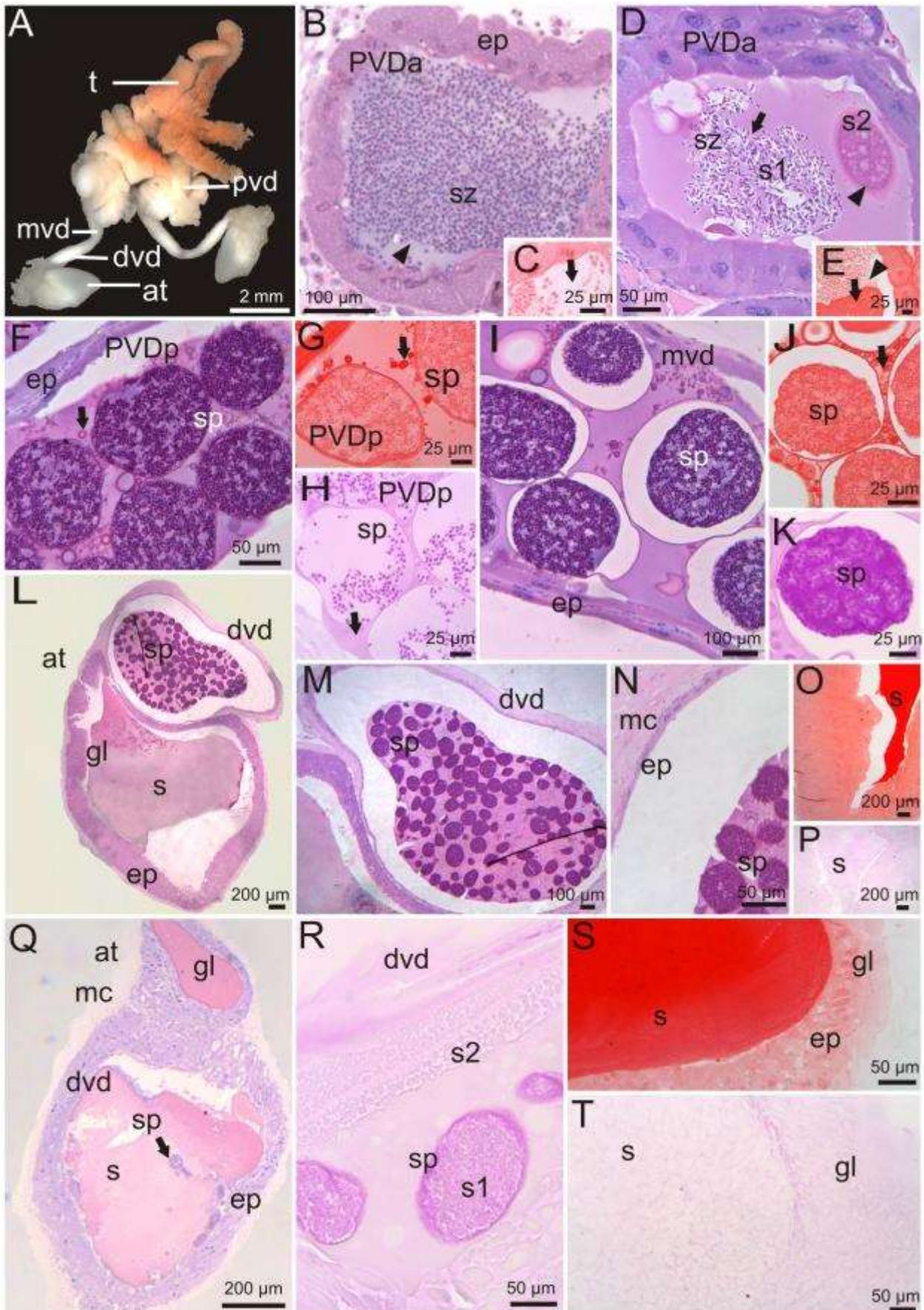


Figura 6. Sistema reprodutor masculino de Sicyoniidae. **A.** Anatomia do sistema reprodutor masculino de Sicyoniidae, o qual é constituído por um par de testículos e vasos deferentes. **B.** Vista geral do sistema reprodutor masculino de *Sicyonia dorsalis*. Observa-se o lóbulo testicular, o PVD e o MVD, HE. **C.** PVD de *S. dorsalis* com epitélio simples e cúbico. Notam-se dois tipos de secreção: homogênea e basófila (cabeça de seta) e granular e acidófila (seta branca). Os espermatozoides são encontrados livres e imersos nas secreções, HE. **D.** Secreções do PVD de *S. dorsalis*, sendo a S2 positiva para proteínas (cabeça de seta). **E.** MVD de *S. dorsalis* evidenciando o aumento do diâmetro do lúmen, HE. **F.** MVD de *S. dorsalis* com epitélio simples pavimentoso e as secreções S1 e S2 (seta preta), HE. **G.** Reação positiva para proteínas da S2 (cabeça de seta), Xylidine Ponceau. **H.** Reação negativa para polissacarídeos ácidos, Azul de Alcian. **I.** Detalhe do DVD de *S. dorsalis*, com epitélio simples pavimentoso e tecido muscular. Os espermatozoides estão livres e imersos em dois tipos de secreção: homogênea (seta preta) e granular (cabeça de seta), HE. **J.** Detalhe do epitélio do DVD de *Sicyonia typica* com espermatozoides livres (seta preta) e imersos em secreção granular acidófila (cabeça de seta). Notam-se as espessas fibras musculares. **K.** Secreção granular (cabeça de seta) positiva para proteínas ao Xylidine ponceau. **L.** Reação negativa para polissacarídeos neutros nas secreções do DVD de *S. dorsalis*, PAS. **M.** DVD e ampola terminal de *S. typica*, com espessa camada muscular, sem glândula acessória, HE. **N.** Detalhe do DVD de *S. dorsalis*. Nota-se o vaso deferente em contato com a placa ectodérmica do coxopodito do quinto pereiópodo, onde se abre o gonóporo. **O.** Corte transversal da ampola terminal com os espermatozoides livres. Notam-se as camadas de musculatura, HE. **P.** DVD antes da ampola terminal mostrando musculatura menos espessa e secreção pouco basófila ao azul de toluidina.

at= ampola terminal; c= cutícula; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; mc= musculatura; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; sz= espermatozoide; s1= secreção do tipo I; s2= secreção do tipo II; t= testículo.

Fig. 6

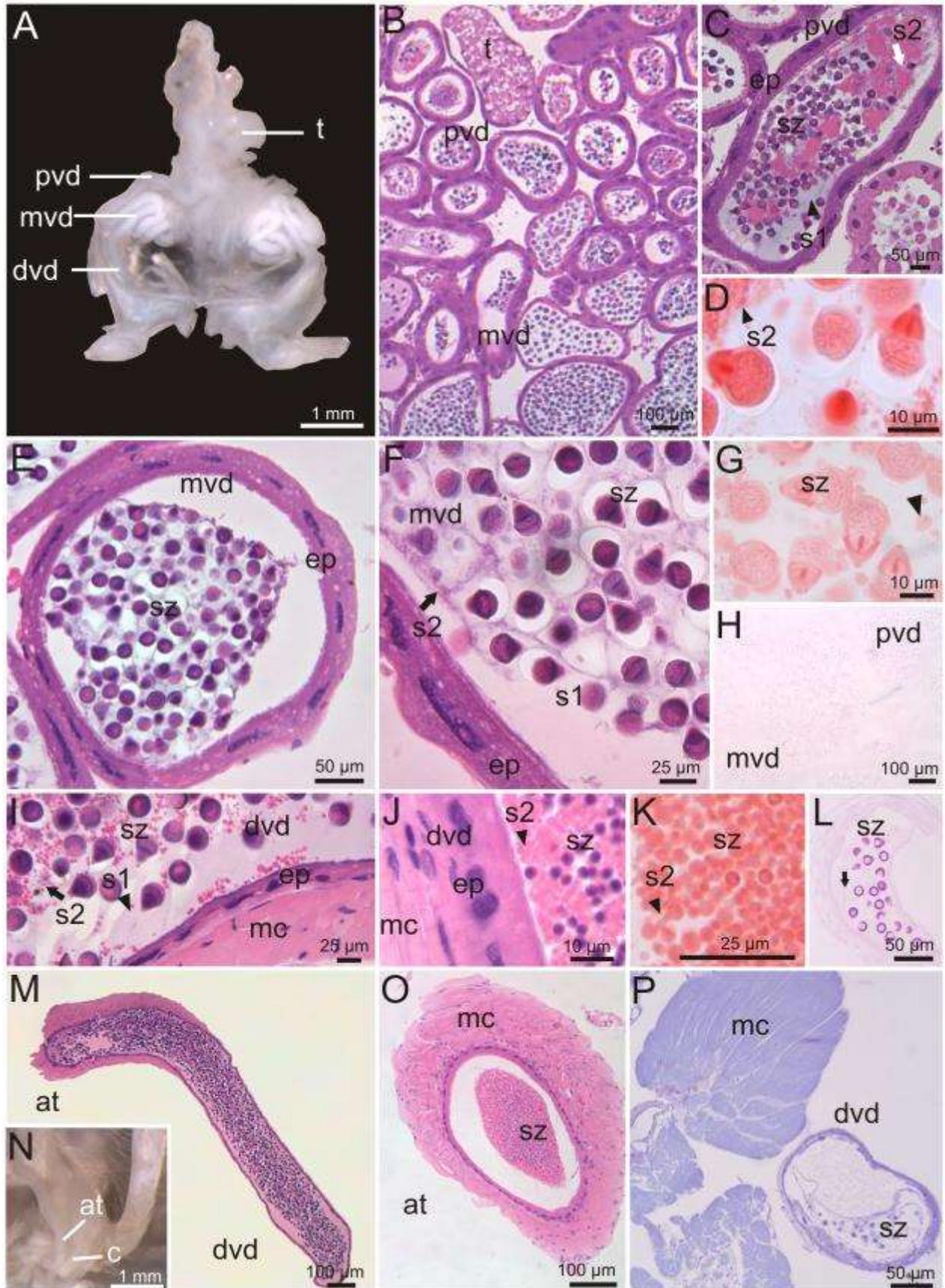


Figura 7. Sistema reprodutor masculino de Aristeidae. **A.** Anatomia do sistema reprodutor masculino de *Aristaeopsis edwardsiana* formado por testículo, vaso deferente e ampola terminal. **B.** Provável PVD de *Ari. edwardsiana* apresentando somente um duto, HE. **C.** MVD apresentando o tiflossole (seta preta) subdividindo em duto acessório e espermático, HE. **D.** Ampola terminal de *Ari. edwardsiana* a qual não apresenta uma estrutura semelhante à câmara glandular, HE. **E.** Detalhe da ampola terminal observando a extensão dos tiflossoles (cabeça de seta), HE. **F.** Reação positiva para proteínas na região da ampola terminal (cabeça de seta) ao Xylidine Ponceau. **G.** Reação negativa para polissacarídeos neutros na ampola terminal (cabeça de seta), PAS.

at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; mc= musculatura; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; t= testículo; tp= tiflossole.

Fig.7

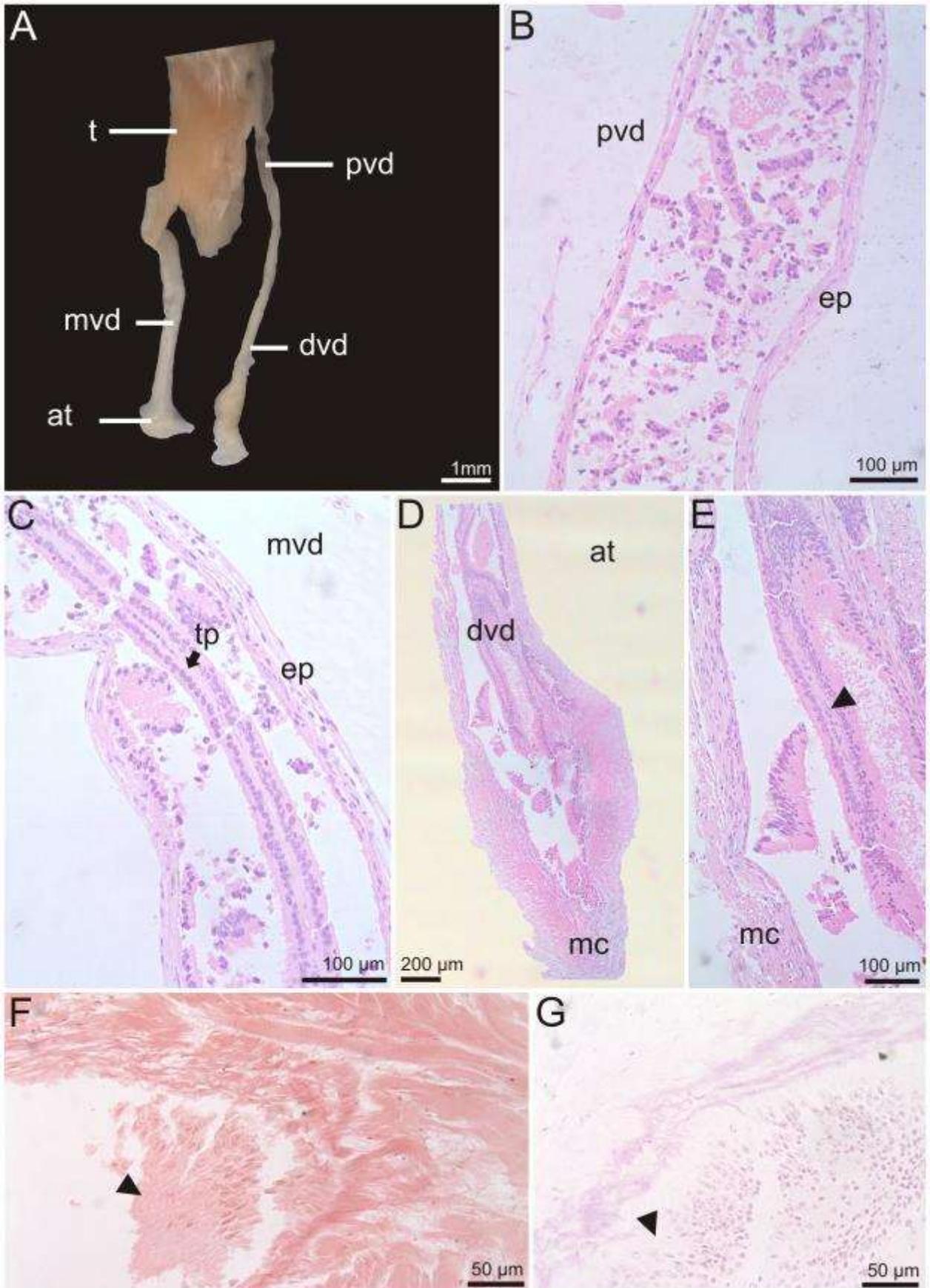


Figura 8. Sistema reprodutor masculino de Benthescymidae. **A.** Anatomia do sistema reprodutor masculino de *Benthescymus* sp., composto por um par de testículos e vaso deferente. **B.** Vista geral da PVD e MVD, HE. **C.** Provável PVD de *Benthescymus* sp. apresentando somente um duto, HE. **D.** Detalhe da PVD no qual é possível observar os espermatozoides empacotados em estruturas esféricas (cabeça de seta). **E.** MVD dividida em dois dutos pelo tiflossole (seta preta). No duto espermático nota-se o mesmo padrão de empacotamento dos espermatozoides observado na PVD (cabeça de seta preta) e no duto acessório observa-se secreções (cabeças de seta brancas), HE. **F.** Vista geral da ampola terminal de *Benthescymus* sp. com as extensões dos dutos acessório e espermático, HE. **G.** Detalhe do duto espermático de *Benthescymus* sp., no qual podemos observar quatro camadas de secreção que formarão o cordão espermático. Nota-se a secreção que parece ser produzida pelo epitélio da ampola terminal (cabeça de seta), HE. **H.** Reação positiva para proteínas das secreções encontradas na ampola terminal ao Xylidine Ponceau (cabeça de seta). **I.** As secreções I e III foram positivas para polissacarídeos neutros, enquanto a s2 foi negativa e a s4 fracamente positiva pela técnica de PAS.

ad= duto acessório; at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; sd= duto espermático; s1= secreção do tipo I; s2= secreção do tipo II; s3= secreção do tipo III; s4= secreção do tipo IV; t= testículo.

Fig. 8

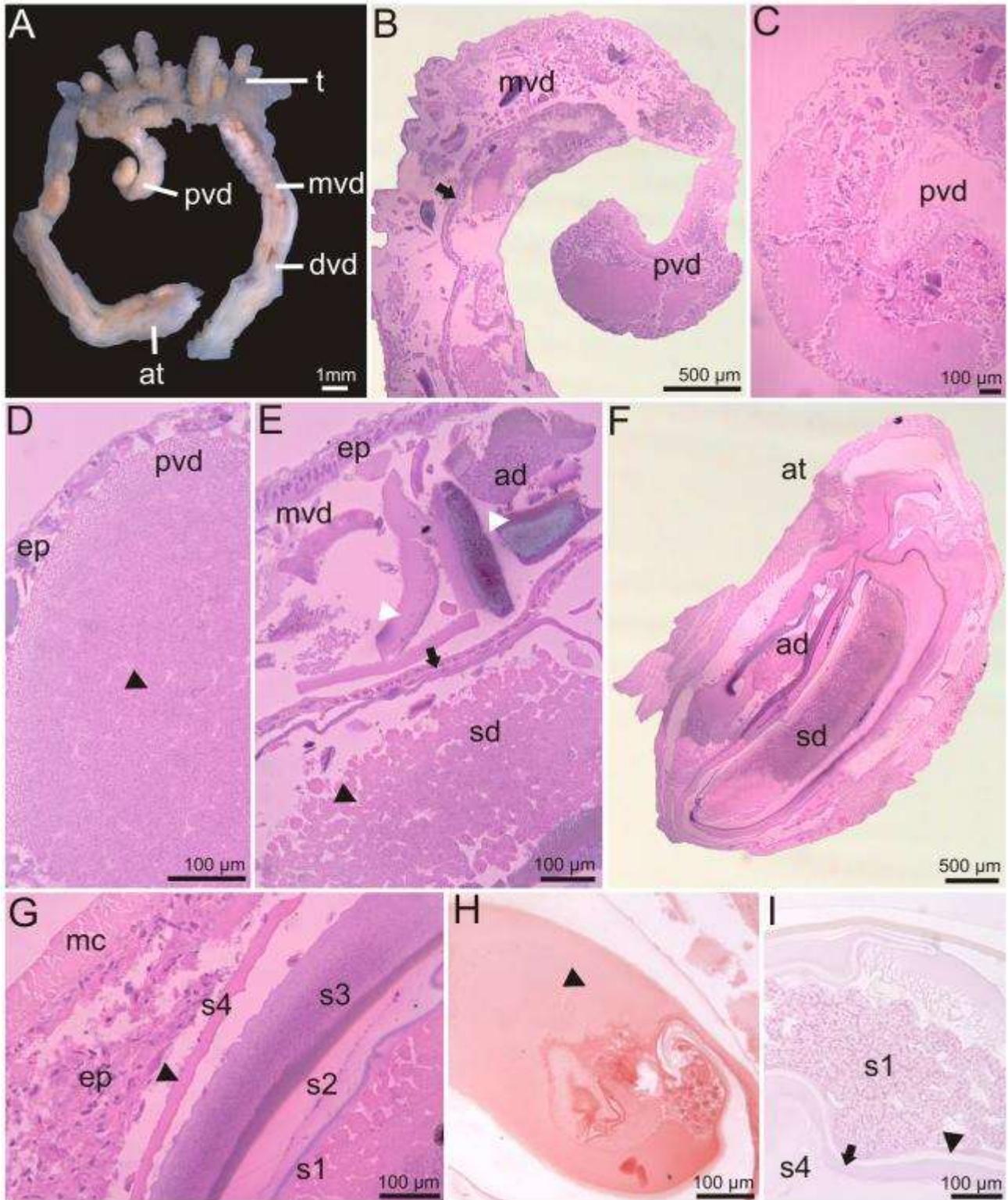


Figura 9. Filograma obtido a partir da Inferência Bayesiana concatenando os genes 16S rDNA e COI mtDNA. O suporte de clado está representado pela probabilidade posterior.

