

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 28/01/2022.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR, COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E PATERNIDADE EM *CHARYBDIS HELLERII*: PODE O SUCESSO DESTES SIRIS INVASORES ESTAR RELACIONADO A UM PADRÃO DE BIOLOGIA REPRODUTIVA DIFERENTE DO CONHECIDO PARA PORTUNIDAE?

TIMÓTEO TADASHI WATANABE

JANEIRO - 2020

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR, COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E PATERNIDADE EM *CHARYBDIS HELLERII*: PODE O SUCESSO DESTES SIRIS INVÁSOR ESTAR RELACIONADO A UM PADRÃO DE BIOLOGIA REPRODUTIVA DIFERENTE DO CONHECIDO PARA PORTUNIDAE?

TIMÓTEO TADASHI WATANABE

ORIENTADOR: Dr. Fernando José Zara
CO-ORIENTADOR: Dr. Marcos Antonio de Oliveira

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

RIO CLARO – SP
JANEIRO - 2020

W324c Watanabe, Timóteo Tadashi

Caracterização do sistema reprodutor, comportamento reprodutivo e paternidade em *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) : Pode o sucesso deste siri invasor estar relacionado a um padrão de biologia reprodutiva diferente fo conhecido para Portunidae? / Timóteo Tadashi Watanabe. -- Rio Claro, 2020

193 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Fernando José Zara

Coorientador: Marcos Antonio Oliveira

1. Biologia marinha. 2. Morfologia (Animais). 3. Microscopia eletrônica. 4. Biologia molecular. 5. Decápode (Crustáceo). 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.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

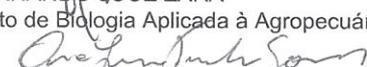
TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR, COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E PATERNIDADE EM CHARYBDIS HELLERII: PODE O SUCESSO DESTE SIRI INVASOR ESTAR RELACIONADO A UM PADRÃO DE BIOLOGIA REPRODUTIVA DIFERENTE DO CONHECIDO PARA PORTUNIDAE?

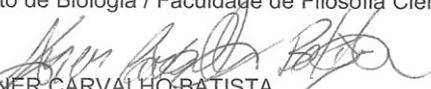
AUTOR: TIMÓTEO TADASHI WATANABE

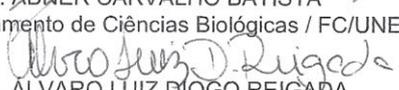
ORIENTADOR: FERNANDO JOSÉ ZARA

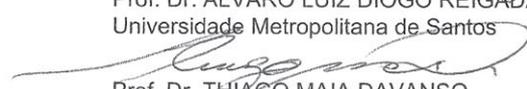
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:


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. ABNER CARVALHO-BATISTA
Departamento de Ciências Biológicas / FC/UNESP, Bauru-SP


Prof. Dr. ALVARO LUIZ DIOGO REIGADA
Universidade Metropolitana de Santos


Prof. Dr. THIAGO MAIA DAVANSO
Departamento de Zoologia - Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu / Universidade Estadual Paulista

Rio Claro, 28 de janeiro de 2020

“Mera mudança não é crescimento. Crescimento é a síntese de mudança e continuidade, e onde não há continuidade não há crescimento.”

C.S. Lewis

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores prof. Dr. Fernando José Zara e prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira pela oportunidade e aprendizado ao longo do desenvolvimento deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. E também através do projeto CAPES - Ciências do Mar II (FJZ Proc. #23038.004309/2014-51) concedido ao orientador, cuja bolsa de estudos fez parte do montante recebido, além do custeio deste doutorado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido na forma de auxílio à pesquisa na linha Jovem Pesquisador (FJZ JP Proc. #2005/04707-5), do qual provém uma parte significativa dos dados para esta tese. E também ao suporte financeiro ao Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML) através do Biota Intercrusta (Proc. #2018/13685-5).

À técnica de laboratório do IML, Márcia Fiorese Mataqueiro, juntamente com os colegas/alunos Camila Assugeni, Maria Alice, Fernanda Salti, Bárbara Paiva, Lucas Paschoal, Guilherme Andrioli e Leo Jaime Oliveira (*in memoriam*) no qual sempre estavam à disposição para ajudar naquilo que fosse preciso. E também ao Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (LABIMES) do Instituto de Biociências do campus da Unesp de São Vicente, e seus alunos que me ajudaram na execução de parte deste estudo.

Agradeço também à minha família que sempre me apoiou durante toda a minha formação acadêmica, em especial meu pai (*in memoriam*), minha mãe e meus irmãos. E também à minha esposa Adriany Pimentão e minha filha Ayla que foram meu alicerce durante o doutorado.

Resumo

Espécies invasoras são comuns no mundo e causam diversos impactos à fauna local. Com o aumento do tráfego naval e do uso da água de lastro, aumentam as chances de propagação de espécies aquáticas invasoras, sendo o siri *Charybdis hellerii* um exemplo deste processo, ao redor do mundo. Diversos estudos foram conduzidos aumentando o conhecimento de características que favorecem a invasão deste siri, como longo período larval, alimentação onívora, crescimento rápido e estocagem de espermatozoides. Apesar dos estudos já efetuados, pouco se conhece sobre o sistema reprodutor e o comportamento reprodutivo desta espécie, bem como se ela segue o padrão mais comum já descrito para a família Portunidae. Nas espécies nativas do gênero *Callinectes* os índices hepatossomáticos e gonadossomáticos apresentaram pouca variação. Os vasos deferentes possuem células tipicamente secretórias. A região anterior (AVD) é responsável por compactar e formar os espermatóforos. Região média (MVD) onde a maior parte dos espermatóforos formados é armazenada. Na região posterior (PVD) não é encontrado espermatóforos, somente secreção glicoproteica. A presença de grande quantidade de bolsas laterais na MVD e PVD auxilia na produção de fluido seminal. Deste modo, em *Callinectes* as espécies seguem o padrão esperado para formadores de plug espermático. No caso de *C. hellerii* os índices gonadossomáticos e hepatossomáticos foram sempre baixos e praticamente não houve variação nem por classe de tamanho ou por sazonalidade. Os espermatóforos também são formados na AVD, porém a maioria dos espermatóforos é armazenada na região distal da AVD. Os espermatóforos não possuem parede, somente uma película mucosa que sofrem deiscência em água do mar, após passar pelo gonópodo. Todas as células dos vasos deferentes são secretórias, porém a composição da secreção é mais similar à espécies que não são formadoras de plug. Este padrão exclusivo dentro de Portunidae pode ser explicado ao analisarmos o sistema reprodutor feminino. Nas fêmeas não foi encontrado em nenhum momento plug espermático. O receptáculo seminal mantém o mesmo volume independente do estágio ovariano e são encontrados somente espermatozoides livres no lúmen. Os espermatozoides são encontrados imersos em secreção rica em polissacarídeos ácidos, encontrados somente após a cópula. A cópula de *C. hellerii* ocorre em estágio intermuda e as fêmeas são capazes de copular com mais de um macho antes da ovulação. Deste modo o sistema reprodutor de *C. hellerii* é diferente do padrão mais comum registrado em Portunidae e mais similar à subfamília Thalamitinae. As características reprodutivas comportamentais e morfológicas refletem na variabilidade genética da prole, no qual há a confirmação de poliandria em *C. hellerii*. Essas características vêm a aumentar a variabilidade genética da prole, o que é mais uma característica dentre as já conhecidas para a espécie que conferem uma maior vantagem adaptativa e favorece a colonização de novas áreas.

Palavras-Chave: transferência espermática, microssatélites, paternidade, ultraestrutura, histoquímica.