Fig. 9

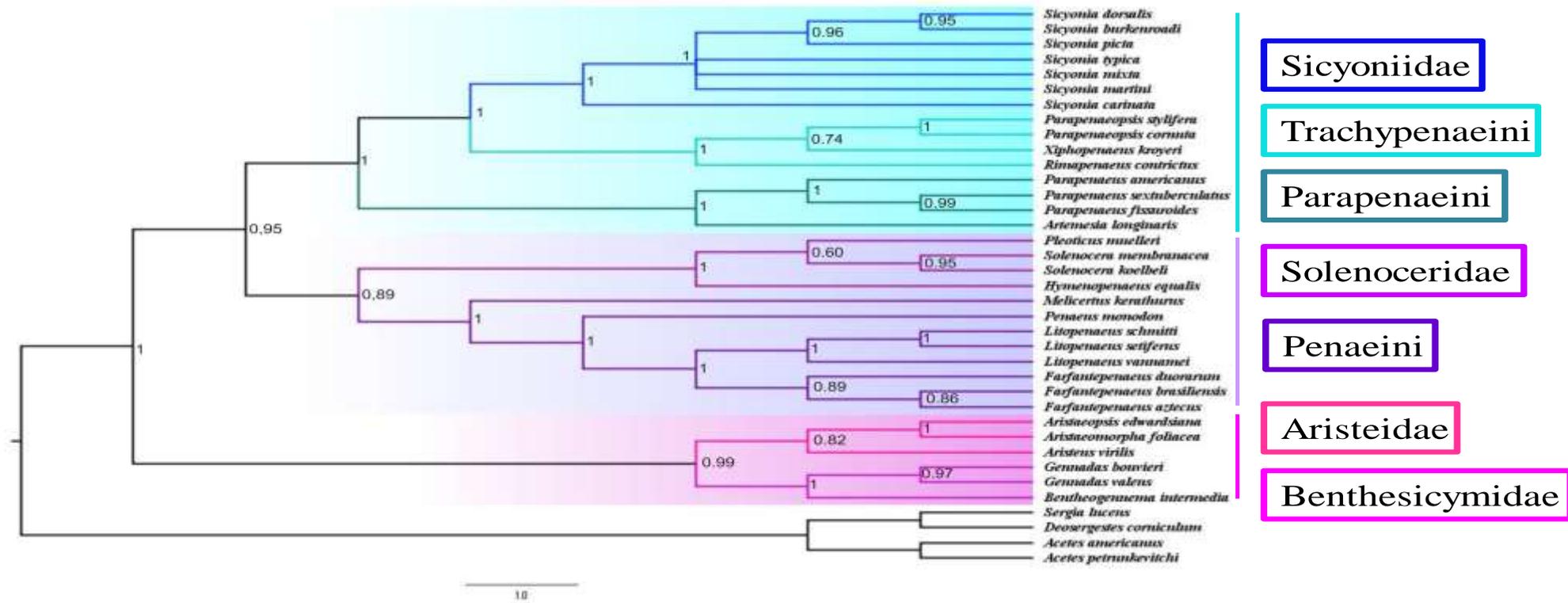


Figura 10. Mapeamento do caráter “vaso deferente”. Com o mapeamento dos estados do caráter “vaso deferente”, sendo que em rosa este é classificado como complexo (dutos espermático e acessório) e em verde classificado como simples (duto único), pode-se perceber que os clados apresentam padrões distintos na morfologia. As famílias Solenoceridae, Aristeidae, Benthescymidae e a tribo Penaeini apresentam o vaso deferente complexo, sendo a sinapomorfia do grupo. As tribos Parapenaeini e Trachypenaeini, juntamente com a família Sicyoniidae apresentam como sinapomorfia o vaso deferente simplificado. Em cinza, representam-se os estados desconhecidos.

Fig.10

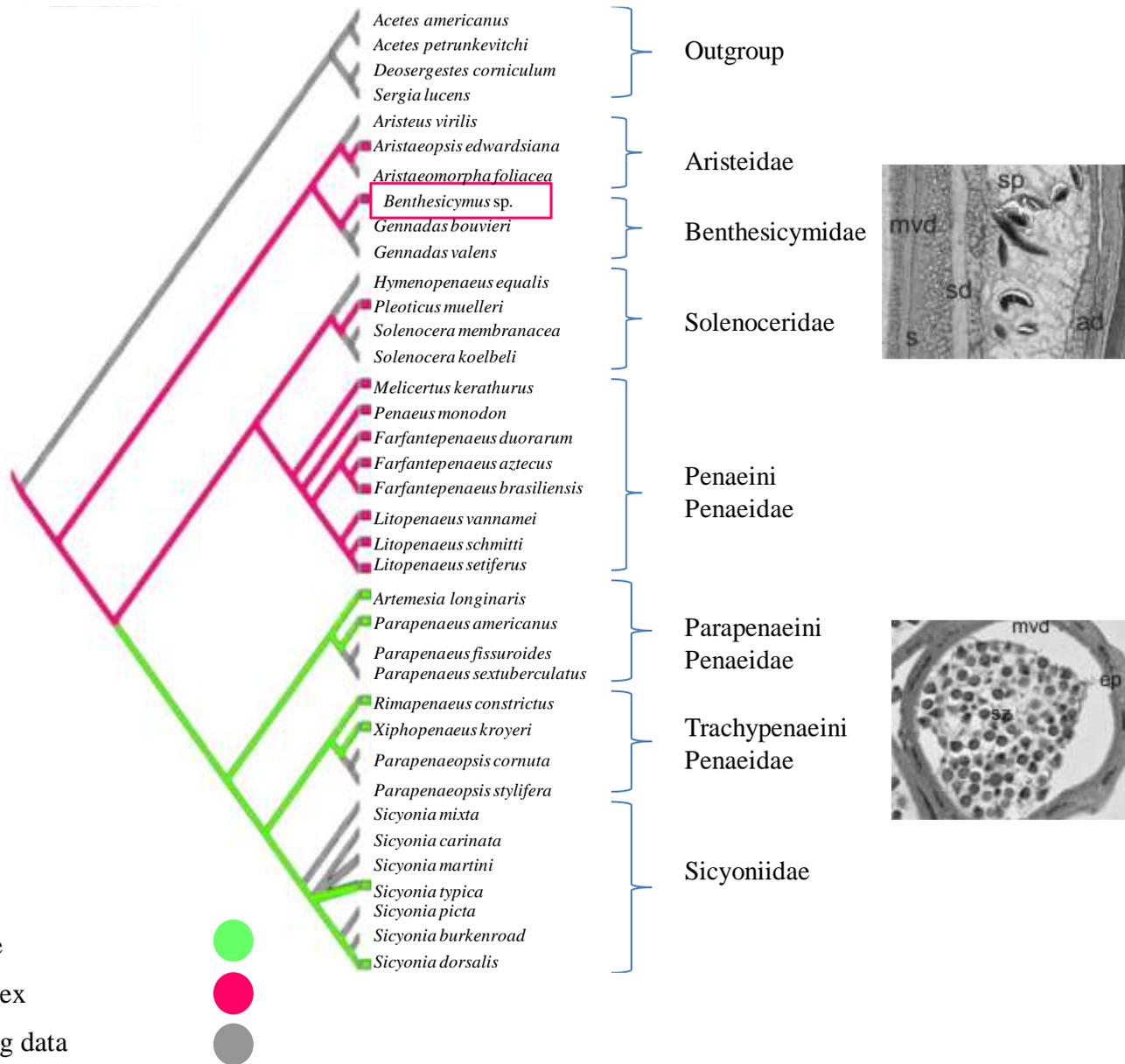


Figura 11. Mapeamento do caráter “glândula acessória”. Neste filograma, é demonstrado o mapeamento dos estados do caráter “glândula acessória” sendo que em azul esta é ausente, em verde é classificada como simples, contendo somente uma câmara glandular e em rosa, complexa, a qual apresenta diversas câmaras. Desta maneira, percebe-se que Solenoceridae, Benthescymidae, Aristeidae e Sicyoniidae apresentam ausência da glândula acessória na região da ampola terminal, sendo uma homoplasia entre eles. Na tribo Penaeini notam-se dois estados: simples em *Farfantepenaeus* spp. e complexa no gênero *Litopenaeus*, sendo uma característica única do gênero e portanto, uma autapomorfia. As tribos Trachypenaeini e Parapenaeini apresentam a glândula acessória simples. Em cinza, representam-se os estados desconhecidos.

Fig. 11

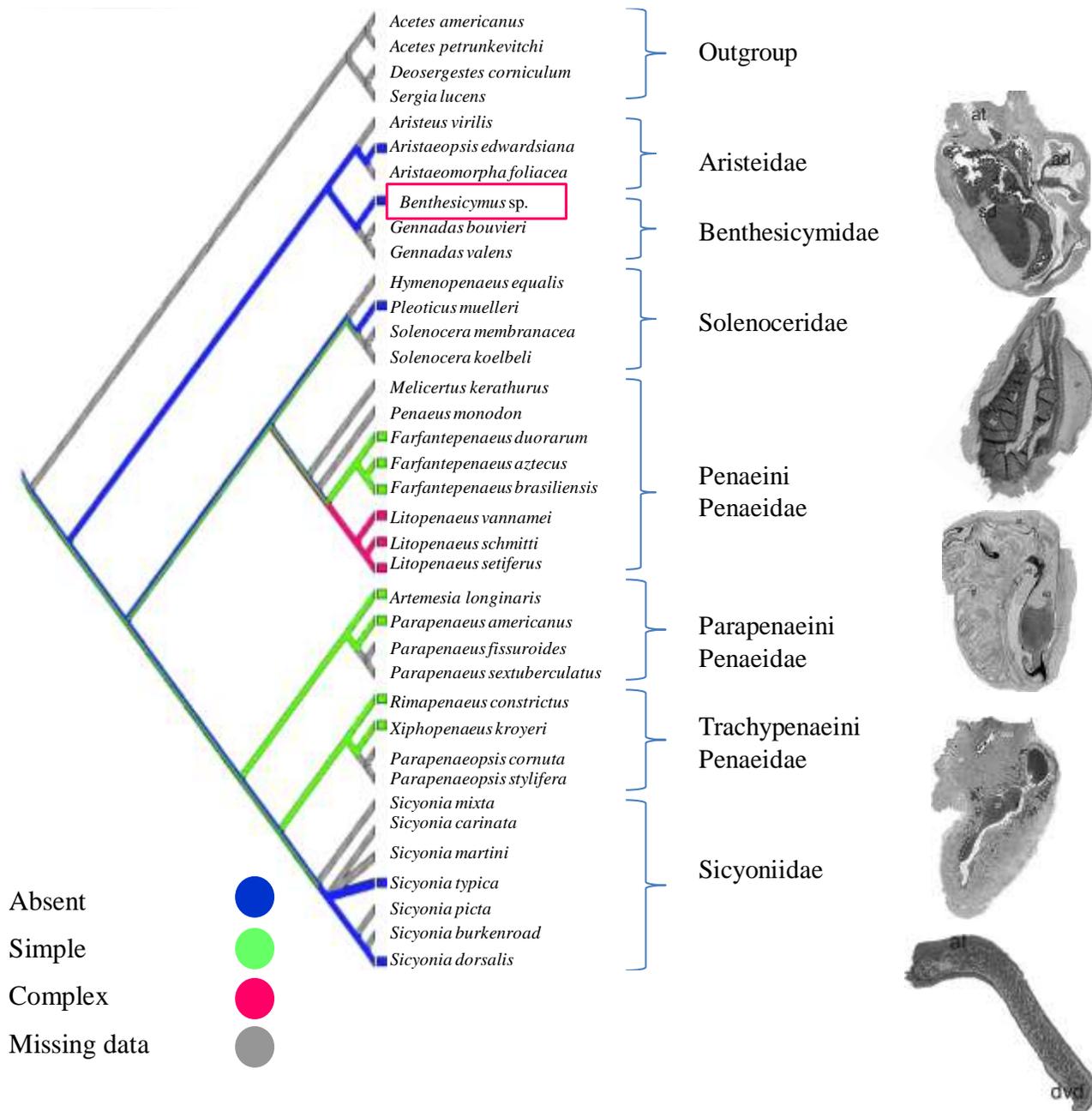
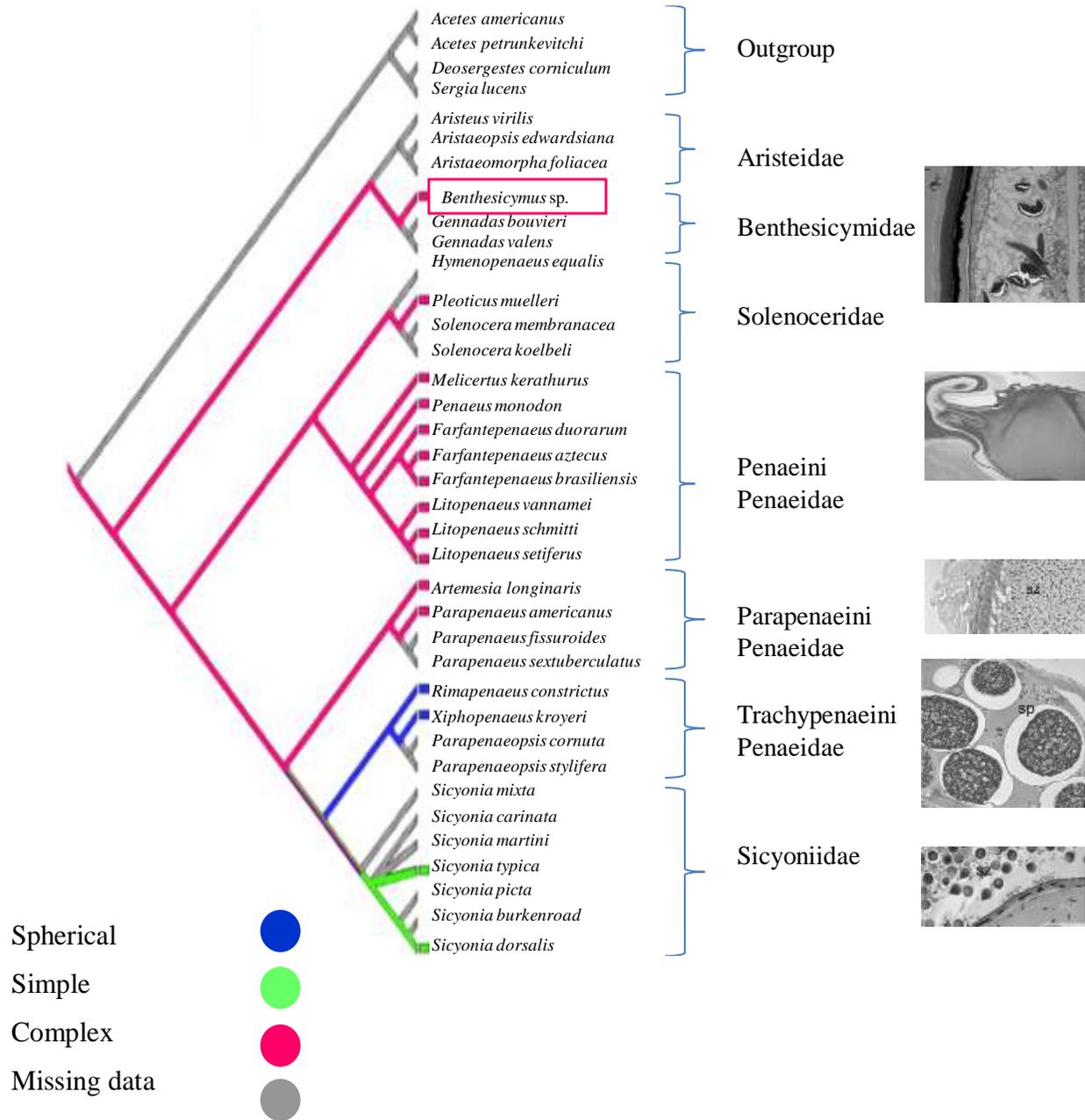


Figura 12. Mapeamento do caráter “espermátóforo”. Neste cladograma, pode-se perceber que o caráter espermátóforo possui origens independentes. Os ramos em azul representam espermátóforos esféricos, em verde este é classificado como simples, em amarelo, intermediário e em rosa complexo. As famílias Solenoceridae e Benthescymidae e a tribo Penaeini apresentam o espermátóforo complexo, sendo sinapomorfia do grupo. Em Trachypenaeini os espermátóforos são esféricos, sendo uma sinapomorfia do grupo. A sinapomorfia de Parapenaeini é a presença do espermátóforo com complexidade intermediária dentre as espécies estudadas. O espermátóforo simplificado foi observado em Sicyoniidae. Em cinza, representam-se os estados desconhecidos.

Fig. 12



Capítulo 2

História evolutiva do sistema reprodutor masculino de camarões Dendrobranchiata (Crustacea: Decapoda)

Resumo

O sistema reprodutor masculino das espécies *Belzebub faxoni*, pertencente à família Luciferidae, *Acetes americanus*, *Acetes marinus*, *Acetes paraguayensis* e *Acetes petrunkevitchi*, representantes de Sergestidae foram devidamente descritos. Uma vez que ambas as famílias compõem a superfamília Sergestoidea, cujo conhecimento da morfologia do sistema reprodutor masculino é incipiente, o presente trabalho será fundamental para compreender como se deu a evolução do sistema reprodutor masculino em Dendrobranchiata. As espécies *B. faxoni*, *A. americanus* e *A. petrunkevitchi* foram coletadas em Ubatuba, enquanto *A. marinus* e *A. paraguayensis* foram doados pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. O sistema reprodutor foi fixado segundo rotina para historesina e microscopia eletrônica de transmissão. A árvore evolutiva de Dendrobranchiata foi construída utilizando sequências concatenadas dos genes 16s e COI, obtidas no GenBank. O sistema reprodutor masculino de todas as espécies é formado por testículo e vaso deferente, dividido em região proximal, média e distal, o qual se estende até a ampola terminal. O vaso deferente de Sergestidae é subdividido em dois dutos independentes: o acessório e o espermático, enquanto que em Luciferidae o vaso deferente é único e simples. A reconstrução de estado ancestral de caráter mostrou que o vaso deferente complexo e a glândula acessória com câmara única e simples são os estados plesiomórficos em Dendrobranchiata. Estas características foram observadas em todos os Sergestidae e ausente em Luciferidae. O espermátóforo complexo, formado por diversas camadas de secreção também parece ser a plesiomorfia dos camarões Dendrobranchiata, observada em Sergestidae. Luciferidae, por sua vez, apresenta o espermátóforo muito simplificado. Assim, o ancestral hipotético de Dendrobranchiata possivelmente apresentava dois dutos no vaso deferente, a glândula acessória simples e o espermátóforo complexo. Os espermatozoides de *A. americanus*, *A. marinus* e *A. paraguayensis* são muito similares ultraestruturalmente e apresentaram a maior diferença morfológica observada dentro do mesmo gênero, para todos os crustáceos estudados, se comparado a *A. petrunkevitchi*, deixando em dúvida a recente inclusão de *Peisos* em *Acetes*. Este representa o primeiro trabalho que busca traçar a história evolutiva do sistema reprodutor masculino em todas as famílias de Dendrobranchiata.

Palavras-chave: espermatozoide, filogenia, histologia, ultraestrutura, vaso deferente.

Abstract

Here, we provide a comparative description of the male reproductive system of the species *Belzebub faxoni* (Luciferidae), *Acetes americanus*, *Acetes marinus*, *Acetes paraguayensis* and *Acetes petrunkevitchi*, representatives of Sergestidae. Both families comprise the superfamily Sergestoidea, a group little investigated about the morphology of the male reproductive system, which proved to be fundamental to understand the evolution of the male reproductive system in Dendrobranchiata. The species *B. faxoni*, *A. americanus* and *A. petrunkevitchi* were collected in Ubatuba, *A. marinus* and *A. paraguayensis* were donated by the National Institute for Amazonian Research. The reproductive system was fixed according to the routine for historesin and transmission electron microscopy. The phylogram of Dendrobranchiata was performed using concatenated sequences of the 16s and COI genes from GenBank. The male reproductive system of all species is composed by a pair of testis and vas deferens, divided into a proximal, median and distal region, which extends to the ampulla. The Sergestidae vas deferens is subdivided into two independent ducts: the accessory and sperm ducts, while Luciferidae presents only a single duct. The reconstruction of the ancestral state of character shows that the complex vas deferens and the accessory gland with a single and simple chamber are the plesiomorphic states in Dendrobranchiata. These characteristics were observed in Sergestidae and absent in Luciferidae. The complex spermatophore, with several layers of secretion, is the plesiomorphy of Dendrobranchiata, observed in Sergestidae. In Luciferidae, the spermatophore was very simplified. Thus, hypothetical ancestral of Dendrobranchiata possibly presents two ducts in the vas deferens, the simple accessory gland and the complex spermatophore. The spermatozoa of *A. americanus*, *A. marinus* and *A. paraguayensis* are very similar in ultrastructure and presents the greatest morphological difference within the same genus, when compared to *A. petrunkevitchi*, hesitating the recent inclusion of *Peisos* in *Acetes*. This work shows for the first time, the evolutionary history of the male reproductive system in all Dendrobranchiata family.

Keywords: histology, phylogeny, spermatozoon, ultrastructure, vas deferens.

Introdução

A superfamília Sergestoidea, pertencente à subordem Dendrobranchiata é composta por apenas duas famílias: Sergestidae Dana, 1852 e Luciferidae De Haan, 1833. No Brasil, a família Sergestidae é representada por quatro espécies, sendo *Acetes americanus americanus* Ortmann, 1893 e *Acetes petrunkevitchi* (Burkenroad, 1945), coletados majoritariamente no verão e em águas rasas na região costeira do estado de São Paulo (Simões et al., 2013). Além destes representantes, outras duas espécies possuem ocorrência no Brasil, sendo adaptadas a baixos níveis de salinidade, como *Acetes marinus* Omori, 1975 com ocorrência em águas salobras nas bacias hidrográficas do Amazonas e Tocantins-Araguaia, enquanto *Acetes paraguayensis* Hansen, 1919 representa o único camarão Dendrobranchiata dulcícola, com distribuição nas bacias Amazônica e do Paraná (Omori, 1975; Xiao e Greenwood, 1993). A família Luciferidae, por sua vez, é composta por dois gêneros viventes, *Belzebub* Vereshchaka, Olesen e Lunina, 2016 e *Lucifer* Thompson, 1829, com duas espécies abundantes no litoral do estado de São Paulo *Belzebub faxoni* (Borradaile, 1915) e *Lucifer typus* Milne Edwards, 1837 (Teodoro et al., 2012; Vereshchaka et al., 2016).