Abstract

Invasive species are a common occurrence in the world and they cause several impacts to the local fauna. With the increasing naval traffic (consequently also increasing the use of ballast water), the potential of spread of aquatic invasive species rise, as the swimming crab *Charybdis hellerii* an example of this process around the world. Several studies were conducted increasing the knowledge of characteristics that favors the invador of this crab, such as long larval period, omnivorous diet, rapid growth and sperm storage. Despite these studies, little is known about the reproductive system of this species, as well if it has the most common pattern described to Portunidae. In the native species of the genus *Callinectes* the hepatosomatic and gonadosomatic indices had little variation. The vas deferens has typical secretory cells. The anterior region (AVD) is responsible to compact and form the spermatophores. The median region (MVD) is where the most of the spermatophores is stored. In the posterior region (PVD) there is no spermatophores, only glycoproteic secretion. The large quantity of outpockets in the MVD and PVD aid in the production of the seminal fluid. Thus, in *Callinectes* the species follows the expected patern of sperm plug producer. In the case of *C. hellerii* the gonadosomatic and hepatosomatic indices were Always low and there was barely any variation among size class or between seasons. The spermatophores are also formed in the AVD; however most of the spermatophores are stored in the distal portion of the AVD. The spermatophores have no wall, only a mucous pellicle that suffers dehiscence in seawater, after going through the gonopod. All the cells of the vas deferens are secretory; however the secretion composition is more similar to species that does not form sperm plug. This exclusive pattern in Portunidae could be explained as we analyse the female reproductive system. The sperm plug was not found in the females. The seminal receptacle has the same volume regardless of the ovarian stage and only free spermatozoa are found inside the lumen. The spermatozoa are found immersed in secretion rich in acid polysaccharides, which are only found after the copula. The mating in *C. hellerii* occurs in intermolt stage and the females are capable to mate with more than one male before ovulation. Thus, the reproductive system of *C. hellerii* is different from the most common pattern described for Portunidae and more similar to the subfamily Thalamitinae. The reproductive behavior and morphological characteristics reflects in the genetic of the offspring, which confirms the polyandry in *C. hellerii*. These characteristics increases the genetic variability which is another characteristic among others already described to the species that provides more adaptative advantage and favors the colonization of new áreas.

Keywords: sperm transfer, microsatellites, histochemistry, electron microscopy, paternity.

Sumário

Introdução	1
Referências	13
Capítulo 1	
Ultrastructure of the male reproductive system of <i>Callinectes</i> (Portunidae): filling the gaps in the histology and histochemistry	20
Prólogo – Capítulo 1	21
ABSTRACT	22
INTRODUCTION	23
MATERIAL AND METHODS	26
<i>Sampling and handling of crabs</i>	26
<i>Somatic indices</i>	27
<i>Light microscopy</i>	28
<i>Transmission electron microscopy</i>	29
RESULTS	29
<i>Hepatosomatic and gonadosomatic indices</i>	29
<i>Testes</i>	30
<i>Vas deferens and spermatophore formation</i>	34
FIGURES	37
DISCUSSION	52
ACKNOWLEDGEMENTS	67
REFERENCES	68
Capítulo 2	
Can a different pattern of seminal fluid production contribute to the invasion success of the non native crab <i>Charybdis hellerii</i> (Portunidae)?	75
Prólogo – Capítulo 2	76
ABSTRACT	77
INTRODUCTION	78
MATERIAL AND METHODS	81
<i>Field sampling and gross morphology</i>	81
Hepatosomatic and gonadosomatic indices	82
<i>Light microscopy, and transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM)</i>	82
<i>Spermatophore dehiscence</i>	84
RESULTS	84

<i>Gross morphology and GSI and HSI indices</i>	84
<i>Spermatophore and seminal fluid formation</i>	86
<i>Spermatophore dehiscence and ultrastructure of the Gonopod I</i>	90
FIGURES	92
DISCUSSION	108
<i>Somatic indices and macroscopic development stages of the reproductive system</i>	108
<i>Vas deferens and seminal fluid production</i>	110
ACKNOWLEDGMENTS	118
REFERENCES.....	118
Capítulo 3	
New insights into sperm storage and mating behavior in Portunidae based on the non native crab	
<i>Charybdis hellerii</i>	128
Prólogo – Capítulo 3	129
ABSTRACT	130
INTRODUCTION.....	131
MATERIALS AND METHODS	135
<i>Animal samples</i>	135
<i>Determination of ovarian development</i>	135
<i>Light and transmission electron microscopies</i>	136
<i>Laboratory and field mating observations</i>	137
<i>Paternity test</i>	138
RESULTS	140
<i>The SR during ovarian development and gross morphology</i>	140
<i>Histology, histochemistry and ultrastructure of the seminal receptacle</i>	141
<i>Sperm transfer behavior</i>	143
FIGURES and TABLES.....	146
ACKNOWLEDGMENTS.....	172
REFERENCES.....	173
Considerações finais.....	183
1- Morfologia do sistema reprodutor	183
2 – Comportamento reprodutivo e análise genética da prole	183