Estudos abordando a morfologia do sistema reprodutor masculino em Dendrobranchiata foram realizados, em sua maioria, com espécies da superfamília Penaeoidea, principalmente com a família Penaeidae (Malek e Bawab, 1974; Chow et al. 1990; Ro et al., 1990; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Bauer e Min, 1993; Subramoniam, 1995; Fransozo et al., 2016; Salti et al., Capítulo I). Nestas espécies, o sistema reprodutor masculino é formado por estruturas pareadas, os testículo e vaso deferente. O vaso deferente é dividido em região proximal, o PVD, região média, o MVD e região distal, o DVD. O PVD é caracterizado como duto simples, considerada a morfologia padrão de Penaeoidea, enquanto que o MVD e o DVD apresentam diferentes complexidades (Malek e Bawab, 1974; Chow et al. 1990; Ro et al., 1990; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Bauer e Min, 1993; Subramoniam, 1995; Fransozo et al., 2016; Salti et al., Capítulo I). O MVD pode ser um duto simples contendo os espermatozoides e as secreções que compõem o fluido seminal, ou pode ser

complexo. Neste último caso, o vaso deferente a partir do MVD é subdividido em dutos acessório e espermático, como descrito para Penaeidae em *Litopenaeus* spp., Pérez-Farfante, 1969 *Farfantepenaeus* spp. Burukovsky, 1997 e *Melicertus kerathurus* (Forsk., 1775), para Solenoceridae com *Pleoticus muelleri* (CS Bate, 1888), para Benthescymidae com *Benthescymus* sp. CS Bate, 1881 e *Aristaeopsis edwardsiana* (Johnson, 1868), representante de Aristeidae (Malek e Bawab, 1974; Ro et al., 1990; Bauer e Cash, 1991; Chow et al., 1991; Díaz et al., 2002; Fransozo et al., 2016; Salti et al., Capítulo I). No DVD há uma dilatação formada pela extensão do vaso deferente e pela presença da glândula acessória, sendo que esta última pode estar ausente (Salti et al., Capítulo I).

Em Sergestoidea, por sua vez, a morfologia do sistema reprodutor masculino foi descrita apenas para *Acetes chinensis* Hansen, 1919, sendo composto por estruturas pareadas e dividido em testículo, vaso deferente e duto secretor e vesícula seminal se estendendo até o gonópore (Xiao e Greenwood, 1993). Entretanto, este trabalho não apresenta figuras ou esquemas do sistema reprodutor masculino, o que dificulta o entendimento da sua organização. Desta maneira, ainda existe uma grande lacuna acerca do sistema reprodutor masculino de Sergestoidea, sendo praticamente desconhecido para Sergestidae e completamente desconhecido em Luciferidae. Considerando que a maioria dos estudos, até o momento, foi realizada com espécies de Penaeoidea, isso impossibilita o entendimento de como se deu a evolução do sistema reprodutor em Dendrobranchiata.

De maneira similar, a ultraestrutura dos espermatozoides também é melhor conhecida em Penaeoidea, sendo que praticamente todas as famílias já foram estudadas, exceto Benthescymidae (Medina 1995a; Medina et al. 2006a, 2006b; Fransozo et al., 2016; Camargo et al., 2016, 2017). Em Penaeoidea o espermatozoide apresenta a vesícula acrossomal com capuz apical e espinho (Medina et al. 2006a; Camargo et al., 2016, 2017). A única exceção é Aristeidae onde dois padrões ocorrem: espermatozoide sem capuz e espinho, portanto sem acrossomo ou com acrossomo esférico sobre o

material nuclear (Medina 1995a; Medina et al., 2006a). Porém, ao contrário do sistema reprodutor masculino, a ultraestrutura dos espermatozoides de Sergestoidea é um pouco melhor conhecida. O espermatozoide de *Eusergestes arcticus* (Kroyer, 1855) como *Sergestes arcticus* em Medina (1995b) é uma célula muito simplificada, sem acrossomo, com apenas algumas vesículas citoplasmáticas e mitocôndrias, enquanto que um segundo padrão mais complexo foi observado em *A. petrunkevitchi* como *Peisos petrunkevitchi* em Scelzo e Medina (2004). Nesta espécie, os autores encontraram um segundo padrão mais complexo para Sergestidae, com o acrossoma apresentando camadas concêntricas, câmara perforatorial, além de uma região estriada sobre o ápice desta câmara. Assim, o estudo dos espermatozoides das espécies brasileiras pertencentes ao gênero *Acetes* pode auxiliar também no mapeamento de características espermáticas, simples ou complexas dentro do padrão proposto (Scelzo e Medina, 2004) e, também, na relação de parentesco para este gênero, como já observados em outros trabalhos de ultraestrutura do espermatozoide (Camargo et al., 2016, 2017; Assugeni et al., 2017; Garcia-Bento et al., 2018)

Estudos recentes abordando as relações filogenéticas de Sergestidae têm levado a mudanças taxonômicas dentro do grupo (Vereshchaka et al., 2014; Vereshchaka e Lunina, 2015, Vereshchaka et al., 2015; Vereshchaka et al., 2017). Anteriormente, o gênero *Acetes* H. Milne Edwards, 1830 e o monotípico *Peisos* (Burkenroad, 1945) eram representantes de Sergestidae. Entretanto, Vereshchaka et al. (2015) por meio de análises morfológicas incluíram *P. petrunkevitchi* no gênero *Acetes*. Em adição, recentemente Wolfe et al. (2019) por meio de filogenia molecular utilizando genes, chamaram atenção para a atração do gênero *Lucifer* pelo grupo externo, indicando que pode haver problemas nas relações de parentesco em Sergestoidea. Estes autores afirmam a necessidade de análises morfológicas a fim de solucionar a filogenia de Dendrobranchiata, em especial, a morfologia do espermatozoide. Assim, uma análise comparativa da morfologia do sistema reprodutor masculino e da ultraestrutura do espermatozoide podem auxiliar no esclarecimento das relações evolutivas em Sergestidae.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o sistema reprodutor masculino de todas as espécies brasileiras de Sergestidae e de *B. faxoni* representante de Luciferidae. Assim, conhecendo a morfologia do sistema reprodutor de Sergestoidea, saberemos como se deu a evolução do grupo na subordem Dendrobranchiata, bem como as plesiomorfias e sinapomorfias dos grupos. Além disso, nossos resultados poderão auxiliar na resolução das relações de parentesco de Dendrobranchiata, em especial da família Luciferidae. Esta dissertação representa o primeiro trabalho que caracteriza o sistema reprodutor masculino de Sergestidae e Luciferidae em um contexto evolutivo, fechando assim, as lacunas existentes em Sergestoidea e também em Dendrobranchiata.

Material e Métodos

Coleta e dissecação

As coletas para obtenção de *Acetes americanus* e *Acetes petrunkevitchi* foram realizadas em Ubatuba-SP, entre Setembro de 2018 a Janeiro de 2019, utilizando-se barco de pesca camaroeira com redes adaptadas para profundidades de 5 metros. O luciferídeo *B. faxoni* foi coletado em Ubatuba-SP utilizando-se as redes de Neuston com malha de 5 mm até a primeira metade e 2 mm no “copo coletor” (15 minutos). As espécies *A. paraguayensis* e *A. marinus* foram doadas pelo Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) - Manaus-AM em Outubro de 2019. Os animais foram transportados ao Laboratório de Morfologia de Invertebrados, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP. Os indivíduos foram dissecados para a remoção do sistema reprodutor masculino. A coleta e transporte obedeceram às leis brasileiras (licença permanente concedida ao prof. Dr. Fernando José Zara para coleta de material zoológico, MMA-SISBIO número 34587-1).

Histologia e histoquímica

Para a caracterização morfológica e histoquímica, o sistema reprodutor masculino dos machos maduros de todas as espécies foi fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,2M (pH 7,4) durante 24-48 horas. As amostras de *A. marinus* e *A. paraguayensis* foram inicialmente preservadas em formalina 10% e posteriormente conservadas em álcool 80%. Estas amostras seguiram o protocolo de desidratação. Para a descrição anatômica, as amostras durante o processo de fixação, imersas no fixador, foram fotografadas sob estereomicroscópio. Todas as amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool (até 95%). Após esta etapa, foram embebidas e incluídas em historesina glicol-metacrilato Leica®. Os cortes seriados de 5-7µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e para descrição histológica, o material foi corado com hematoxilina e eosina (Junqueira e Junqueira, 1983). Para as análises histoquímicas foram utilizadas as técnicas de Xylidine Ponceau para detecção de proteínas (Mello e Vidal, 1980), PAS e Azul de Alcian 2,5% para polissacarídeos neutros e ácidos, respectivamente (Junqueira e Junqueira, 1983). Posteriormente, as lâminas foram fotografadas e digitalizadas no microscópio de luz Leica DM 2000 com uso do programa Leica IM50.

Ultraestrutura dos Espermatozoides

O material biológico foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,3) com sacarose 5% (Ro te al., 1990) para as espécies marinhas e sem sacarose para as espécies estuarinas e água doce, por 4 horas em geladeira. As únicas exceções foram *A. marinus* e *A. paraguayensis*, os quais foram obtidos de amostras do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e foram inicialmente fixados em formalina 10%. Estas foram reidratadas para posterior osmicagem. Em seguida, todas as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% tamponado (2 horas), contrastadas “Enbloc” com acetato de uranila 1% em solução aquosa (15 horas), sendo desidratadas em série crescente de acetona, embebidas e incluídas em mistura de

resina Epon-Araldite. Após a polimerização dos blocos, estes foram cortados em ultramicrótomo Leica UC7, sendo os cortes ultrafinos (50nm), recolhidos em grades de cobre (100 a 200mesh). A contrastação das grades foi realizada com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 0,4%, sendo as mesmas observadas e documentadas no TEM Jeol J1010, operado à 80 kV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP, FCAV, Campus de Jaboticabal. A nomenclatura utilizada para caracterização ultraestrutural do espermatozoide segue o proposto por Medina (1995a, b) e Scelzo e Medina (2004).

Inferência Filogenética e Reconstrução de estado ancestral de caráter

Para as análises de inferências filogenéticas, foram construídas árvores filogenéticas utilizando sequências concatenadas dos genes 16S rDNA e COI mtDNA de *Belzebub faxoni*, *Acetes americanus* e *Acetes petrunkevitchi* estudadas no presente trabalho e disponibilizadas na plataforma GenBank (Tabela 1). As espécies *Acetes marinus* e *Acetes paraguayensis* não estão incluídas na filogenia por não apresentarem sequências disponíveis no GenBank. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o software Clustal/W (Thompson et al., 1994) via Bioedit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Os alinhamentos foram salvos em “FASTA” e convertidos em formato “NEXUS” no Alignment Transformation Environment (Glez-Peña et al., 2010). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi encontrado de acordo o critério de AIC no software jModelTest 2 (Guindon et al., 2003), resultando no modelo GTR+G+I. A hipótese filogenética foi reconstruída com o método de Inferência Bayesiana utilizando o software MrBayes 3.2.2 on XSEDE (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) via plataforma online CIPRES (Miller et al., 2010) com 9×10^6 de gerações e 25% de burn-in. A edição das árvores filogenéticas e o enraizamento utilizando sequências das espécies *Stenopus hispidus* (Oliver, 1811), *Dromia erythropus* (Edwards in Catesby, 1771), *Uca maracoani* (Latreille, 1802) e *Euphasia krohnii* (Brandt, 1851) (via grupo externo), foram realizados utilizando o software FigTree 1.3.1 (Rambaut, 2009). Foi construída uma matriz apresentando os dados

histomorfológicos do sistema reprodutor masculino das espécies estudadas no presente trabalho e disponíveis da literatura científica (Malek e Bawab, 1974; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Bauer e Min 1993; Fransozo et al., 2016; Feng et al., 2018; Salti et al., Capítulo I). Nesta matriz, os caracteres selecionados por meio dos cortes histológicos foram o vaso deferente, glândula acessória na região da ampola terminal e espermatóforo. Para designar o estado do caráter, foram atribuídos números, sendo: “vaso deferente” pode ser simples (1) ou complexo (2), a glândula acessória pode estar ausente (0), ser simples (1) ou complexa (2) e o espermatóforo foi classificado como simples (1), unidades esféricas (2) ou complexo (3). Nas espécies com dados desconhecidos, foi atribuído o símbolo “?” (Tabela 2). A matriz e a árvore gerada pela Inferência Bayesiana foram carregadas no Mesquite v.3.04 (Maddison e Maddison, 2015) para a reconstrução da história do caráter pelo critério de parcimônia.

Resultados

Anatomia, histologia e histoquímica

O sistema reprodutor masculino do Luciferidae *Belzebub faxoni*, é constituído de testículos e vaso deferente pareados, detectados por meio dos cortes longitudinais seriados de animais inteiros, os quais foram emblocados diretamente devido ao tamanho diminuto do animal (Fig. 1 A). Por meio da histologia foi possível observar que o vaso deferente é um ducto simples, desde o PVD até o DVD. O PVD é um ducto único com epitélio cúbico simples, com espermatozoides livres ocupando todo lúmen do vaso, imersos em pequena quantidade de secreção basófila (Fig. 1 B). O MVD apresenta maior lúmen onde se observa produção de uma secreção coagulada, heterogênea e em sua maioria fortemente acidófila, a qual compacta a massa de espermatozoides a uma das margens no lúmen do vaso (Fig. 1 C). O epitélio desta região torna-se mais delgado, porém ainda classificado como cúbico simples (Fig. 1 D). O DVD apresenta-se com lúmen mais amplo do que nas regiões anteriores, caracterizando a dilatação do ducto ejaculatório ou ampola terminal (Fig. 1 E). Na ampola

terminal, o único ducto caracteriza-se pelos espermatozoides compactados a uma só margem devido ao grande volume de secreção acidófila granular heterogênea de aspecto coagulado, oriundo da MVD (Fig. 1 E). A secreção acidófila teve reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros e intensamente positiva para proteínas (Fig. 1 F e G). Desta maneira, o primórdio do espermatóforo de *B. faxoni* é simplificado, consistindo somente em espermatozoides imersos em secreção acidófila de caráter proteico.

O sistema reprodutor masculino no Sergestidae *Acetes americanus*, é formado por um par de testículos e vaso deferente (Fig. 2 A). O testículo é uma massa única e o vaso deferente está dividido em PVD, MVD e DVD, o qual se diferencia na ampola terminal (Fig. 2 A). O PVD é muito curto e delgado e a partir do MVD, o vaso deferente torna-se dilatado (Fig. 2 A). Por meio da histologia, foi possível observar que o PVD é um ducto único com epitélio colunar simples (Fig. 2 B). Os espermatozoides estão livres e imersos em secreção moderadamente acidófila (Fig. 2 B). A partir do MVD, o vaso deferente é subdividido em dois ductos totalmente separados por tecido conjuntivo próprio: o acessório e o espermático (Fig. 2 C). No ducto espermático os espermatozoides estão imersos em secreção fortemente basófila, a s1 (Fig. 2 D). O epitélio é mais delgado que no PVD (Fig. 2 D). O ducto acessório apresenta epitélio cúbico e simples e contém somente secreção acidófila com grânulos menos intensamente corados (Fig. 2 E). Os ductos acessório e espermático são contínuos à DVD onde se observa a porção mais dilatada formando o ducto ejaculatório ou a ampola terminal (Fig. 2 F). Na ampola terminal foi possível observar três câmaras: a extensão dos ductos acessório e espermático e a glândula acessória (Fig. 2 F). O primórdio do espermatóforo de *A. americanus* no ducto espermático apresenta três tipos de secreção: a do tipo I fortemente basófila, seguida pela tipo II acidófila e, circundando todas essas, a secreção do tipo III compacta e fortemente basófila, formando uma cápsula (Fig. 2 G). A glândula acessória de *A. americanus* é simples, apresentando somente uma câmara delimitada por epitélio simples e cúbico (Fig. 2 H). Ao redor do epitélio da glândula acessória, nota-se musculatura conspícua nesta região do vaso

deferente (Fig. 2 H). Esta glândula produz secreção acidófila homogênea, a qual será adicionada às secreções do ducto espermático e acessório, formando o espermatóforo complexo (Fig. 2 H). A secreção do ducto acessório foi fortemente positiva para proteínas e fracamente positiva para polissacarídeos neutros, sendo a secreção da glândula acessória positiva para proteínas e negativa para polissacarídeos neutros. As secreções do tipo II e III no ducto espermático foram fortemente positivas para proteínas, sendo a tipo II fracamente positiva para este composto (Fig. 2 I e J). Somente a secreção do tipo II no ducto espermático apresentou caráter fracamente positivo para polissacarídeos neutros (Fig. 2 J). Assim, *A. americanus* terá o espermatóforo complexo, com cinco camadas de secreções, sendo três produzidas no ducto espermático e serão adicionadas às secreções do ducto acessório da glândula acessória. Todas as regiões do vaso deferente foram negativas para polissacarídeos ácidos.

A anatomia de *Acetes marinus*, é caracterizada por um par de testículos e *vasa deferentia* (Fig. 3 A). O testículo apresenta-se como uma massa única, mais estreita na região cefálica (Fig. 3 A). O vaso deferente é dividido em PVD, MVD e DVD, sendo esta última região portando a dilatação que forma a ampola terminal (Fig. 3 A). O PVD é a região mais curta e delgada do vaso e a partir da MVD, o vaso deferente torna-se dilatado (Fig. 3 A). Histologicamente, o PVD é um ducto simples com epitélio simples e cúbico, apresentando núcleos em diferentes alturas (Fig. 3 B). Os espermatozoides estão livres e imersos em pequena quantidade de secreção basófila (Fig. 3 B). A partir do MVD, o epitélio continua cúbico e simples, porém, mais delgado. O vaso deferente apresenta dois ductos separados por seu próprio tecido conjuntivo, formando os ductos acessório e espermático (Fig. 3 C). No ducto acessório há apenas secreção acidófila e homogênea e externamente, uma camada delgada de secreção basófila (Fig. 3 D). O ducto espermático contém os espermatozoides livres e imersos em secreção acidófila, denominada tipo I (Fig. 3D). Na dilatação do DVD, ou seja, na ampola terminal, os dois ductos estão presentes e há uma terceira câmara única, a glândula acessória (Fig. 3 E). No ducto espermático, o primórdio do espermatóforo de *A. marinus*,

apresenta três tipos de secreções: a tipo I acidófila na qual os espermatozoides estão imersos, delimitada pela tipo II delgada e fortemente acidófila e ambas envoltas pela secreção do tipo III, também delgada e compacta, como uma cápsula acidófila (Fig. 3 F). A glândula acessória nesta espécie também é simplificada, possuindo apenas uma câmara produtora de secreção homogênea acidófila e uma pequena quantidade de secreção basófila, sendo esta última periférica (Fig. 3 G). A histoquímica mostra a reação fortemente positiva para proteínas das secreções da glândula acessória e de ambos os dutos (Fig. 3 H). Por meio da técnica do PAS, somente a secreção do duto acessório foi fortemente positiva para polissacarídeos neutros, enquanto a secreção do duto espermático é fracamente positiva e a secreção da glândula não apresentou este composto na secreção (Fig. 3 I). Portanto, o espermatóforo a ser ejaculado pela gonóporo será complexo, composto por cinco tipos de secreções, sendo três provenientes do duto espermático, uma do duto acessório e uma da secreção da glândula. Como na espécie anterior, não foram detectados polissacarídeos ácidos no vaso deferente.

O sistema reprodutor masculino do único Dendrobranchiata dulcícola *Acetes paraguayensis*, também representante de Sergestidae, nota-se o mesmo padrão anteriormente registrado para o gênero, com testículos pareados e o par de *vasa deferentia* (Fig. 4 A). O testículo é uma massa única com um estreitamento na região cefálica e o vaso deferente apresenta três regiões: PVD, MVD e DVD, também com a dilatação formando a ampola terminal porém menos destacada que nas demais espécies (Fig. 4 A). Por meio da histologia, observou-se que o PVD desta espécie é a região mais curta do vaso deferente e é caracterizado por um duto simples com epitélio simples e cúbico, sendo um único duto contendo os espermatozoides livres e imersos em pequena quantidade de secreção ligeiramente mais basófila (Fig. 4 B). A partir do MVD nota-se o epitélio mais delgado porém ainda cúbico com núcleos polimórficos em ambos os dutos acessório e espermático (Fig. 4 C). No duto espermático, observou-se uma grande massa de espermatozoides imersos em secreção basófila, envolto por secreção marcadamente mais acidófila (Fig. 4 D). No duto acessório, por sua

vez, nota-se uma secreção moderadamente acidófila homogênea (Fig. 4 D). Na ampola terminal é possível observar os dutos acessório e espermático e a glândula acessória simples (Fig. 4 E). O primórdio de espermátóforo de *A. paraguayensis* apresenta três camadas de secreções: a tipo I, fracamente basófila na qual os espermatozoides estão imersos, recoberta pela secreção do tipo II fortemente acidófila e marcadamente espessa, e a do tipo III mais externa, delgada e formando uma cápsula compacta e acidófila (Fig. 4 F). A glândula acessória de *A. paraguayensis*, também é simplificada, apresentando somente uma câmara (Fig. 4 G). Diferentemente do observado nas demais espécies de *Acetes*, em *A. paraguayensis* a secreção da glândula acessória apresenta aspecto fibroso (Fig. 4 G). A técnica de Xylidine Ponceau demonstrou o caráter proteico de todas as secreções da glândula e dos dutos acessório e espermático (Fig. 4 H). Em contraposição, estas foram positivas para polissacarídeos neutros pela técnica de PAS, sendo a secreção da glândula também positiva, o que não foi notado nas espécies anteriormente descritas (Fig. 4 I). Em relação ao espermátóforo final, este é complexo, apresentando cinco tipos de secreções: tipo I, II e III do duto espermático, a secreção do duto acessório e a da glândula, sendo todas ausentes de para polissacarídeos ácidos.