Introdução

Atualmente, as invasões biológicas são muito comuns ao redor do mundo e causam diversos impactos ambientais como predação de espécies nativas ou mesmo competição por recursos (Vitousek et al., 1997; Ricciardi et al., 2000). Dentre as diferentes formas de invasão, em organismos aquáticos, a água de lastro é considerada um dos principais meios de introduções de espécies não nativas em ambientes marinhos, devido principalmente à intensificação do tráfego de navios (Kerckhof et al., 2007; Katsanevakis et al., 2014). Um exemplo proposto para este tipo de invasão foi o siri *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) espécie originária do Indo-Pacífico (Lemaitre, 1995), o qual invadiu e se estabeleceu em diversas partes no mundo e, ao longo de grande parte da costa brasileira (Sant'Anna et al., 2012a; Rosa 2014; Negri et al., 2018). A invasão de *C. hellerii* na costa brasileira teve como origem, em sua maioria, de indivíduos provenientes de populações que se estabeleceram no mar Mediterrâneo e somente uma pequena parcela das populações estabelecidas no Brasil foi proveniente do local nativo da espécie (Negri et al., 2018)

Charybdis hellerii mostra vários fatores que favorecem a colonização, como 1) longo período de desenvolvimento larval; 2) rápido crescimento e maturação sexual; 3) dieta variada e onívora, 4) habilidade de armazenar espermatozoides e 5) produzir várias massas de ovos com alta fecundidade (Dineen et al., 2001; Sant'Anna et al., 2012; 2015). O hábitat em que *C. hellerii* vive varia de acordo com o local de invasão e é capaz de se adaptar tanto em substratos arenosos como em substratos rochosos (Lemaitre, 1995; Dineen et al., 2001; Mantelatto e Garcia, 2001; Sant'Anna et al., 2012). No Brasil, inicialmente foi encontrado na costa do Nordeste (Carqueija e Gouvea, 1996; Calado, 1996) e no Sudeste (Tavares e Mendonça Jr., 1996) e se estabeleceu rapidamente na costa brasileira (Mantelatto e Dias, 1999; Mantelatto e Garcia, 2001; Sant'Anna

et al., 2012; 2015). Na costa o estado de São Paulo foi demonstrado que este siri invasor ocupa principalmente substratos consolidados, como o intertidal de costões rochosos com maior salinidade co-existindo com diversas espécies nativas (Sant'Anna et al., 2012).

Apesar de *C. hellerii* ter diversos registros no mundo e evidências de comunidades estabelecidas nos locais introduzidos (Dineen et al., 2001; Mantelatto e Garcia, 2001; Sant'Anna et al., 2012), ainda pouco se sabe a respeito de sua biologia reprodutiva, havendo majoritariamente dados ecológicos a respeito da espécie (Dineen et al., 2001; Mantelatto e Garcia, 2001; Bolaños et al., 2012; Sant'Anna et al., 2012; 2015; Watanabe et al., 2015). Tendo em vista os problemas que espécies invasoras causam, *C. hellerii* também não está isenta de exercer pressão sobre as populações nativas de Brachyura, como foi sugerido em relação ao declínio de populações de *Cronius ruber* (Lamarck, 1818) por Mantelatto et al. (2009) e demonstrado na Baía de Santos-São Vicente (Sant'Anna et al., 2012).

Além do sucesso da invasão de *C. hellerii* no Atlântico oeste (Mantelatto e Dias, 1999; Dineen et al., 2001; Tavares e Amouroux, 2003; Morán e Atencio, 2006; Sant'Anna et al., 2012; 2015, Negri et al., 2018), outras espécies do gênero *Charybdis* já são reportadas no mar Mediterrâneo como *Charybdis feriata* (Linnaeus, 1758) por Abelló e Hispano (2006) e *Charybdis lucifera* (Fabricius, 1798) em Mizzan e Vianello (2009), o que é um alerta em relação ao potencial invasor do gênero *Charybdis*. Isso torna os estudos sobre estas espécies importantes e necessários para a melhor compreensão delas em futuras tentativas de controle da invasão, sendo a prevenção sempre a estratégia mais sensata e menos honerosa.