Em *Acetes petrunkevitchi*, a anatomia o sistema reprodutor masculino seguiu o padrão as espécies anteriores, sendo formado por um par de testículos e *vasa deferentia* (Fig. 5 A). O vaso deferente pareado foi dividido em região PVD, MVD e DVD, os quais se tornam mais dilatados na sua região distal para formar a ampola terminal ou duto ejaculatório (Fig. 5 A). Por meio das secções histológicas pode-se observar que o PVD apresenta epitélio cúbico simples, com somente um duto contendo um grande volume de espermatozoides livres imersos em secreção acentuadamente basófila, quando comparado às espécies anteriores (Fig. 5 B). A partir do MVD o lúmen apresenta maior diâmetro e o vaso deferente é dividido em dois dutos totalmente separados e independentes, cada um assentado sobre seu tecido conjuntivo, perfazendo assim um duto acessório e outro espermático (Fig. 5 D). O duto acessório é muito amplo, destacando-se das outras espécies e

contém um grande volume de secreção homogênea basófila com pequenos grânulos na periferia da secreção. Nota-se ainda uma delgada camada de secreção compacta e acidófila envolvida por uma superficial basófila e homogênea (Fig. 5 C). No ducto espermático os espermatozoides estão livres, imersos em secreção basófila produzida no PVD e ao redor desta ocorre uma secreção levemente acidófila, circundando a massa de espermatozoides no MVD (Fig. 5 D). No DVD nota-se que a ampola terminal está circundada por forte camada de tecido muscular (Fig. 5 E). Esta região é caracterizada pela continuidade dos ductos espermático e acessório (Fig. 5 E). A glândula acessória forma uma câmara simples e unida, mais destacada ou isolada dos ductos, com epitélio estratificado (Fig. 5 E). A secreção glandular luminal é homogênea acidófila, positiva para proteínas e fortemente reativa para polissacarídeos neutros (Fig. 5 E, G, H e I). A secreção do ducto acessório torna-se granular e basófila, o que não foi observado nas espécies anteriores, sendo mais positiva para polissacarídeos neutros em alguns materiais granulares, do que em outros (Fig. 5 E, G, H e I). Este material granular também é fortemente positivo para proteínas, como o observado para a secreção do ducto espermático, principalmente a do tipo II (Fig. 5 H). Em relação ao espermatóforo, assim como nas demais espécies, encontram-se cinco tipos de secreções, sendo três do ducto espermático, uma do ducto acessório, porém granular e mais complexa, e a secreção da glândula acessória. Nenhuma região do vaso deferente apresentou reatividade para polissacarídeos ácidos.

Ultraestrutura dos espermatozoides

Em *B. faxoni* (Luciferidae), a ultraestrutura mostrou que a morfologia do espermatozoide pode ser considerada bastante simplificada, sendo esta célula haplóide arredondada ou ligeiramente elipsóide, com o material nuclear em contato direto com o material citoplasmático, devido ao desaparecimento do envoltório nuclear, ocupando praticamente todo o volume celular (Fig. 6 A). Este material nucleocitoplasmático encontra-se elentrondenso com a presença de material granular e fibrilar (Fig. 6 A e B). O espermatozoide é pobre em estruturas ou organelas, apresentando somente

um número variável de (um a três) vesículas eletrólúcidas (Fig. 6 B). Assim, neste luciferídeo, uma vesícula acrossomal típica não é identificada, sendo considerada ausente, sendo o mesmo para outras organelas como mitocôndrias (Fig. 6 A e B).

O espermatozoide de *A. americanus* mostra-se como uma célula simples com o formato variando de elíptico a arredondado. O material genético encontra-se misturado ao citoplasma, com total ausência do envoltório nuclear ou mesmo áreas exclusivamente citoplasmáticas (Fig. 6 C). Este material nucleocitoplasmático tem aspecto fibroso com diferentes eletrondensidades. A maior parte da superfície do espermatozoide é recoberta por muitas vesículas eletrólúcidas (Fig. 6 C). Além destas vesículas, notam-se poucas mitocôndrias, as quais apresentam poucas ou nenhuma crista, distribuídas aleatoriamente no nucleocitoplasma. Em um dos pólos da célula encontra-se a pequena e simplificada vesícula acrossomal, ocupando aproximadamente 10% do volume celular (Fig. 6 C e D). A vesícula acrossomal apresenta a camada ou zona interna a qual é menos eletrondensa e assume uma forma estriada em contato com a camada externa mais eletrondensa (Fig. 6 D). No interior destas estrias, parece ocorrer um material filamentososo que alcança a membrana do que relembra uma câmara perforatorial (Fig. 6 E). Esta câmara apresenta formato arredondado com materiais eletrondensos finamente fibrilares (Fig. 6 D e E).

Com a ultraestrutura do espermatozoide de *A. marinus*, é possível perceber que este apresenta o formato arredondado a elíptico com a morfologia simplificada. O material nuclear e citoplasmático estão dispersos, com ausência do envoltório nuclear, caracterizando o material nucleocitoplasmático com diferentes eletrondensidades e aspecto fibroso (Fig. 6 F). A superfície do espermatozoide apresenta diversas vesículas eletrólúcidas (Fig. 6 F). Em um dos pólos da célula, observa-se a presença de uma pequena vesícula acrossomal, em relação ao volume celular. Esta estrutura acrossomal simples apresenta duas camadas, sendo a interna eletrondensa e delgada, sem nenhuma complexidade estrutural (Fig. 6 G). A camada externa, por sua vez, é menos eletrondensa, homogênea, sem áreas eletrondensas adicionais, mais espessa e com sua superfície bastante

irregular (Fig. 6 G). Provavelmente, as irregularidades desta camada devem estar associadas ao agente de fixação não adequado para microscopia eletrônica, nos parecendo então, se tratar de artefato, uma vez que a figura mais observada tende a ser, na verdade, arredondada. A câmara perforatorial é alongada e volumosa em relação ao volume da vesícula acrossomal. De maneira similar ao *A. marinus*, a espécie *A. paraguayensis* também apresenta o espermatozoide arredondado, com material nuclear misturado no citoplasma, vesículas eletrólucidas periféricas, mitocôndrias aleatoriamente distribuídas e a pequena vesícula acrossomal em um dos pólos da célula (Fig. 7 A e B). A camada interna é mais delgada que *A. marinus* e a externa é homogênea e também volumosa (Fig. 7 B). O mesmo problema artefactual observado em *A. marinus*, também foi recorrente em *A. paraguayensis* o que nos leva a crer que a vesícula acrossomal também seja arredondada. A câmara perforatorial é alongada e com ápice agudo (Fig. 7 B).

A morfologia do espermatozoide em *A. petrunkevitchi*, já conhecida na literatura e, portanto, aqui vamos somente destacar algumas características já descritas para ser utilizadas como parâmetros para compararmos esta espécie com as demais espécies de Sergestoidea do presente trabalho. Desta maneira, em *A. petrunkevitchi*, o espermatozoide é ultraestruturalmente, muito distinto das demais espécies de *Acetes*, apresentando formato ovóide à fusiforme (Fig. 7 C). O material genético encontra-se em contato direto com o material citoplasmático, caracterizando uma estrutura nucleocitoplasmática, porém, a cromatina é menos compacta e de aspecto granular. Neste material nucleocitoplasmático encontram-se pequenas vesículas eletron densas com distribuição aleatória, bem como as mitocôndrias, as quais apresentam poucas ou nenhuma crista (Fig. 7 C - H). Nota-se uma delgada banda de citoplasma periacrossomal, o qual se torna mais volumoso na base da câmara perforatorial (Fig. 7 D). A vesícula acrossomal desta espécie encontra-se em um dos pólos do espermatozoide (Fig. 7 D). A sua margem em contato com a membrana plasmática será denominada de ápice, enquanto que a região basal da vesícula acrossomal está voltada para a base da câmara perforatorial. A vesícula acrossomal é complexa com a camada acrossomal interna

apresentando diferentes regiões como a região estriada, a qual tem a porção mais central com material granular e menos eletrondenso que as estrias (Fig. 7 D e E). Abaixo desta região, a camada interna também apresenta uma a região granular que, em vários cortes relembram impressão digital, e abaixo desta região encontra-se o cerne central (“central core”) (Fig. 7 D e E). Ainda na camada interna, no pólo basal, encontra-se uma área menos eletrondensa que o “central core”, denominada região basal (Fig. 7 D). A camada externa do acrossoma é heterogênea apresentando eletrondensidades distintas, sendo a periférica mais eletrondensa (Fig. 7 D). A câmara perforatorial é acentuadamente alongada e com ápice agudo, porém, a sua relação em volume para a vesícula acrossomal é pequena. Outra característica exclusiva do espermatozoide nesta espécie é a presença da protuberância apical no ápice das camadas acrossomais e da câmara perforatorial (Fig. 7 C e D). As principais diferenças encontradas na morfologia do espermatozoide entre os Sergestoidea estão sumarizadas na Tabela 3.

Análise filogenética

A árvore evolutiva obtida a partir da Inferência Bayesiana utilizando sequências concatenadas dos genes 16S rDNA e COI mtDNA, cujo o suporte de clado está demonstrado pela probabilidade posterior, mostrou que a superfamília Penaeoidea é monofilética enquanto a superfamília Sergestoidea parece ser parafilética. Pode-se observar a formação de dois clados em Dendrobranchiata: um clado formado pelas famílias Sergestidae e Luciferidae e o clado formado pelas famílias pertencentes à Penaeoidea (Fig. 8).

No clado formado por Sergestidae e Luciferidae, houve a separação das espécies de sergestídeos, sendo que o gênero *Acetes* foi separado das demais espécies da família. As espécies *Deosergestes corniculum* (Kroyer, 1885) e *Lucensosergia lucens* (Hansen, 1922) se alocaram como grupo irmão de Luciferidae. Em Penaeoidea, por sua vez, Penaeidae é parafilética enquanto Aristeidae, Benthescymidae, Sicyoniidae e Solenoceridae são grupos monofiléticos. Houve a

formação de uma politomia com Benthescymidae, Aristeidae e Solenoceridae. A família Penaeidae constituiu um clado, enquanto Parapenaeidae e Trachypenaeidae ficaram próximas da família Sicyoniidae, sendo que Trachypenaeidae é grupo irmão de Sicyoniidae (Fig. 8)

Reconstrução de estado ancestral de caráter

A reconstrução de estado ancestral de caráter seguindo o critério de Parcimônia mostrou que o sistema reprodutor masculino de Dendrobranchiata está relacionado com a filogenia do grupo. O “vaso deferente complexo”, subdividido em dois dutos (acessório e espermático) foi observado nas famílias Sergestidae, Aristeidae, Benthescymidae e Solenoceridae e também na família Penaeidae, sendo a sinapomorfia do clado formado entre esses grupos (Fig. 9). A simplificação do vaso deferente foi observada no clado formado entre Parapenaeidae, Trachypenaeidae e Sicyoniidae, sendo a característica compartilhada entre os grupos. Luciferidae, por sua vez, apresentou o vaso deferente simplificado. Em relação à “glândula acessória” esta parece ter origens independentes dentro da filogenia (Fig. 10). A ausência da glândula foi observada em Luciferidae, Benthescymidae, Aristeidae, Solenoceridae e Sicyoniidae e parece ser uma convergência. Sergestoidea, *Farfantepenaeus* spp. (Penaeidae), Parapenaeidae e Trachypenaeidae apresentam a glândula acessória simplificada, com somente uma câmara. Assim, esse estado parece ser homoplásico. Em *Litopenaeus* spp. a glândula acessória é muito especializada e, portanto, classificada como complexa. Esta é a característica exclusiva do gênero e parece ser uma autapomorfia (Fig. 10).

Com o mapeamento do caráter “espermatóforo”, este também parece estar relacionado à filogenia do grupo (Fig. 11). O espermatóforo simplificado, o qual apresenta somente uma matriz de secreção contendo os espermatozoides, foi observado somente em Luciferidae e Sicyoniidae sendo uma homoplasia. Os espermatozoides empacotados em pequenos e numerosos espermatóforos esféricos é a característica exclusiva de Trachypenaeidae. O espermatóforo

complexo, por sua vez, formado por diversas camadas de secreção foi observado em Sergestidae, Aristeidae, Benthescymidae, Solenoceridae, Penaeidae e Parapenaeidae. Desta maneira, a reconstrução de estado ancestral de caráter mostra que a plesiomorfia do vaso deferente em Dendrobranchiata é o vaso deferente subdividido em dois dutos. A condição plesiomórfica da glândula acessória em Dendrobranchiata é possuir esta estrutura com sua morfologia simplificada, com somente uma câmara. Em relação ao espermátóforo, o seu estado plesiomórfico é apresentar diversas camadas de secreção, ou seja, ser complexo. Sendo assim, o ancestral de Dendrobranchiata possivelmente apresentava o vaso deferente com dois dutos, a glândula acessória simplificada e o espermátóforo complexo (Fig. 11).

Discussão

Neste trabalho caracterizamos o sistema reprodutor masculino de todas as espécies brasileiras da família Sergestidae e *B. faxoni*, pertencente à Luciferidae. O vaso deferente médio de *A. americanus*, *A. marinus*, *A. paraguayensis* e *A. petrunkevitchi* é dividido em dois dutos: acessório e espermático. Esta parece ser uma característica compartilhada entre os Sergestidae. Na região da ampola terminal destas espécies, observou-se uma glândula acessória simples, a qual apresenta somente uma câmara produtora de secreção. Em *B. faxoni*, por sua vez, o vaso deferente é simplificado, não subdividido em dois dutos. Na região da ampola terminal, nota-se uma dilatação, mas sem a presença da glândula acessória. Sendo assim, as famílias Sergestidae e Luciferidae, as quais compreendem a superfamília Sergestoidea, apresentam divergências na morfologia do sistema reprodutor masculino. Em relação a ultraestrutura do espermatozoide, este apresenta sua morfologia muito simplificada em *B. faxoni*, *A. americanus*, *A. marinus* e *A. paraguayensis*, tendo o formato arredondado a elipsóide. O espermatozoide do luciferídeo *B. faxoni* não possui a vesícula acrossomal, enquanto em *A. americanus*, *A. marinus* e *A. paraguayensis*, esta estrutura é simplificada. Em *A. petrunkevitchi*, a ultraestrutura mostrou que o espermatozoide, nesta espécie, é

muito complexo quando comparado com as demais espécies, apresentando formato fusiforme e a vesícula acrossomal complexa.

O sistema reprodutor masculino de Sergestoidea foi caracterizado somente para *A. chinensis*, o qual apresenta o vaso deferente e o ducto secretor (Xiao e Greenwood, 1993). Segundo os autores, essas estruturas são semelhantes quanto ao diâmetro e são completamente separadas uma da outra e circundadas por tecido conjuntivo. O vaso deferente e o ducto secretor parecem estar preenchidos com massa espermática e secreção, respectivamente. Sendo assim, nos parece que os autores observaram dois dutos no vaso deferente de *A. chinensis*, sendo o vaso deferente equivalente ao ducto espermático e o ducto secretor refere-se ao ducto acessório, contendo somente secreção. Em adição, os autores afirmam que o vaso deferente se abre ventralmente na vesícula seminal, enquanto o ducto secretor dorsalmente. Essa vesícula seminal parece ser dividida em três câmaras separadas por tecido epitelial (Xiao e Greenwood, 1993). Assim, a estrutura chamada de vesícula seminal em *A. chinensis* parece estar na dilatação da ampola terminal. Nesta dilatação, de acordo com o observado nas espécies caracterizadas no presente estudo, a ampola terminal é formada pela extensão dos dutos espermático e acessório e a glândula acessória. Portanto, assim como observado no presente trabalho em *A. americanus*, *A. marinus*, *A. paraguayensis* e *A. petrunkevitchi* e *A. chinensis*, Sergestidae apresenta o vaso deferente complexo (com dois dutos separados) e glândula acessória simples.

Dentre as espécies estudadas, *A. americanus* e *A. petrunkevitchi* são espécies marinhas, *A. marinus* é estuarina, sendo *A. paraguayensis* a única espécie dulcícola de Dendrobranchiata. Embora a morfologia do sistema reprodutor masculino destas espécies apresente poucas diferenças, é possível elencar algumas características únicas das espécies. Dentre estas diferenças, podemos destacar o ducto acessório de *A. petrunkevitchi*, o qual possui o diâmetro claramente mais dilatado quando comparado com *A. americanus*, *A. marinus* e *A. paraguayensis*. Além disso, as secreções encontradas no ducto acessório, espermático e na glândula de *A. petrunkevitchi*, são glicoproteínas

intensamente positivas para polissacarídeos neutros. Quando comparada à outra espécie marinha *A. americanus* e a estuarina *A. marinus*, estas apresentam as secreções dos dutos espermático e acessório ricas em proteínas e pouco reativas para polissacarídeos neutros, enquanto a secreção da glândula não apresenta este composto. Por outro lado, no sergestídeo dulcícola *A. paraguayensis* a glândula acessória produz secreção glicoproteica com aspecto fibroso, o que é uma característica exclusiva desta espécie, em adição a pequena dilatação da ampola terminal. Tais características podem estar relacionadas com o fato da adesão do espermatóforo no receptáculo seminal necessitar de um composto adesivo, protetor ou “plug” adicional, rico em polissacarídeos, para atuar em água doce. Como elucidado por Oliveira et al. (2018), para espécies de caranguejos amazônicos da família Trichodactylidae, esta secreção glicoproteica pode estar relacionada com a proteção do espermatóforo contra a deiscência no momento de transferência para a fêmea.

Como descrito para Penaeoidea, o sistema reprodutor masculino pode apresentar a região média do vaso deferente simplificada, contendo somente um ducto com o material espermático em seu lúmen, ou pode apresentar o vaso deferente complexo (Malek e Bawab, 1974; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Bauer e Min, 1993; Salti et al., Capítulo I). O vaso deferente simplificado foi descrito para representantes da família Trachypenaeidae, como *Rimapenaeus similis* (Smith, 1885) (como *Trachypenaeus similis* em Bauer e Min, 1993), *Rimapenaeus constrictus* (Stimpson, 1871) e *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), nas espécies de Parapenaeini *Artemesia longinaris* CS Bate, 1888 e *Parapenaeus americanus* Rathbun, 1901 e em Sicyoniidae, observado em *Sicyonia typica* (Boeck, 1864), *Sicyonia dorsalis* (Kingsley, 1878) e *Sicyonia brevirostris* Stimpson, 1871 (Bauer, 1991; Salti et al., Capítulo I). No caso das espécies que possuem o vaso deferente complexo, encontrado nas famílias Aristeidae, Benthescymidae, Solenoceridae e a família Penaeidae, este é subdividido pelos tiflosoles em dois dutos: acessório e espermático (Salti et al., Capítulo I). Assim como observado em Sergestidae, o ducto acessório nestas espécies possui a função de produzir somente secreção, o que está relacionado com a complexidade do espermatóforo, uma vez que a

secreção produzida pelo mesmo será adicionada ao material do ducto espermático e, portanto, este material será mais complexo (Salti et al., Capítulo I).

Além de apresentarem esta modificação na região média do vaso deferente, o sistema reprodutor masculino possui outra modificação na região distal, sendo uma dilatação do vaso deferente, denominada ampola terminal ou ducto ejaculatório (Bauer, 1991; Salti et al., Capítulo I). A ampola terminal das espécies de Penaeoidea apresenta a extensão do vaso deferente e pode ou não conter uma glândula acessória (Bauer, 1991; Bauer e Cash 1991; Salti et al., Capítulo I). A ausência da glândula acessória foi observada nas famílias Solenoceridae, Aristeidae e Benthescymidae, entretanto, nestas espécies, o epitélio extremamente alto e secretor da ampola terminal parece desempenhar o papel de uma glândula acessória simplificada, produzindo um tipo de secreção que será adicionado ao material espermático. Essa característica é diferente do observado em *S. typica*, *S. dorsalis* e *S. brevirostris* representantes de Sicyoniidae (Bauer, 1991; Salti et al., Capítulo I). Nestas espécies, a ampola terminal também não possui a estrutura glandular, entretanto, a dilatação é muito menos acentuada e o epitélio desta região não produz secreção adicional diferente das regiões anteriores (Salti et al., Capítulo I).

Em contraposição, nas espécies que apresentam a glândula acessória, esta pode ser classificada como simples ou complexa, de acordo com a sua morfologia (Salti et al., Capítulo I). No presente trabalho, observou-se que o luciferídeo *B. faxoni* possui somente a dilatação da ampola terminal, sem a estrutura glandular. Esta morfologia é semelhante ao observado em Sicyoniidae, e em ambos os grupos, o epitélio da ampola terminal não produz secreção adicional, sendo somente a extensão do vaso deferente simplificado (Salti et al., Capítulo I; Presente trabalho). Em todas as espécies de Sergestidae, a glândula acessória possui sua organização simplificada, possuindo apenas uma câmara produtora de secreção. A glândula acessória simplificada também foi observada nas espécies em que as fêmeas possuem o téllico fechado da família Penaeidae, como no gênero *Farfantepenaeus* spp., em *Penaeus monodon* Fabricius 1798 e *M. kerathurus* e nos representantes

das famílias Trachypenaeidae e Parapenaeidae (Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Feng et al., 2018; Salti et al., Capítulo I). Em *R. similis*, Bauer e Min (1993) demonstraram que a secreção produzida pela glândula acessória possui a função de um “plug espermático”, vedando o téllico fechado da fêmea e impedindo futuras inseminações, o que pode ser padrão para as espécies que depositam o material na espermateca da fêmea (Bauer e Cash, 1991; Salti et al., Capítulo I). No gênero *Litopenaeus* spp. a glândula acessória é a mais especializada e complexa observada dentro de todas as espécies estudadas da superfamília Penaeoidea e também em Dendrobranchiata, apresentando diversas câmaras produtoras de materiais adesivos que auxiliarão na fixação do espermátóforo ao téllico aberto da fêmea (Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Chow et al., 1991; Fransozo et al., 2016; Salti et al., Capítulo I).

O espermátóforo de Sergestidae, observado em *A. americanus*, *A. marinus*, *A. paraguayensis* e *A. petrunkevitchi* é complexo, formado por cinco camadas de secreção sendo três provenientes do duto espermático, a secreção produzida no duto acessório e a secreção da glândula acessória. Este padrão é semelhante ao observado em Penaeidae, tanto nas espécies de téllico aberto do gênero *Litopenaeus* como nas espécies de téllico fechado, sendo *Farfantepenaeus* spp., *P. monodon* e *M. kerathurus* e também em *Pleoticus muelleri* da família Solenoceridae e *Benthesicymus* sp. pertencente à Benthesicymidae, entretanto, nestes dois últimos grupos, o espermátóforo forma um cordão espermático (Malek e Bawab, 1974; Bauer, 1991; Chow et al., 1991; Bauer e Cash, 1991; Díaz et al., 2002; Fransozo et al., 2016; Feng et al., 2018; Salti et al., Capítulo I). Nas espécies cujas fêmeas apresentam o téllico fechado o espermátóforo é simplificado, apresentando numerosos espermátóforos esféricos, semelhantes aos de Brachyura, como observado em Trachypenaeidae ou somente uma matriz de secreção com espermatozoides, como observado em Sicyoniidae (Bauer, 1991; Bauer e Min, 1993; Salti et al., Capítulo I). As fêmeas de Sergestidae e Luciferidae, por sua vez, possuem o téllico formado com os esternitos XII e XIII e a modificação do coxopodito do terceiro pereiópodo (Pérez-Farfante e Kensley, 1997). A

espermateca ou receptáculo seminal está presente nas fêmeas das famílias Sergestidae e Luciferidae (Hartnoll, 1968b; Xiao e Greenwood, 1993; Pérez-Farfante e Kensley, 1997), sendo que em Luciferidae esta apresenta um par de aberturas que se abrem em uma única abertura (Hartnoll, 1968b).

Até o presente momento, não existe disponível na literatura uma filogenia molecular de Dendrobranchiata, sendo que a maioria dos estudos está focada na superfamília Penaeoidea (Ma et al., 2009; Camargo et al., 2016, 2017; Cheng et al., 2018). Nossos resultados de inferência filogenética demonstraram que Penaeoidea é monofilético enquanto Sergestoidea aparece como parafilética. A família Penaeidae se alocou em um clado, sendo próxima ao clado constituído por Benthescymidae e Aristeidae (este com posição incerta devido à politomia). As famílias Sicyoniidae e Trachypenaeidae são grupos irmãos, formando um clado com Parapenaeidae. Recentemente, Wolfe et al. (2019) propuseram uma filogenia molecular para Decapoda e é possível observar que Aristeidae e Benthescymidae são grupos irmãos, assim como demonstrado no presente trabalho. Sergestidae e Luciferidae também constituem um clado, entretanto, os autores utilizaram poucas espécies para estes grupos, uma vez que o enfoque do mesmo é propor uma árvore evolutiva para Decapoda. Ainda assim, os autores chamam atenção para a família Luciferidae (Wolfe et al., 2019). No filograma apresentado pelos mesmos, é possível observar que o gênero *Lucifer* apresenta o comprimento de ramo muito longo e se aproxima do grupo externo (Wolfe et al., 2019). Os autores ressaltam que esta aproximação pelo grupo externo pode indicar que a posição filogenética de Luciferidae pode estar pouco resolvida e que a análise da morfologia do sistema reprodutor e do espermatozoide é fundamental para tentar solucionar esta problemática (Wolfe et al., 2019). Entretanto, nossos resultados de inferência filogenética demonstram que as relações de parentesco entre Sergestidae e Luciferidae podem apresentar algumas inconsistências, as quais não foram resolvidas por meio da análise do sistema reprodutor, onde este caráter foi homoplásico, observado também em Sicyoniidae. Por outro lado, Vereshchaka et al. (2017)

utilizando diversos caracteres morfológicos propuseram uma filogenia para Sergestoidea e observaram que o gênero *Acetes*, o qual reúne espécies epipelágicas, ficaram agrupadas separadamente de outros gêneros de Sergestidae, como *Lucensosergia* e *Deosergestes* os quais são grupos mesopelágicos. Esta separação dos gêneros corrobora os dados apresentados neste trabalho por meio da filogenia molecular, na qual nota-se a separação de *A. americanus* e *A. petrunkevitchi* das espécies *L. lucens* e *D. corniculum*.

No filograma apresentado no presente trabalho, Sergestoidea aparece como parafilética e pode-se observar que estes grupos apresentam grandes diferenças na morfologia do sistema reprodutor masculino e não encontramos nenhuma característica que englobasse as duas famílias, ou seja, que fosse caracterizada como uma sinapomorfia entre eles. Pérez-Farfante e Kensley (1997) já demonstram que a inclusão de Luciferidae como grupo irmão de Sergestidae pode apresentar problemas. Luciferidae foi incluído em Dendrobranchiata somente por apresentar os náuplios após a eclosão. Em adição, apesar dos representantes de Luciferidae apresentarem o petasma, que é uma característica encontrada também em Penaeoidea, esta estrutura também está presente nos Euphausiacea (Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Em relação às brânquias dendrobranquiadas a qual é a sinapomorfia de Dendrobranchiata, esta não está presente em Luciferidae, sendo que este grupo perdeu as brânquias. Entretanto, a ausência do quarto e quinto par de pereiópodo em Luciferidae os aproxima de Sergestidae, já que esta característica também é observada em *Acetes* (Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Sendo assim, a análise da morfologia do espermatozoide de Luciferidae e Sergestidae pode ser a ferramenta chave para resolver a posição filogenética de Luciferidae, uma vez que há poucas características que o aproximam de Dendrobranchiata e muitas características que o torna muito divergente da subordem. Assim, deve ser dada uma atenção especial ao grupo, principalmente com uso da ferramenta molecular associado a outras ferramentas morfológicas a fim de solucionar esta problemática.

Como exemplo de novas ferramentas morfológicas, a ultraestrutura dos espermatozoides conciliada à filogenia molecular tem se mostrado importante e muitas vezes decisiva, como ocorreu em Penaeoidea (Camargo et al., 2017). Neste trabalho, as principais características observadas no espermatozoide de Dendrobranchiata, as quais são praticamente compartilhadas por todas as espécies aqui estudadas, em combinação com os dados disponíveis na literatura, indicam que a presença de cromatina filamentososa e ausência do envoltório nuclear são amplamente compartilhadas dentro do grupo (Medina, 1995a, 1995b; Scelzo e Medina, 2004; Kang et al., 2008; Camargo et al., 2017). Apesar da perda do envelope nuclear ter sido considerada uma simplesiomorfia em Dendrobranchiata, esta pode ser considerada somente para Sergestoidea (Medina, 1995b), uma vez que o envoltório nuclear encontra-se completamente íntegro ou parcialmente fragmentado em Trachypenaeidae e Sicyoniidae (Camargo et al., 2016, 2017), portanto sendo uma autapomorfia deste grupo, uma vez que constituem um clado. Possivelmente a plesiomorfia de Dendrobranchiata é o espermatozoide arredondado a elíptico, apresentando pequenas vesículas citoplasmáticas ou nucleocitoplasmáticas, como observado nas espécies estudadas no presente trabalho e também em outros sergestóideos *E. arcticus*, *A. petrunkevitchi* e em *Aristaeomorpha foliaceae* (Risso, 1827) da família Aristeidae em Penaeoidea (Medina, 1995a, 1995b). Além destas espécies, em *Benthescymus* sp. também foi observada a morfologia arredondada, porém, devido ao poder de resolução do microscópio de luz, não é possível confirmar a presença de vesículas lúcidas ou confirmar a presença ou ausência da vesícula acrossomal (Salti et al., Capítulo I). A ausência de vesícula acrossomal, observada em *B. faxoni* estudada no presente trabalho, em *E. arcticus*, em *Ari. foliaceae* parece ser a característica plesiomórfica em Dendrobranchiata. Desta maneira, a presença de vesícula acrossomal pode ser considerada uma característica homoplásica em Dendrobranchiata, sendo a morfologia arredondada a mais plesiomórfica, ocorrendo em *Acetes* spp. e *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) em Penaeoidea (Medina, 1995b). Contudo, a ultraestrutura do espermatozoide em Luciferidae mostra certa semelhança com a ordem Euphausiacea. As diferenças

entre esta ordem e Luciferidae foram a cápsula externa à membrana plasmática e o material nucleocitoplasmático granular (Medina et al., 1998). Assim, nos parece que *B. faxoni*, devido ao aspecto fibroso do material genético e às poucas vesículas eletrônicas, o que também é comum em Sergestoidea e Penaeoidea, merece ainda ser tratado como Dendrobranchiata. Somente com o aumento dos estudos ultraestruturais e moleculares com mais espécies de Luciferidae será possível preencher as lacunas para as dúvidas levantadas na literatura sobre a posição filogenética desta família (Wolfe et al., 2019)

A vesícula acrossomal constituída por capuz acrossomal e espinho longo ou curto, observada em Penaeidae, Solenoceridae, Parapenaeidae, Trachypenaeidae e Sicyoniidae é um caráter homoplásico (Kleve et al., 1980; Medina et al., 1994a; Medina, 1995a, 1995b; Medina et al., 2006b; Camargo et al., 2016, 2017). Assim, a sinapomorfia para a vesícula acrossomal de Penaeidae é apresentar capuz acrossomal simétrico com espinho reto longo ou curto (Dougherty e Dougherty, 1989; Krol et al., 1992; Medina et al., 1994; Alfaro, 2007; Alfaro et al., 2017; Kang et al., 2008; Fransozo et al., 2016; Camargo et al., 2017). O capuz acrossomal de Penaeidae pode apresentar uma região côncava, na qual o material subacrossomal fica alojado, característica compartilhada por *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765), *Litopenaeus*, *Melicertus* e *Penaeus* (Medina 1994; Pongtippatee et al. 2007; Kang et al. 2008; Camargo et al., 2017), sendo esta ausente em *Farfantepenaeus*, *Marsupenaeus* e aparentemente em *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837 [in Milne Edwards, 1834-1840]) devido a baixa resolução das imagens disponíveis (Mohamed e Diwan, 1993; Medina et al. 1994, Camargo et al., 2017). Desta maneira, devido a estas características da vesícula acrossomal e do sistema reprodutor masculino de *Litopenaeus*, *Farfantepenaeus*, *Melicertus*, *Fenneropenaeus* e *P. monodon* (Salti et al., capítulo I) ocorrerem diversas vezes nos diferentes gêneros e, provavelmente no mesmo gênero, não nos parece adequada a proposta de restauração do gênero *Penaeus* baseado somente na filogenia molecular (Ma et al., 2011).

Em Solenoceridae a característica exclusiva é a vesícula acrossomal com o capuz acrossomal assimétrico também com o espinho reto (Medina et al., 2006b). A família Parapenaidae apresenta a vesícula acrossomal com o capuz acrossomal simétrico, porém este apresenta uma protuberância central projetada em direção ao citoplasma subacrossomal e também o espinho reto (Medina, 1994; Scelzo e Medina, 2003; Camargo et al., 2017). A característica compartilhada em Trachypenaidae, considerada a sinapomorfia, é a vesícula acrossomal apresentar um espinho delgado, longo e curvo, detectado tanto por microscopia eletrônica de transmissão e varredura, e o capuz acrossomal simétrico (Bauer e Min, 1993; Alfaro et al., 2003; Camargo et al., 2017). Em Sicyoniidae, por sua vez, o capuz acrossomal pode apresentar duas morfologias distintas, sendo o espinho reto e simétrico em *S. typica* e *Sicyonia carinata* (Brunnich, 1768) (Medina, 1994; Camargo et al., 2016) enquanto em *Sicyonia ingentis* ocorre esta mesma morfologia, porém o capuz acrossomal é extremamente delgado e em *Sicyonia dorsalis* o espinho é reduzido com a vesícula acrossomal volumosa e longa (Kleve et al., 1980; Medina, 1994a; Camargo et al., 2016). Contudo a principal sinapomorfia em Sicyoniidae é a região subacrossomal muito complexa (Kleve et al., 1980; Scelzo e Medina, 2003, 2004; Medina et al., 2006a; Camargo et al., 2016).

Outra característica somente encontrada em *Acetes* é a câmara perforatorial ou *perforatorium*, como descrito pela primeira vez em *A. petrunkevitchi* (Scelzo e Medina, 2004). Embora a estrutura da câmara perforatorial das amostras provenientes de museu não tenha sido fixadas de maneira adequada, para a microscopia eletrônica de transmissão, o que pode levar a alterações de formato, a sua presença é confirmada. Apesar destes artefatos, tanto a câmara perforatorial como a vesícula acrossomal apresentam a maior diferença em número de caracteres entre *A. petrunkevitchi* e as demais espécies de *Acetes*, como *A. americanus*, *A. marinus* e *A. paraguayensis*, sendo, talvez, a maior divergência na ultraestrutura do espermatozoide observada em espécies do mesmo gênero dentro de crustáceos Decapoda. Apesar de Camargo et al. (2016) demonstrarem que *S. dorsalis* apresenta algumas características bastante distintas das demais

espécies de *Sicyonia* descritas, estas são menos acentuadas quando comparado com as diferenças encontradas no presente trabalho para o gênero *Acetes*. Em *A. petrunkevitchi* destaca-se ao menos dez caracteres distintos das demais espécies de *Acetes*, enquanto que em *A. americanus*, *A. marinus* e *A. paraguayensis* diferenciam-se entre si principalmente pela camada interna do acrossomo e tamanho do espermatozoide, o que parece estar em acordo com os trabalhos realizados com a ultraestrutura em espécies do mesmo gênero ou gêneros próximos (Klaus et al., 2009; Tiseo et al., 2017; Assugeni et al., 2017; Garcia-Bento et al., 2018; Camargo et al., 2017, 2020).

A vesícula acrossomal de *A. petrunkevitchi* apesar de lembrar muito a observada em Brachyura, e devido a isso possui uma terminologia similar (Scelzo e Medina, 2004), apresenta a zona acrossomal interna e externa, além da protuberância apical, vesículas nucleocitoplasmáticas eletrondensas distribuídas de maneira aleatória como características completamente ímpares para figurar no mesmo gênero. Vereshchaka et al. (2015) por meio da morfologia do petasma, parte modificada da antena I (órgão enganchador) e fotóforos, demonstraram a monofilia do clado formado entre o gênero monotípico *Peisos* e *Acetes*. Sendo assim, *P. petrunkevitchi* foi incluído no gênero *Acetes* (Vereshchaka et al., 2015). Como observado no presente trabalho, a morfologia do sistema reprodutor de *A. petrunkevitchi* e das demais espécies de *Acetes*, como *A. americanus*, *A. marinus* e *A. paraguayensis*, são similares, mas não idênticas como para *A. americanus*, *A. marinus* e *A. paraguayensis*. Sendo assim, a complexa morfologia do espermatozoide de *A. petrunkevitchi* não nos parece justificar a sua inclusão no gênero *Acetes*, uma vez que o espermatozoide de *A. americanus*, *A. marinus* e *A. paraguayensis* se assemelham mais com o descrito para outro gênero, *Eusergestes*, do que com *A. petrunkevitchi*. O espermatozoide de *Eusergestes* apresenta somente duas diferenças em relação a *A. americanus*, *A. marinus* e *A. paraguayensis*, sendo a ausência de vesícula acrossomal e o material citoplasmático não se mistura com o nucleoplasma. Desta maneira, a inclusão de *Peisos* em *Acetes* nos parece duvidosa e mostra a necessidade de uma análise

molecular a fim de solucionar esta problemática taxonômica, para comprovar ou não a dúvida aqui levantada.

Neste trabalho nós caracterizamos pela primeira vez, o sistema reprodutor masculino para representantes de Sergestidae e Luciferidae, as quais compõem a superfamília Sergestoidea. Este trabalho é fundamental para entendermos como ocorreu a evolução deste sistema em Dendrobranchiata, uma vez que, até o momento, esta a morfologia era praticamente desconhecida para Sergestoidea e bem descrita em parte de Penaeoidea, principalmente Penaeidae. Além disso, foram acrescentados dados importantes para a ultraestrutura do espermatozoide, levantando dúvidas sobre a inclusão do gênero *Peisos* em *Acetes*. Assim, o ancestral hipotético de Dendrobranchiata possivelmente apresentava o vaso deferente com dois dutos, como Sergestidae, Aristeidae, Benthescymidae, Solenoceridae e Penaeidae. Este ainda provavelmente possuía a morfologia da glândula acessória simplificada, com somente uma câmara, observada em Sergestidae, *Farfantepenaeus* spp. (Penaeidae) e nas famílias Trachypenaeidae e Parapenaeidae e deveria apresentar o espermatóforo complexo, assim como Sergestidae, Benthescymidae, Solenoceridae, Penaeidae e Trachypenaeidae. Em relação ao espermatozoide, este deveria ser arredondado, com ausência de envoltório nuclear, permitindo a mistura do material nuclear com o citoplasmático, sendo a cromatina fibrilar, o que é observado em todos os Dendrobranchiata conhecidos, e a vesícula acrossomal ausente, observada em algumas espécies de Luciferidae, Sergestidae e Aristaidae. Desta maneira, fica claro que existe a necessidade de esclarecer as relações de parentesco de Sergestoidea, principalmente Luciferidae, e buscar características compartilhadas entre Dendrobranchiata e Pleocyemata para a reconstrução do ancestral em Decapoda.

Referências Bibliográficas

Alfaro, J. M., Ulate, K., Vargas, M. 2007. Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). *Aquaculture*. 270:436-442.

Alfaro, J. M., Braga, A., Vargas, M., Umanã-Castro, R. 2017. Ultrastructural demonstration of the model of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae) male sexual maturation and spermatozoa capacitation. *Invertebr. Reprod. Dev.* 61:9-17.

Assugeni, C. O., Magalhães, T., Bolaños, J. A., Tudge, C. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. 2017. Ultrastructure of spermatozoa of spider crabs, family Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura): Integrative analyses based on morphological and molecular data. *J. Morphol.* 278:1628-1646.

Bauer, R. T. 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimps: a functional and phylogenetic perspective. *Crustac. Sexual Biol.* 183-207.

Bauer, R. T., Cash, C. E. 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 110:144-162.

Bauer, R. T., Min, L. J. 1993. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): formation in the male reproductive tract and disposition in their seminated female. *Biol. Bull.* 185:174-185.

Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. 2016. Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology.* 135:67-81.

Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. 2017. Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod. Struct. Dev.* 46:588-600.

Camargo, T. R., Wolf, M. R., Mantelatto, F. L., Tudge, C., Zara, F. J. 2020. Ultrastructure of spermatozoa of members of Calappidae, Aethridae and Menippidae and discussion of their phylogenetic placement. *Acta Zool.* 101:89-100.

Cheng, J., Chan, T. Y., Zhang, N., Sun, S., Sha, Z. L. 2018. Mitochondrial phylogenomics reveals insights into taxonomy and evolution of Penaeoidea (Crustacea: Decapoda). *Zool. Scr.* 47:582-594.

Chow, S. Dougherty, M. M., Dougherty, W. J., Sandifer, P. A. 1991. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *J. Crustac. Biol.* 11:201-216.

Díaz, A. C., Fernandez-Gimenez, A. V., Petriella, A. M., Fenucci, J. L. 2002. Morphological and functional study of the male reproductive tract in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea). *Invertebr. Repr. Dev.* 42:69–74.

Dougherty, W. J., Dougherty, M. M. 1989. Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm and spermatophores of pond-cultured shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Invert. Pathol.* 54:331-343.

Feng, T., Paterson, B., Johnston, S. 2018. A morphological study of the male reproductive tract, post-testicular acrosome maturation and spermatophore formation in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *J. Morphol.* 279:1290-1300.

Fransozo, V., Fernandes, A. B., Lopez-Greco, L. S., Zara, F. J., Santos, D. C. 2016. Functional morphology of the male reproductive system of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) (Crustacea, Penaeoidea) compared to other *Litopenaeus*. *Invertebr. Repr. Dev.* 60:161-174.

Garcia-Bento, M. A., Miranda, I., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. 2018. Comparative spermatozoal ultrastructure and molecular analysis in dromiid crabs and their phylogenetic implications for Dromiidae and Podotremata (Decapoda: Brachyura). *Arthropod. Struct. Dev.* 47:627-642.

Glez-Peña, D., Gomez-Blanco, D., Reboiro-Jato, M., Fdez-Riverola, F., Posada, D. 2010. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids. Res.* 38:14-18.

Guindon, S., Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696-704.

Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Hartnoll, R. G. 1968. The female reproductive organs of *Lucifer* (Decapoda, Sergestidae). *Crustaceana.* 15:263-271.

Junqueira, L. C. U., Junqueira, L. M. M. S. 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos.

Kang, X., Ge, S., Guo, M., Liu, G., Mu, S. 2008. A transmission electron microscopy investigation: the membrane complex in spermatogenesis of *Fenneropenaeus chinensis*. *Cytotechnology.* 56:113-121.

Klaus, S., Schubart, C. D., Brandis, D. 2009. Ultrastructure of spermatozoa and spermatophores of old world freshwater crabs (Brachyura: Potamoidea: Gecarcinucidae, Potamidae, and Potamonautidae). *J. Morphol.* 270:175-193.

Kleve, M. G., Yudin, A. I., Clark Jr., W. H. 1980. Fine structure of the unistellate sperm of the shrimp, *Sicyonia ingentis* (Natantia). *Tissue Cell.* 12:29-45.