Em razão da dificuldade de controlar todas as variáveis na natureza, o conhecimento sobre a etologia reprodutiva de Portunidae vem sendo estudada principalmente por meio de experimentos em cativeiro em condições controladas (Pinheiro e Fransozo, 1999). Entre as

temáticas científicas ainda pouco exploradas para *C. hellerii* está o comportamento reprodutivo. Para a família Portunidae, a comunicação e reconhecimento sexual são realizados principalmente por meio de estímulos táteis, visuais e/ou químicos (Hartnoll, 1969; Pinheiro e Fransozo, 1999). Nesta família, têm-se como padrão de cópula, longos períodos de “abraço” pré e pós-copulatórios simultaneamente com a muda da puberdade, estando a fêmea assim, com o exoesqueleto flácido (Hartnoll 1969, Pinheiro e Fransozo 1999). Por outro lado, nos Portunidae da mesma subfamília de *C. hellerii*, Thalamitinae, *Thalamita picta* Stimpson, 1858, *Thalamita prynna* (Herbst, 1803) e *Thalamita sima* H. Milne Edwards, 1834, as fêmeas são capazes de copularem no período intermuda, ou seja, com a carapaça rígida (Norman 1996; Norman et al., 1997; 1999).

Estudos do comportamento reprodutivo em *Charybdis* foram reportados para uma só espécie *C. feriata* (Soundarapandian et al., 2013). Segundo estes autores, a cópula é realizada com a fêmea durante a muda da puberdade (padrão mais comum para Portunidae), com longos períodos de abraço pré (quatro dias) e pós-copulatórios (12 horas), sendo a duração da cópula de 11 horas. Este tempo total de cópula é bem menor em relação à espécie nativa do Brasil como *Arenaeus cribarius* (Lamarck, 1818) que teve duração média de 30 dias de abraço pré-copulatório, 17 horas de tempo de cópula e 30 dias de abraço pós-copulatório (Pinheiro e Fransozo, 1999). Contudo, este tempo de cópula foi semelhante ao de *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758), da Oceania, *Charybdis feriata* (Linnaeus, 1758) de origem Indo-Pacífica e *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758), cuja origem é europeia e, também, apresenta potencial como invasor (Fielder e Eales, 1972; Berril e Arsenault, 1982; Grosholz e Ruiz, 1996; Thresher et al., 2003). *Charybdis feriata* ainda não pode ser considerado um invasor, apesar de já ter sido registrado no Mar Mediterrâneo (Abelló e Hispano, 2006). Este tipo de comportamento

reprodutivo é o esperado para seu congênere *C. hellerii* que ainda não possui nenhum estudo neste tema. Considerando outros Thalamitinae como *T. picta*, *T. prymna*, e *T. sima* e os congêneres *Charybdis japônica* (A. Milne-Edwards, 1861) e *Charybdis longicollis* (Leene, 1938) que diferem do padrão mais conhecido de cópula em Portunidae e realizam cópula com fêmea em estágio intermuda (Norman 1996; Norman et al., 1997; 1999; Innocenti et al., 1998; Baker et al., 2018). Adicionalmente, atividades de campo realizadas pelo grupo de pesquisa, onde esta tese foi desenvolvida, foi constatado ao menos um casal de *C. hellerii* em cópula, sendo a condição da carapaça da fêmea rígida (Timóteo Tadashi Watanabe e Bruno Sampaio Sant'Anna, observação pessoal, 2012). Apesar de ser uma única observação, tal evento sugeriu a possibilidade de ocorrência de poliandria, o que resultou em uma série de eventos que culminaram em parte nesta tese, vislumbrando a possibilidade das fêmeas aumentarem a variabilidade genética dos descendentes, sendo este um aspecto vantajoso para um organismo invasor (Norman et al., 1999; Cornell e Tregenza, 2007). Assim, o presente estudo pretende fechar lacunas importantes para a compreensão do sucesso da invasão deste animal ao redor do mundo.

Outro aspecto importante a ser estudado sobre a biologia reprodutiva de crustáceos é a morfologia do sistema reprodutor. Por meio da morfologia, histologia e ultraestrutura, podem-se obter informações detalhadas dos mecanismos da transferência espermática (Beninger et al., 1988; 1993; Zara et al., 2012; 2014). Em Brachyura, a complexidade do processo de inseminação tende a ser maior em relação a outros grupos de crustáceos, uma vez que a inseminação é interna, levando a estocagem de fluido seminal para posterior fertilização (Bauer, 1986). Logo, os aspectos morfológicos do sistema reprodutor de *C. hellerii* são de extrema importância para a compreensão da reprodução (Zara et al., 2012; Nascimento e Zara, 2013), o que pode ser chave

para o entendimento do sucesso de invasão e estabelecimento das populações. O sistema reprodutor masculino para a vasta maioria dos Brachyura e, Portunidae não é uma exceção, encontra-se localizado no cefalotórax em forma da letra “H”. Este é constituído por um par de testículos, unidos por comissura central logo abaixo do coração. Cada testículo desemboca no vaso deferente, o qual termina nos dutos ejaculatórios conectados aos gonopódios por meio do gonópore na coxa do quinto pereiópodo (Cronin, 1947; Johnson, 1980; Zara et al., 2012). Apesar da grande diversidade existente em Brachyura e, em especial a família Portunidae (Ng et al., 2008; Evans, 2018), existem poucos estudos conciliando a morfologia, histologia e, principalmente a ultraestrutura do sistema reprodutor masculino desta família com representantes de importância econômica (Cronin, 1947; Ryan, 1967; Johnson, 1980; Stewart et al., 2010; Zara et al., 2012; Nascimento e Zara, 2013). Para o gênero *Charybdis* existe somente a descrição da morfologia geral e a histologia para *Charybdis smithii* MacLeay, 1838 em Balasubramanian e Suseelan (2000), sendo os resultados semelhantes ao encontrado para *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 em Cronin, (1947) e Johnson, (1980), *P. pelagicus* (Stewart et al., 2010) e *Portunus hawaiiensis* Herbst, 1783 como *Portunus sanguinolentus* em Ryan (1967), porém com lóbulos testiculares incompletos. As células germinativas de *C. smithii* foram descritas como sincrônicas (Balasubramanian e Suseelan, 2000) como ocorrem para a maioria dos siris (Johnson, 1980; Stewart et al., 2010; Zara et al., 2012; Nascimento e Zara, 2013). Porém a única diferença encontrada em *C. smithii* é que o vaso deferente anterior, na sua porção proximal, possui epitélio cúbico e na porção distal, o epitélio é colunar (Balasubramanian e Suseelan, 2000) diferente do padrão para os portunídeos (Ryan, 1967; Johnson, 1980; Stewart et al., 2010; Zara et al., 2012; Nascimento e Zara, 2013). Assim, espera-se que a análise histoquímica e ultraestrutural comparativa entre o gênero *Callinectes* e *C. hellerii* possam esclarecer se o

sistema reprodutor masculino deste siri invasor segue o padrão de produção de espermatozoide, espermatóforos e fluido seminal típico de Portunidae ou variações neste padrão possam indicar prováveis adaptações para explicar o sucesso da invasão deste animal.

O sistema reprodutor feminino em *Eubrachyura* possui um órgão de origem ectomesodérmica, o receptáculo seminal, cuja função é armazenar espermatozoides para posteriores eventos de fertilização (Diesel, 1989; 1990; 1991; Guinot e Quenette, 2005; López-Greco et al., 2009; McLay e López-Greco, 2011). Este órgão é fundamental para determinar desde padrões de estoque, até evidências de competição espermática (Diesel, 1991). Na família Portunidae, assim como em outros Brachyura, o receptáculo seminal é um órgão par conectado aos ovários por meio dos ovidutos. O receptáculo seminal está posicionado no interior da cavidade cefalotorácica, abaixo do coração, circundada por parte da musculatura de locomoção associada aos apódemas internos (Pyle e Cronin, 1950).

O receptáculo seminal em *Eubrachyura* pode ser classificado como dorsal, ventral, ou intermediário de acordo com a posição de inserção do oviduto em relação à vagina, a qual se localiza ventralmente (Diesel, 1991; McLay e López-Greco, 2011; Zara et al. 2014). Apesar de terem provavelmente se derivado de uma característica ancestral totalmente ectodérmica, observada em Podotremata, chamada espermateca, os receptáculos seminais tipo dorsal são considerados o mais próximo da condição ancestral (McLay e López-Greco 2011). Em Portunidae o padrão do receptáculo seminal é majoritariamente dorsal, como ocorre em *A. cribarius* (Zara et al., 2014), *C. sapidus* (Johnson, 1980) e *P. pelagicus* (Bawab e El-Sherief, 1988). Porém em *P. hawaiiensis* o receptáculo seminal foi classificado como do tipo intermediário (Ryan, 1967; Diesel, 1991; McLay e López-Greco, 2011). Estas diferenças de padrão morfológico estão relacionadas às modificações morfológicas que ocorrem após a cópula,

quando ocorre a eliminação do material seminal transferido pelo macho, levando o receptáculo do tipo dorsal assumir uma posição praticamente do tipo ventral em espécies como *A. cribrarius* (Zara et al., 2014). Adicionalmente, a diferença nos tipos de receptáculos pode estar relacionada à cópula com mais de um macho, levando a competição espermática (Diesel, 1989; 1991; McLay e López-Greco, 2011).