Krol, R. M., Hawkins, W. E., Overstreet, R. M. 1992. Reproductive components. In: Harrison, F. W., Humes, A. G. (Eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates.* Wiley-Liss Inc. New York. 295-343.

Ma, K. Y., Chan, T. Y., Chu, K. H. 2009. Phylogeny of penaeoid shrimps (Decapoda: Penaeoidea) inferred from nuclear protein-coding genes. *Mol. Phylogenetics Evol.* 53:45-55.

Maddison, W. P., Maddison, D. R. 2015. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. Retrieved from: <http://mesquiteproject.org>

Malek, S. R. A., Bawab, F. M. 1974. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775) (Decapoda, Penaeidae): The initial formation of a sperm mass. *Crustaceana*. 26:273-285.

Medina, A., Mourente, G., Lopez de la Rosa, I., Santos, A., Rodriguez, A. 1994. Spermatozoal ultrastructure of *Penaeus kerathurus* and *Penaeus japonicas* (Crustacea, Dendrobranchiata). *Zoomorphology*. 114:161-167.

Medina, A. 1995a. Spermatozoal ultrastructure in Dendrobranchiata (Crustacea, Decapoda): taxonomic and phylogenetic considerations. In Jamieson, B. G. M., Ausio, J. and Justine, J.-L. (Eds): *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. 166:231-242.

Medina A. 1995b. The atypical sperm morphologies of *Aristeus antennatus* and *Aristaeomorpha foliacea* (Crustacea, Dendrobranchiata, Aristeidae) and their phylogenetic significance. In: Jamieson BGM, Ausio J, Justine JL, editors. *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. *Mém. Mus. natl. hist. nat.* 166:243-250.

Medina, A., Vila, Y., Santos, A. 1998. The sperm morphology of the euphausiid *Meganyctiphanes norvegica* (Crustacea, Eucarida). *Invertebr. Reprod. Dev.* 34:65-68.

Medina, A., Garcia-Isarch, E., Sobrino, I., Abascal, F. J. 2006a. Ultrastructure of the spermatozoa of *Aristaeopsis edwardsiana* and *Aristeus varidens* (Crustacea, Dendrobranchiata, Aristeidae). *Zoomorphology*. 125:39-46.

Medina, A., Scelzo, M. A., Tudge, C. 2006b. Spermatozoal Ultrastructure in Three Atlantic Solenocerid Shrimps (Decapoda, Dendrobranchiata). *J. Morphol.* 267:300-307.

Mello, M. L. S., Vidal, B. C., 1980. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo, Brasil.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1-8.

Mohamed, K. S., Diwan, A. D. 1993. Spermatogenesis and spermatophore formation in the Indian white prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *J. Mar. Biol. Ass. India*. 35:180-192.

Oliveira, L. J. F., Zara, F. J. 2018. An investigation into the male reproductive system of two freshwater crabs from the Amazon: is there a sperm plug or packet formation? *Mar. Freshw. Behav. Phy.* 51: 227-249.

Omori, M. 1975. The systematics, biogeography, and fishery of epipelagic shrimps of the genus *Acetes* (Crustacea, Decapoda, Sergestidae). *Bull. Ocean Res.* 7:1-91.

Pérez-Farfante, I., Kensley, B. 1997. Penaeoid and Sergestoid shrimp and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. *Mém. Mus. natl. hist. nat.* 175:1-233.

Pongtippatee, P., Vanichviriyakit, R., Chavadej, J., Plodpai, P., Pratoomchart, B., Sobhon, P., Withyachumnarnkul, B. 2007. Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae). *Aquac. Res.* 38:1635-1644.

Rambaut, A., Drummond, A. J. 2009. FigTree version 1.3. 1. Website <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, last accessed October, 21, 2018.

Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J., Lawrence, A. L. 1990. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1–3. *J. Fish. Biol.* 10:455-468.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference undermixed models. *Bioinformatics.* 19:1572-1574.

Scelzo, M., Medina, A. 2003. Spermatozoal ultrastructure in *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae). *J. Crustac. Biol.* 23:814-818.

Scelzo, M., Medina, A. 2004. A Dendrobranchiate, *Peisos petrunkevitchi* (Decapoda Sergestidae) with reptant like sperm: a spermiocladistic assesement. *Acta Zool.* 85:81-89.

Simões, S. M., Castilho, A. L., Fransozo, Negreiros-Fransozo, M. L., Costa, R. C. A. 2013. Distribution related to temperature and salinity of the shrimps *Acetes americanus* and *Peisos petrunkevitchi* (Crustacea Sergestoidea) in the south-eastern Brazilian littoral zone. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 93:753-759.

Subramoniam, T. 1995. Light and electron microscopic studies on the seminal secretions and the vas deferens of the penaeioid shrimp, *Sicyonia ingentis*. J. Biosci. 20:691-706.

Teodoro, S. S. A., Fransozo, M. L. N., Simões, S. M., Lopes, M., Costa, R. 2012. Population ecology of the planktonic shrimp *Lucifer faxoni* Borradaile, 1915 (Crustacea, Sergestoidea, Luciferidae) on the southeastern coast of Brazil. Braz. J. Ocean. 60:245-253.

Tiseo, G. R., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. 2017. Ultrastructure of spermatophores and spermatozoa of intertidal crabs *Pachygrapsus transverses*, *Pachygrapsus gracilis* and *Geograpsus lividus* (Decapoda: Grapsidae). Zool. Anz. 269:166-176

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids. Res. 22:4673-4680.

Vereshchaka, A. L., Olesen, J., Lunina, A. 2014. Global diversity and phylogeny of pelagic shrimps of the former genera *Sergestes* and *Sergia* (Crustacea, Dendrobranchiata, Sergestidae), with definition of eight new genera. PLoS One, 9(11):e112057.

Vereshchaka, A. L., Lunina, A. A. 2015. Phylogeny and taxonomy of the enigmatic genus *Petalidium* (Decapoda, Sergestidae), with biological remarks. Zool. J. Linnean Soc. 174:459-472.

Vereshchaka, A. L., Lunina, A. A., Olesen, J. 2015. Phylogeny and classification of the shrimp genera *Acetes*, *Peisos*, and *Sicyonella* (Sergestidae Crustacea: decapoda). Zool. J. Linnean Soc. 177:353-377.

Vereshchaka, A. L., Olesen, J., Lunina, A. A. 2016. A phylogeny-based revision of the family Luciferidae (Crustacea: Decapoda). Zool. J. Linn. Soc. 178:15-32.

Vereshchaka, A. L. 2017. The shrimp superfamily Sergestoidea: a global phylogeny with definition of new families and an assessment of the pathways into principal biotopes. R. Soc. Open. Sci. 4:170221.

Xiao, Y., Greenwood, J. G. 1993. The biology of *Acetes* (Crustacea, Sergestidae) Oceanogr. Mar. Biol. 31:259-444.

Wolfe, J. M., Breinholt, J. W., Crandall, K. A., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., Timm, L. E., Siddall, M. E., Bracken-Grissom, H. D. 2019. A phylogenomic framework, evolutionary timeline and genomic resources for comparative studies of decapods crustaceans. Proc. R. Soc. B. 286:20190079.

TABELAS

Tabela 1. Código de acesso do GenBank das sequências concatenadas dos genes 16S rDNA e COI utilizadas neste estudo.

Espécies	Família/Tribo	COI	16S
<i>Rimapenaeus constrictus</i>	Trachypenaeni	KF783863.1	KT959496.1
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>		KX196599.1	AF192093.1
<i>Parapenaepsis cornuta</i>		KP072694.1	KP059284
<i>Parapenaepsis stylifera</i>		KF613003.1	HF674732.1
<i>Artemesia longinaris</i>	Parapenaeni	KF572115.1	MF490228.1
<i>Parapenaeus sextuberculatus</i>		KP072693.1	KP059283.1
<i>Parapenaeus fissuroides</i>		KR738732.1	KR738736.1
<i>Parapenaeus americanus</i>		KP072655.1	KP059267.1
<i>Farfantepenaeus duorarum</i>	Penaeini	MH087613.1	AF279812.1
<i>Farfantepenaeus aztecus</i>		KU906027.1	AF192051.1
<i>Litopenaeus setiferus</i>		MH087517.1	AF279819
<i>Penaeus monodon</i>		MF563565.1	MF563557.1
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>		KF989421.1	AF192053.1
<i>Melicertus kerathurus</i>		JQ623953.1	AF279826
<i>Litopenaeus schmitti</i>		KX196596.1	AF192086.1
<i>Litopenaeus vannamei</i>		AY781297.1	AF192089.1
<i>Sicyonia dorsalis</i>	Sicyoniidae	KX196550.1	AY601740.1
<i>Sicyonia typica</i>		KX196577.1	KX196537.1
<i>Sicyonia burkenroadi</i>		KX196545.1	AY601741
<i>Sicyonia carinata</i>		KX196547.1	KX196475
<i>Sicyonia picta</i>		KX196575.1	KT935432.1
<i>Sicyonia mixta</i>		KX196568.1	KT935438.1
<i>Sicyonia martini</i>		KX196566.1	KT935441.1

Espécies	Família/Tribo	COI	16S
<i>Pleoticus muelleri</i>	Solenoceridae	KY233184.1	LC121754.1
<i>Hymenopenaeus equalis</i>		KX530789.1	KX530793
<i>Solenocera koelbeli</i>		KU877967.1	KU877984
<i>Solenocera membranacea</i>		JQ305939.1	FR849633.1
<i>Aristaeopsis edwardsiana</i>	Aristeidae	-	AY601734.1
<i>Aristaeomorpha foliacea</i>		JQ305888.1	LC466633.1
<i>Gennadas bouvieri</i>	Benthesicymidae	MH572680.1	-
<i>Gennadas valens</i>		MH572544.1	MH543000.1
<i>Bentheogennema intermedia</i>		MH572671.1	-
<i>Acetes americanus</i>	Sergestidae	KX196595.1	KX196538
<i>Acetes petrunkevitchi</i>		KX196598.1	KX196540
<i>Deosergestes corniculum</i>		MF197258.1	MF197226.1
<i>Lucensosergia lucens</i>		AB826490.1	AB705159.1
<i>Belzebub faxoni</i>	Luciferidae	KY449064.1	-
<i>Belzebub hanseni</i>		KF977291.1	-
<i>Belzebub intermedius</i>		KF977294.1	-
<i>Lucifer typus</i>		GU183792.1	-
Outgroup			
<i>Stenopus hispidus</i>		MF490041.1	MF490146.1
<i>Dromia erythropus</i>		MF490082.1	MF490178.1
<i>Uca maracoani</i>		LC087974.1	KT279699.1
<i>Euphasia krohni</i>		AY601083.1	MG677869.1

Tabela 2. Matriz com os estados dos caracteres morfológicos “vaso deferente”, sendo simples (1) e complexo (2), “glândula acessória da ampola”, sendo ausente (0), simples (1) e complexa (2) e “espermatóforo”, sendo simples (1), unidades esféricas (2) e complexo (3). O (*) refere-se à espécie inclusa somente no mapeamento dos caracteres.

Espécies	Família/Tribo	Vaso deferente	Glândula acessória	Espermatóforo
<i>Rimapenaeus constrictus</i>	Trachypenaeini	1	1	4
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>		1	1	4
<i>Parapenaeopsis cornuta</i>		?	?	?
<i>Parapenaeopsis stylifera</i>		?	?	?
<i>Artemesia longinaris</i>	Parapenaeini	1	1	2
<i>Parapenaeus sextuberculatus</i>		?	?	?
<i>Parapenaeus fissuroides</i>		?	?	?
<i>Parapenaeus americanus</i>		1	1	2
<i>Farfantepenaeus duorarum</i>	Penaeini	2	1	3
<i>Farfantepenaeus aztecus</i>		2	1	3
<i>Litopenaeus setiferus</i>		2	2	3
<i>Penaeus monodon</i>		2	?	?
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>		2	1	3
<i>Melicertus kerathurus</i>		2	1	3
<i>Litopenaeus schmitti</i>		2	2	3
<i>Litopenaeus vannamei</i>		2	2	3
<i>Sicyonia dorsalis</i>	Sicyoniidae	1	0	1
<i>Sicyonia typica</i>		1	0	1
<i>Sicyonia burkenroadi</i>		?	?	?
<i>Sicyonia carinata</i>		?	?	?
<i>Sicyonia picta</i>		?	?	?
<i>Sicyonia mixta</i>		?	?	?
<i>Sicyonia martini</i>		?	?	?
<i>Pleoticus muelleri</i>	Solenoceridae	2	0	3
<i>Hymenopenaeus equalis</i>		?	?	?
<i>Solenocera koelbeli</i>		?	?	?
<i>Solenocera crassicornis</i>		?	?	?
<i>Solenocera membranacea</i>		?	?	?
<i>Aristaeopsis edwardsiana</i>	Aristeidae	2	0	?
<i>Aristaeomorpha foliacea</i>		?	?	?
<i>Gennadas bowieri</i>	Benthescymidae	?	?	?
<i>Gennadas valens</i>		?	?	?
<i>Benthescymus</i> sp. (*)		2	0	3
<i>Acetes americanus</i>	Sergestidae	2	1	3
<i>Acetes petrunkevitchi</i>		2	1	3
<i>Lucensosergia lucens</i>		?	?	?
<i>Deosergestes corniculum</i>		?	?	?
<i>Belzebub faxoni</i>	Luciferidae	1	0	1
<i>Belzebub hanseni</i>		?	?	?
<i>Belzebub intermedius</i>		?	?	?
<i>Lucifer typus</i>		?	?	?

Tabela 3. Comparação dos caracteres ultraestruturais do espermatozoide entre espécies de Sergestoidea estudadas no presente trabalho e disponíveis na literatura científica.

Características do espermatozoide	Luciferidae	Sergestidae			
	<i>Belzebub faxoni</i>	<i>Acetes americanus</i>	<i>Acetes marinus</i>	<i>Acetes paraguayensis</i>	<i>Acetes petrunkevitchi</i>
Formato	Arredondado a elipsóide	Arredondado a elipsóide	Arredondado a elipsóide	Arredondado a elipsóide	Ovóide a fusiforme^{1*}
Material genético	Nucleocitoplasmático	Nucleocitoplasmático	Nucleocitoplasmático	Nucleocitoplasmático	Nucleocitoplasmático ¹
Distribuição da cromatina	Compacta e fibrosa	Compacta e fibrosa	Fibrosa	Fibrosa	Descondensada e granular^{1*}
Distribuição das vesículas	Periferia	Periferia	Periferia	Periferia	Distribuídas no nucleocitoplasma^{1*}
Quantidade de vesículas	Poucas	Muitas	Muitas	Muitas	Muitas ¹
Eletrondensidade das vesículas	Eletronlúcidas	Eletronlúcidas	Eletronlúcidas	Eletronlúcidas	Eletrondensas^{1*}
Vesícula acrossomal	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente ¹
Tamanho da vesícula acrossomal	-	Pequena	Pequena	Pequena	Grande^{1*}
Classificação da zona interna do acrossoma	-	Simples	Simples	Simples	Complexa^{1*}
Zona externa do acrossoma	-	Homogênea	Homogênea	Homogênea	Heterogênea^{1*}
Câmara perforatorial	-	Presente	Presente	Presente	Presente ¹
Formato da câmara perforatorial	-	Arredondada	Alongada	Alongada	Alongada^{1*}
Volume da câmara perforatorial em relação ao acrossoma	-	Grande	Grande	Grande	Pequeno^{1*}
Protuberância apical	-	Ausente	Ausente	Ausente	Presente^{1*}

Presente trabalho; ¹ Scelzo e Medina (2004)

Características que se diferem entre as espécies estão representadas pelo símbolo (*)

FIGURAS E LEGENDAS

Figura 1. Sistema reprodutor masculino de Luciferidae. **A.** Vista geral do sistema reprodutor masculino de *Belzebub faxoni* com testículos e vaso deferente do animal em corte longitudinal. Coloração: HE. **B.** PVD com epitélio simples e cúbico e espermatozoides livres no lúmen. Coloração: HE. **C.** Vista geral da MVD apresentando um único duto com espermatozoides sendo concentrados em uma margem do lúmen pela secreção acidófila. Coloração: HE. **D.** Detalhe da compactação dos espermatozoides no MVD de *B. faxoni* devido a secreção acidófila (seta preta) com aspecto coagulado e heterogêneo. Coloração: HE. **E.** Dilatação da ampola terminal de *B. faxoni* apresentando somente a extensão da DVD com maior volume secreção que na região média. Nota-se que o vaso deferente é duto simples contendo espermatozoides imersos em secreção acidófila. Coloração: HE. **F.** Técnica de PAS evidenciando o caráter fracamente positivo para polissacarídeos neutros da secreção luminal. **G.** Secreção luminal que compacta os espermatozoides intensamente reativa para proteínas. Coloração: Xylidine ponceau.

at= ampola terminal; c= cutícula; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; mc= musculatura; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; sz= espermatozoide; s= secreção; t= testículo; vd= vaso deferente.

Fig. 1

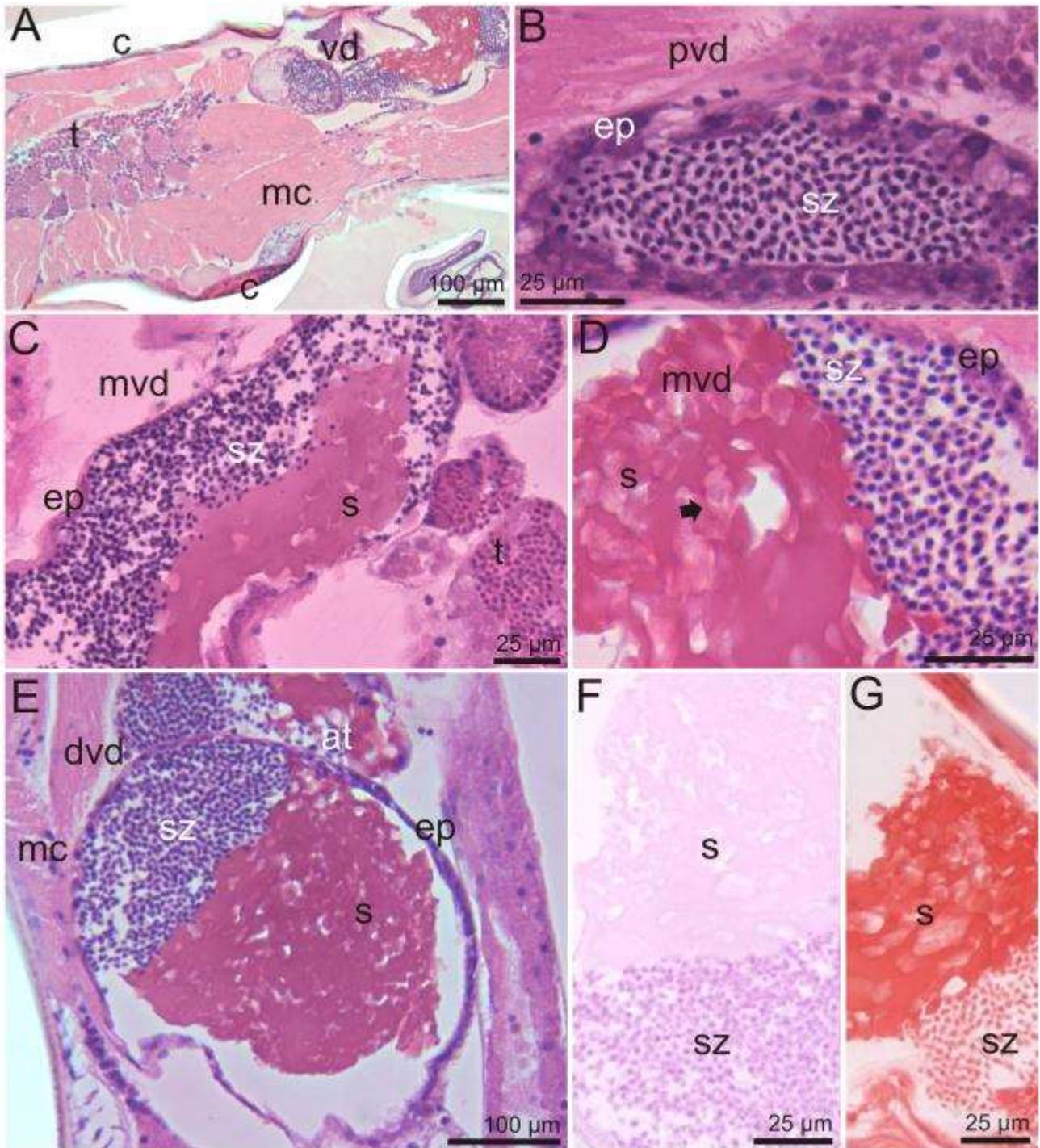


Figura 2. Sistema reprodutor masculino de *Acetes americanus* – Sergestidae. **A.** Anatomia do sistema reprodutor masculino de *A. americanus* formado por testículos e vaso deferente. **B.** PVD com um só ducto preenchido por espermatozoides livres circundados por secreção acidófila. Coloração: HE. **C.** MVD de *A. americanus* subdividido em dois ductos: acessório e espermático. Coloração: HE. **D.** Detalhe do ducto espermático mostrando os espermatozoides imersos na secreção do tipo I fortemente basófila (seta preta). Coloração: HE. **E.** Detalhe do ducto acessório contendo secreção acidófila com grânulos menos intensamente corados (seta preta). Coloração: HE. **F.** Ampola terminal de *A. americanus*. Nota-se a extensão dos ductos acessório e espermático e a glândula acessória com câmara única. Coloração: HE. **G.** Detalhe do ducto espermático na ampola com o primórdio do espermatóforo de *A. americanus* formado por três secreções, sendo a tipo I fortemente basófila, a tipo II acidófila e a tipo III, mais externa, compacta e intensamente acidófila. Coloração: HE. **H.** Detalhe da glândula acessória contendo secreção fortemente acidófila e homogênea, circundada por uma espessa camada de musculatura. Coloração: HE. **I.** Técnica de Xylidine ponceau para detecção de proteínas, na qual a secreção da glândula é positiva (cabeça de seta), a secreção do ducto acessório é fortemente positiva (seta preta) e no ducto espermático, a tipo I e III são reativas. **J.** Ausência de reação para polissacarídeos neutros da secreção da glândula acessória e pequena reatividade para a secreção do ducto acessório e espermático. Coloração: PAS.

ad= ducto acessório; at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; gl=glândula; mc= musculatura; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; sd= ducto espermático; sz= espermatozoide; s= secreção; s1= secreção do tipo I; s2= secreção do tipo II; s3= secreção do tipo III; t= testículo.

Fig. 2

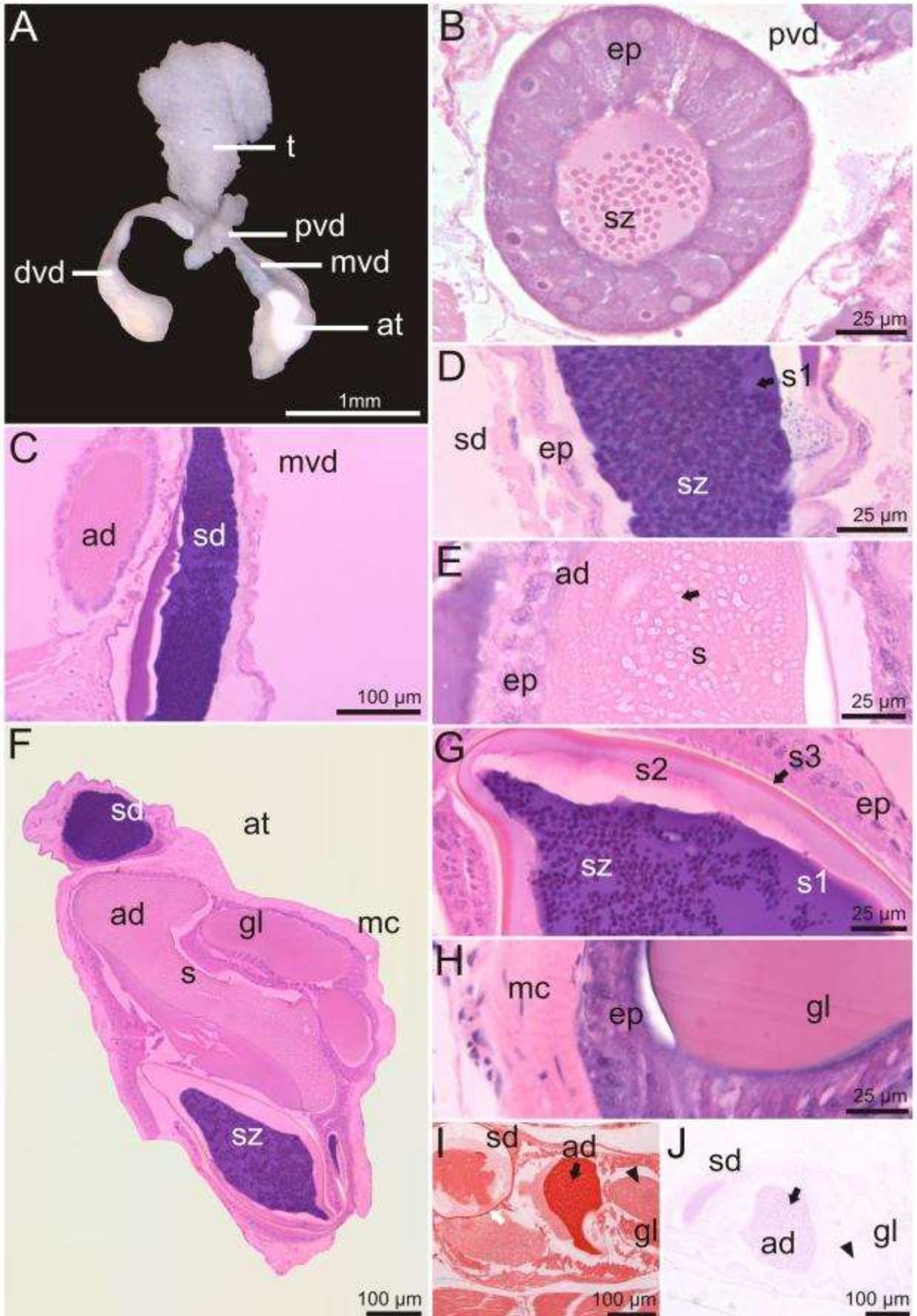


Figura 3. Sistema reprodutor masculino de *Acetes marinus* – Sergestidae. **A.** Anatomia do sistema reprodutor masculino de *A. marinus*, o qual é constituído de testículo e vaso deferente pareados. **B.** PVD apresentando somente um ducto com espermatozoides livres em pequena quantidade de secreção acidófila (cabeça de seta). Coloração: HE. **C.** MVD subdividido em dois ductos: acessório e espermático. Nota-se o epitélio simples e cúbico em ambos. Coloração: HE. **D.** Detalhe da MVD mostrando o ducto acessório preenchido por secreção acidófila recoberta por delgada camada basófila (seta branca) e separado do ducto espermático por tecido conjuntivo (seta preta). No ducto espermático encontram-se os espermatozoides imersos em secreção acidófila, a tipo I. Coloração: HE. **E.** Ampola terminal apresentando a continuação dos ductos espermático e acessório, porém com glândula acessória simples. Coloração: HE. **F.** Primórdio do espermatóforo no ducto espermático. Nota-se a secreção tipo I acidófila, onde os espermatozoides estão imersos, a tipo II fortemente acidófila (seta preta) e a tipo III, delgada formando uma cápsula (seta branca). Coloração: HE. **G.** Detalhe da glândula acessória de *A. marinus* contendo secreção acidófila e homogênea, envolta por secreção basófila (seta preta). Coloração: HE. **H.** Técnica de Xylidine ponceau evidenciando o caráter proteico das secreções dos ductos acessório, espermático e da glândula. **I.** Reação fortemente positiva da secreção do ducto acessório para polissacarídeos neutros, sendo este composto ausente para as demais secreções dos ductos e glândula, Coloração: PAS.

ad= ducto acessório; at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; gl=glândula; mc= musculatura; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; sd= ducto espermático; sz= espermatozoide; s= secreção;s1= secreção do tipo I; s2= secreção do tipo II; s3= secreção do tipo III; t= testículo.

Fig. 3

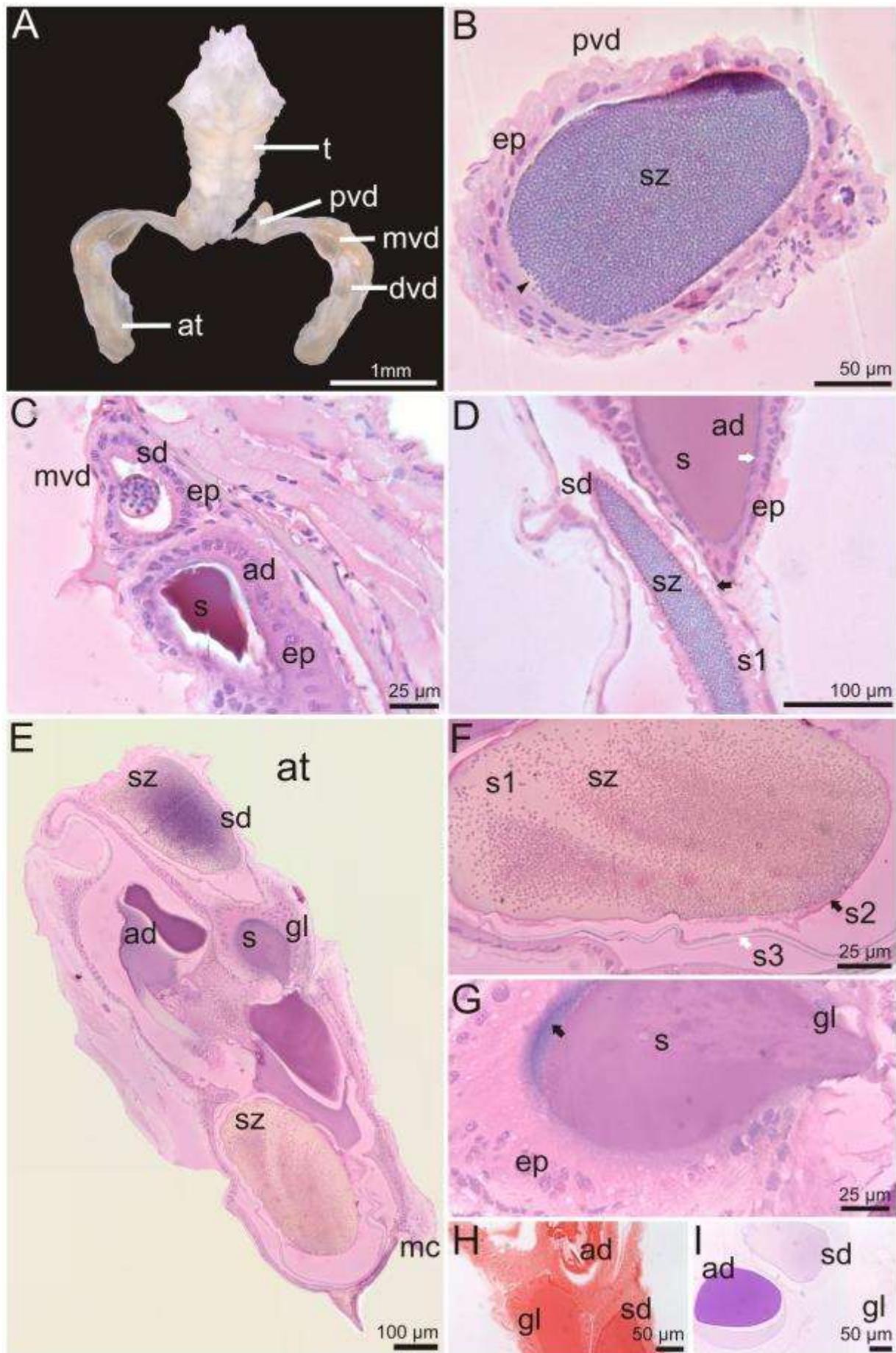


Figura 4. Sistema reprodutor masculino de *Acetes paraguayensis* – Sergestidae. **A.** Sistema reprodutor masculino de *A. paraguayensis*, apresentando um par de testículos e vaso deferente. **B.** A PVD possui somente um ducto com epitélio simples e cúbico. No lúmen, notam-se espermatozoides livres em pequena quantidade de secreção acidófila (seta preta). Coloração: HE. **C.** MVD com ductos acessório e espermático. Coloração: HE. **D.** Detalhe do MVD com ducto acessório preenchido por somente secreção acidófila. O ducto espermático apresenta os espermatozoides imersos em secreção acidófila, a tipo I, circundada pela tipo secreção tipo II mais intensamente acidófila. Nota-se que o epitélio de ambos os ductos é cubico simples. Coloração: HE. **E.** Dilatação da ampola terminal na qual observa-se a continuação dos ductos espermático e acessório, além da glândula acessória com uma só câmara. Coloração: HE. **F.** Primórdio do espermatóforo no ducto espermático. Nota-se a secreção tipo I acidófila, na qual os espermatozoides estão embebidos (seta preta), a tipo II, intensamente acidófila e mais externa, e a tipo III formando uma cápsula (cabeça de seta). Coloração: HE. **G.** Detalhe da glândula acessória simples com secreção acidófila de aspecto filamentosos. Coloração: HE. **H.** Reação positiva para proteínas das secreções dos ductos acessório, espermático e na secreção glândular homoganeamente corada ao Xylidine ponceau. **I.** Reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros nas secreções dos ductos acessório, espermático e da glândula acessória. Coloração: PAS.

ad= ducto acessório; at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; gl=glândula; mc= musculatura; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; sd= ducto espermático; sz= espermatozoide; s= secreção; s1= secreção do tipo I; s2= secreção do tipo II; s3= secreção do tipo III; t= testículo.

Fig. 4

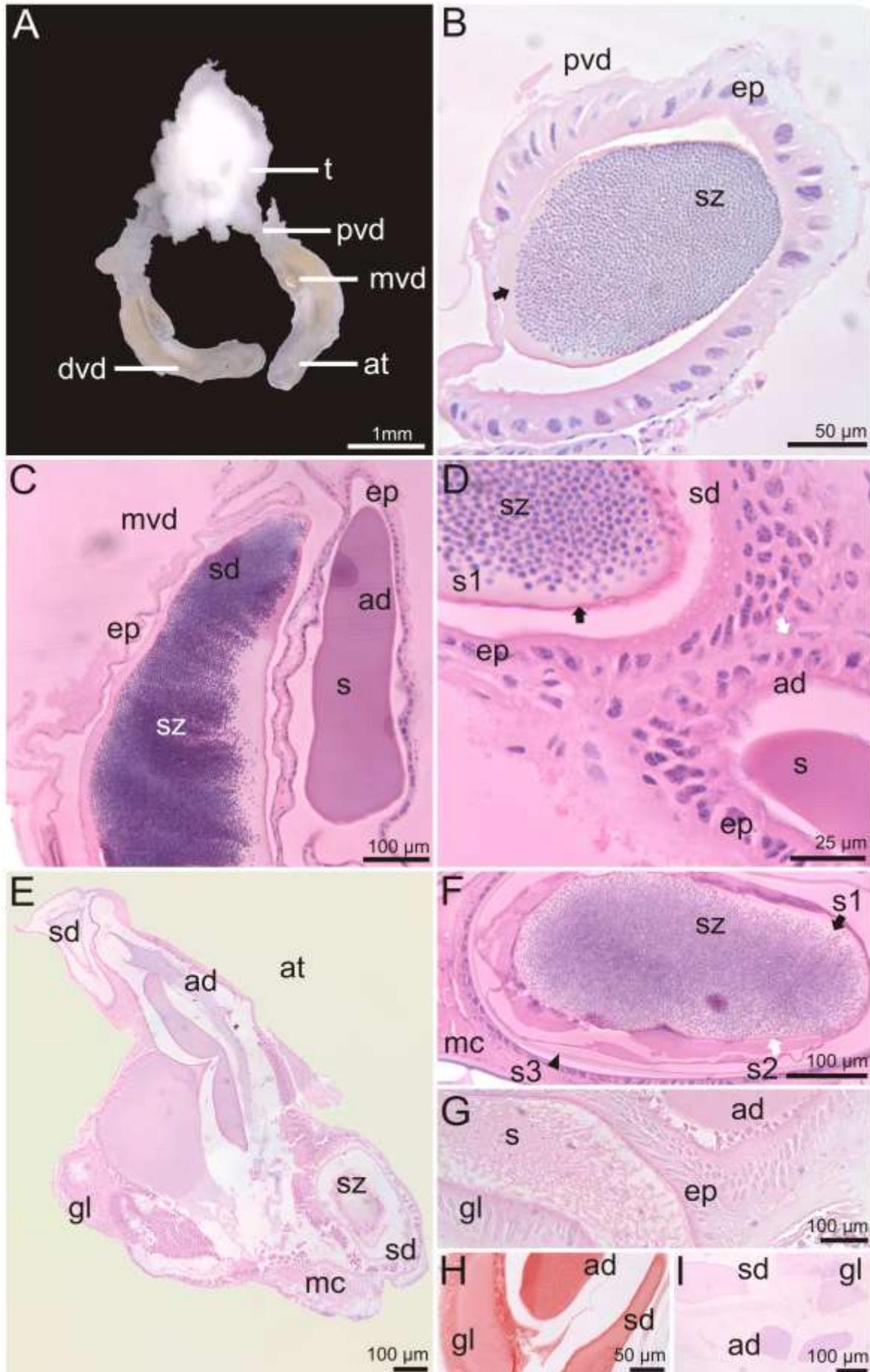


Figura 5. Sistema reprodutor masculino de *Acetes petrunkevitchi* – Sergestidae. **A.** Anatomia do sistema reprodutor de *A. petrunkevitchi* o qual é constituído por testículos e vasos deferentes, ambos pares. **B.** PVD de *A. petrunkevitchi* formado por um ducto contendo espermatozoides livres imersos em secreção fortemente basófila (seta preta). Nota-se o epitélio cúbico simples desta região. Coloração: HE. **C.** MVD dividida em dois ductos justapostos e independentes: ducto acessório e espermático. Coloração: HE. **D.** Detalhe do MVD evidenciando o ducto acessório contendo secreção basófila, com grânulos periféricos envolto por uma camada acidófila e outra basófila, mais externa. O ducto espermático contém espermatozoides imersos em secreção basófila e uma segunda secreção acidófila (seta branca). Nota-se a camada de tecido conjuntivo separando os ductos (seta preta). **E.** Ampola terminal de *A. petrunkevitchi* formada com a extensão do DVD e a glândula acessória simples. No ducto acessório a secreção seminal assume aspecto basófilo e granular. A ampola da DVD tem espessa camada de musculatura. Coloração: HE. **F.** Primórdio do espermatóforo de *A. petrunkevitchi* contendo a secreção tipo I fortemente basófila, a tipo II fortemente acidófila e a tipo III delgada apresentando aspecto de secreção polimerizada tipo quitina. Coloração: HE. **G.** Detalhe da glândula acessória contendo secreção luminal fortemente acidófila. Coloração: HE. **H.** Evidência de caráter proteico das secreções do ducto espermático, a secreção granular do ducto acessório e a secreção homogênea da glândula (seta preta). Coloração: Xylidine ponceau. **I.** Técnica de PAS para detecção de polissacarídeos neutros, as secreções da glândula e ducto espermático (cabeça de seta) são intensamente positivas, sendo a secreção do ducto acessório heterogênea com materiais mais e menos positivos.

ad= ducto acessório; at= ampola terminal; dvd= vaso deferente distal; ep= epitélio; gl=glândula; mc= musculatura; mvd= vaso deferente médio; pvd= vaso deferente proximal; sd= ducto espermático; sz= espermatozoide; s= secreção; s1= secreção do tipo I; s2= secreção do tipo II; s3= secreção do tipo III; t= testículo.

Fig. 5

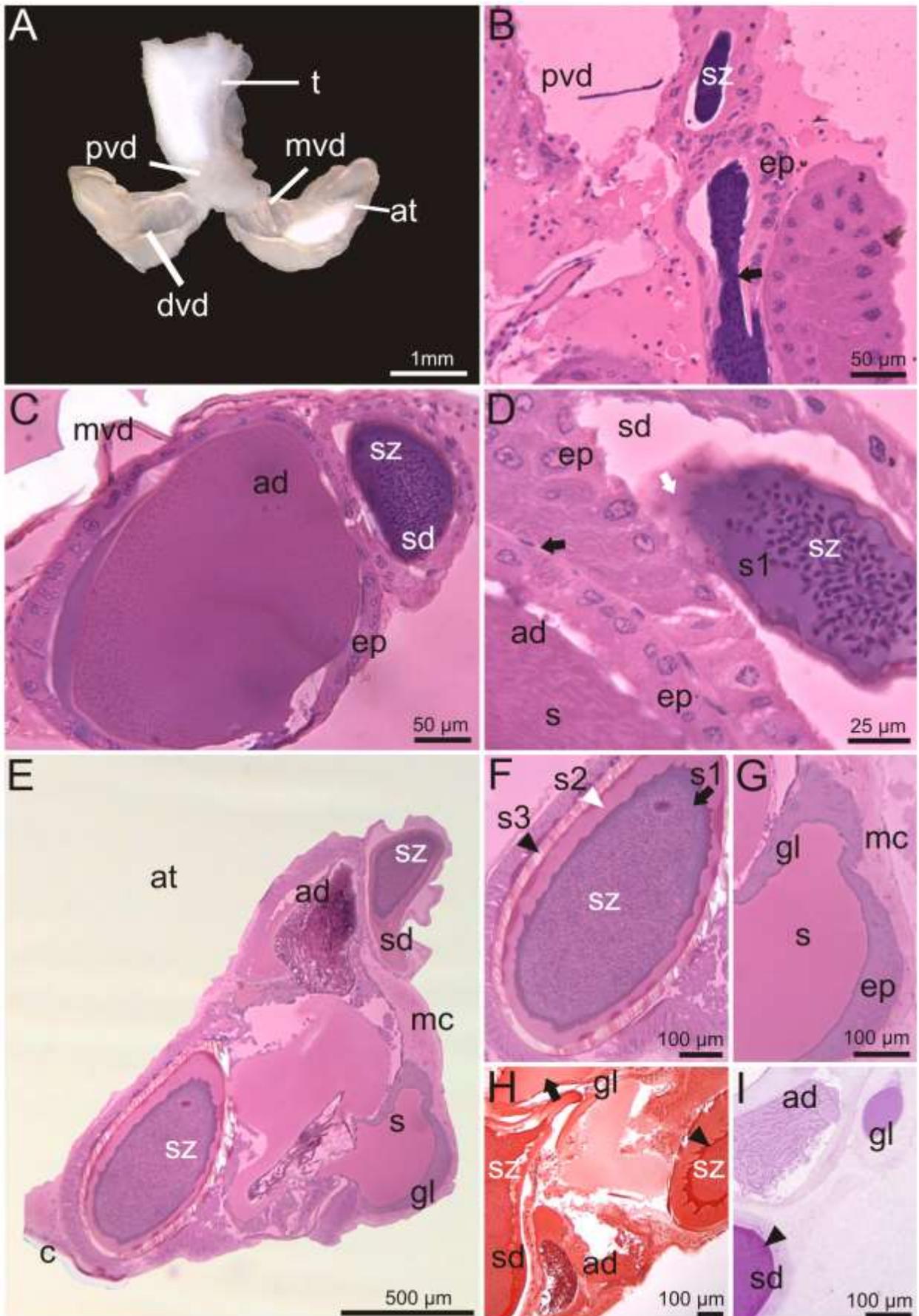


Figura 6. Ultraestrutura do espermatozoide de *Belzebub faxoni*, *Acetes americanus* e *Acetes marinus*. **A.** Espermatozoide de *B. faxoni* com formato arredondado e ausência de vesícula acrossomal. Nota-se o material nucleocitoplasmático e as poucas vesículas eletrólúcidas. **B.** Detalhe da vesícula eletrólúcida na periferia (seta branca). **C.** Espermatozoide de *A. americanus* com formato elíptico. Observa-se ainda, o material nucleocitoplasmático, a vesícula acrossomal e as vesículas eletrólúcidas periféricas (seta branca). **D.** Vista geral da vesícula acrossomal de *A. americanus*, a qual apresenta a câmara perforatorial, a zona interna eletrólúcida (seta branca) e a zona externa eletrondensa. **E.** Detalhe da vesícula acrossomal. Nota-se a unidade de membrana que delimita a câmara perforatorial (seta preta). **F.** Aspecto arredondado do espermatozoide de *A. marinus*, o qual apresenta a vesícula acrossomal, o material nucleocitoplasmático e as vesículas eletrólúcidas periféricas (seta branca). **G.** Detalhe da vesícula acrossomal de *A. marinus*. Nota-se a zona interna eletrondensa (seta preta) e a zona externa eletrólúcida e homogênea. **H.** Destaque no material nucleocitoplasmático fibroso e as vesículas eletrólúcidas periféricas de *A. marinus*.

av= vesícula acrossomal; n= núcleo; oa= zona externa; p= câmara perforatorial; sz= espermatozoide; v= vesículas.

Fig. 6

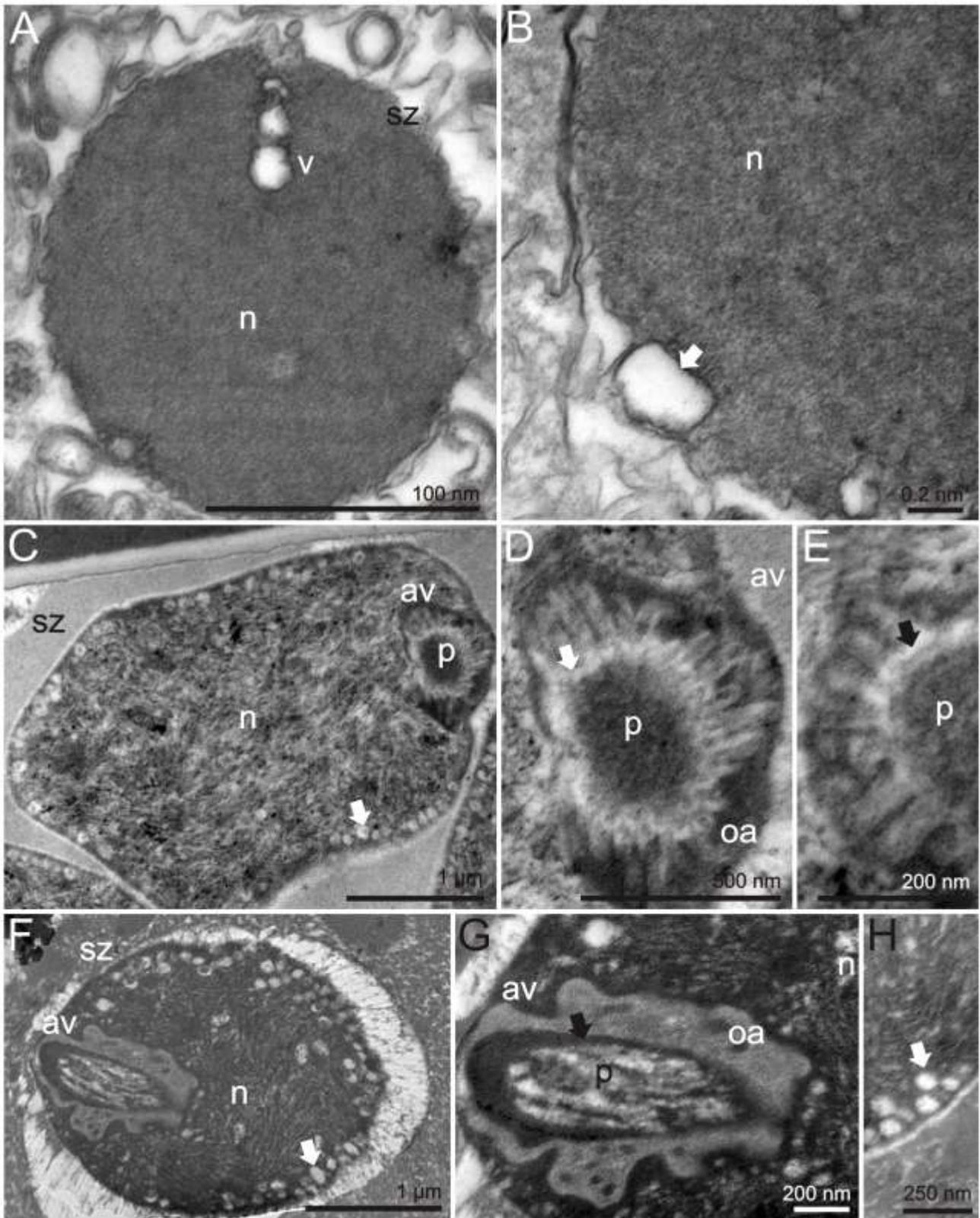


Figura 7. Ultraestrutura do espermatozoide de *Acetes paraguayensis* e *Acetes petrunkevitchi*.

A. Ultraestrutura do espermatozoide de *A. paraguayensis* o qual apresenta formato arredondado. Observa-se a vesícula acrossomal, o material nucleocitoplasmático fibrilar e as vesículas eletrólucidas periféricas (seta branca). **B.** Detalhe da vesícula acrossomal de *A. paraguayensis* a qual apresenta a câmara perforatorial alongada de ápice agudo, a zona interna eletrondensa (seta branca) e a externa menos eletrondensa e homogênea. **C.** Micrografia eletrônica do espermatozoide de *A. petrunkevitchi* com formato fusiforme. Observa-se o material nucleocitoplasmático fibrilar, descompactado e granuloso. Nota-se ainda a vesícula acrossomal complexa e as mitocôndrias no nucleocitoplasma. **D.** Detalhe da vesícula acrossomal de *A. petrunkevitchi*, formada pela zona acrossomal interna (região estriada, região granular, “central core” e região basal), a zona acrossomal externa com duas eletrondensidades, e a câmara perforatorial alongada com ápice agudo. Uma estreita banda de citoplasma granular é marcadamente notado, justaposto à vesícula acrossomal (seta branca). **E.** Detalhe da região estriada e granular na camada interna da vesícula acrossomal. **F.** Detalhe da base da câmara perforatorial de *A. petrunkevitchi* evidenciando a região mais volumosa do citoplasma periacrossomal (seta preta), adjacente à base da câmara perforatorial com restos dos centríolos (seta branca). **G.** Vesículas eletrondensas aleatoriamente distribuídas no espermatozoide de *A. petrunkevitchi* (seta preta). **H.** Mitocôndrias com poucas cristas e vesícula eletrondensa (seta preta) no nucleocitoplasma de *A. petrunkevitchi*.

ap= protuberância apical; av= vesícula acrossomal; br= região basal; cc= “central core”; gr= região granular; m= mitocôndria; n= núcleo; oa= zona externa; p= câmara perforatorial; sr= região estriada; sz= espermatozoide; v= vesículas.

Fig. 7

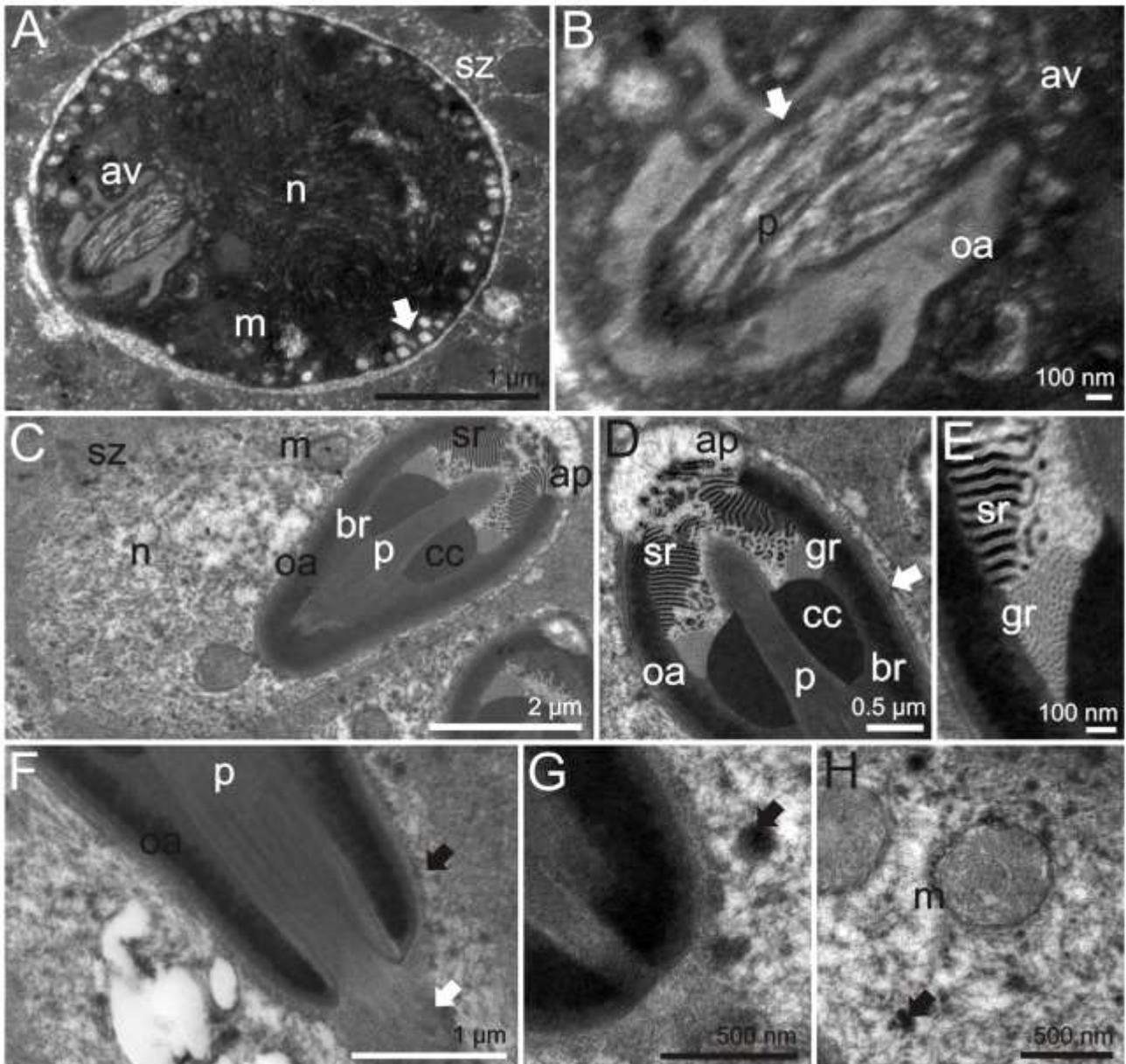


Figura 8. Filograma obtido a partir da Inferência Bayesiana dos genes 16s rDNA e COI mtDNA. O suporte de clado está expresso em probabilidade posterior. Os clados estão representados pelas cores, sendo o azul turquesa representando Sergestidae, em roxo encontra-se Luciferidae, a cor verde representa Trachypenaeidae, Sicyoniidae em amarelo e em azul Parapenaeidae. A cor vermelha agrupa os Solenoceridae, em alaranjado representa Aristeidae e no tom mais claro encontra-se Benthescymidae. Penaeidae está representado na cor azul claro.

Figura 9. Mapeamento do caráter “vaso deferente” em Dendrobranchiata. A partir da reconstrução de estado ancestral do caráter “vaso deferente”, sendo que em rosa este é classificado como complexo e em verde classificado como simples, nota-se que a condição plesiomórfica de Dendrobranchiata é apresentar o vaso deferente complexo. Este padrão foi observado em Sergestidae, Penaeidae, Solenoceridae, Aristeidae e Benthescymidae. O vaso deferente simplificado foi observado no clado formado em Parapenaeidae, Trachypenaeidae e Sicyoniidae e na família Luciferidae.

Fig. 9

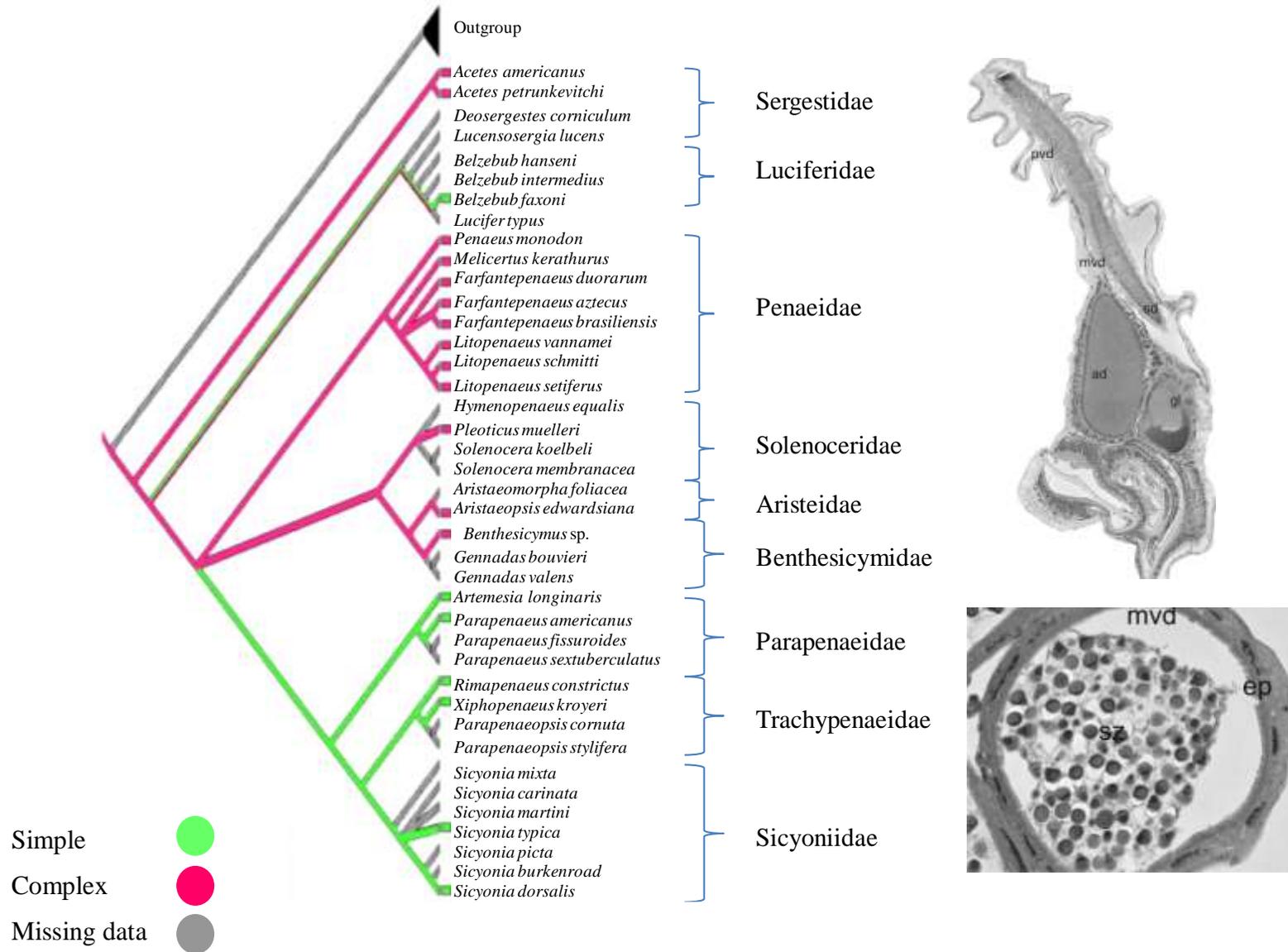


Figura 10. Mapeamento do caráter “glândula acessória” em Dendrobranchiata. Este filograma mostra a reconstrução de estado ancestral do caráter “glândula acessória”, sendo que em azul a glândula está ausente, em rosa este é classificado como complexo e em verde classificado como simples, nota-se que a plesiomorfia em Dendrobranchiata seria apresentar a glândula acessória simplificada. Este padrão foi observado em Sergestidae, no Penaeidae *Farfantepenaeus* spp., Parapenaeidae e Trachypenaeidae.

Fig. 10

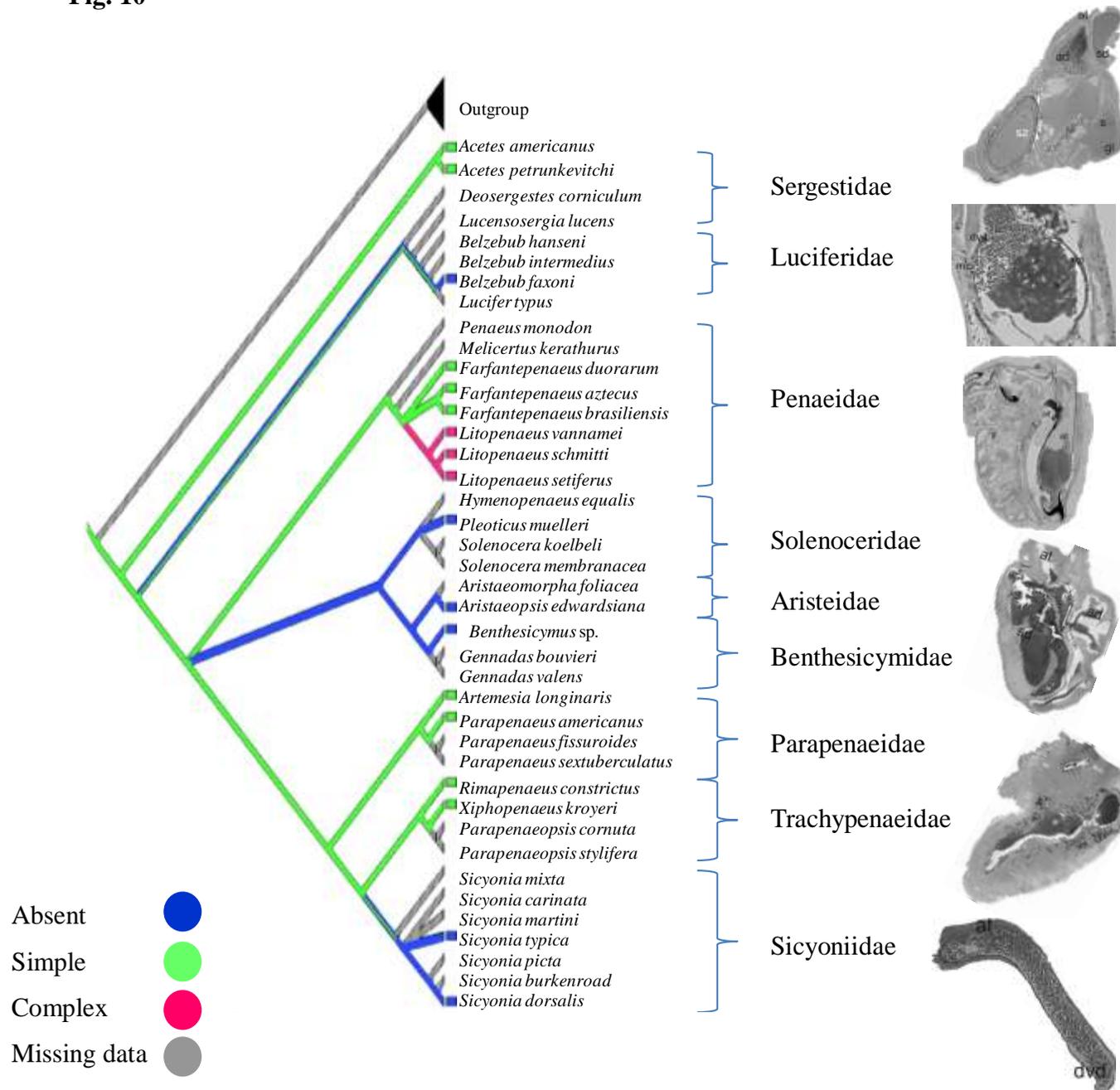


Figura 11. Mapeamento do caráter “espermátóforo” em Dendrobranchiata. A reconstrução de estado ancestral do caráter “espermátóforo”, sendo que em verde este é classificado como simples, em azul se refere aos espermátóforos esféricos e em rosa este é classificado como complexo e, nota-se que a plesiomorfia de Dendrobranchiata é possuir o espermátóforo complexo. Este padrão foi observado em Sergestidae, Benthescymidae, Solenoceridae, Penaeidae e Parapenaeidae.

Fig. 11