A competição espermática normalmente é limitada em Brachyura, pois os espermatozoides são imóveis e desprovidos de flagelo (Krol et al., 1992). Esta competição torna-se ainda menor com os diversos mecanismos que impedem a poliandria como a cópula com a fêmea durante a muda (fêmea flácida), seguido pela guarda do macho o qual pode depositar um tampão de secreção denominado “plug espermático”, como descrito para *Arenaeus*, *Callinectes* e *Portunus* ou, em outros casos, quando a fêmea realiza a postura dos ovos logo após a cópula (McLay e López-Greco, 2011). Contudo, com a possibilidade da ausência destas características durante a cópula, como observado em Thalamitinae (Norman et al., 1999), podem diminuir as chances e a importância da competição entre os machos, visto que a possibilidade de poliandria torna-se plausível e vantajosa para aumento da variabilidade genética da prole. Em particular para as famílias Cancridae e Portunidae, o fluido seminal produzido no vaso deferente dos machos forma o “plug” espermático dentro do receptáculo seminal (Hartnoll, 1969; Hirsch, 1988). Este “plug” preenche o receptáculo seminal impedindo ou dificultando a introdução de material genético de outros machos (Hines et al., 2004; Hartnoll, 1969; Wolcott et al., 2005; Zara et al., 2012; 2014). Porém, com o desenvolvimento ovariano, o “plug” espermático desaparece após algum tempo e o receptáculo seminal torna-se menor e flácido, como observado em outras espécies de Portunidae como o Carcininae *C. maenas* (Spalding, 1942) e nos Portuninae *P. hawaiiensis* (Ryan, 1967), *P. pelagicus* (Bawab e El-Sherief, 1988), *Callinectes danae* Smith,

1869 (Zara et al., 2012; 2013) e *A. cribrarius* (Pinheiro e Fransozo 2002; Zara et al., 2014). Por sua vez, no Thalamitinae *C. smithii* não existe evidência de “plug” no receptáculo (Balasubramanian e Suseelan, 1998).

Sabendo-se que em Portunidae o “plug” espermático desaparece após algum tempo e que em *C. smithii* não foi detectada a presença de “plug” espermático, abre-se, então, a possibilidade das fêmeas de *C. hellerii* não possuírem o “plug” e serem poliandras. Entre as vantagens de um macho copular com várias fêmeas, a principal é o aumento do *fitness* e sucesso reprodutivo do macho (Bateman, 1942; Emlen e Oring, 1977), o que é um fato comum para Brachyura (Hartnoll, 1969). Para as fêmeas apenas uma cópula assegura o armazenamento de espermatozoides, para posterior fertilização e, além disso, o ato da cópula traz riscos como danos físicos, gasto energético e susceptibilidade à predação (Blanckerhorn et al., 2002; DiBattista et al., 2008). Porém considerando uma espécie invasora como *C. hellerii*, a poliandria poderia beneficiar a espécie com a proteção fornecida pelo macho no momento da cópula (DiBattista et al., 2008), aumentar a diversidade genética da prole, evitar incompatibilidades genéticas e consanguinidade e aumentar a chance de receber genes de maior qualidade dos machos (Jennions e Petrie, 2000; Zeh e Zeh, 2001; Johnson e Brockmann, 2013). Dado as características já conhecidas na família Portunidae, como possibilidade de estocagem de espermatozoide em longo prazo (Dineen, 1999; McLay e López-Greco 2011; Zara et al., 2014) e a possibilidade da ausência de “plug” espermático em *Charybdis*, isso permite levantar a hipótese que as fêmeas do siri invasor, *C. hellerii*, sejam poliândricas como demonstrado para as espécies da família Ucididae e Cancridae (Baggio et al., 2011; Jensen e Bentzen 2012; Rojas-Hernandez et al., 2014). Caso a hipótese da poliandria seja aceita para *C. hellerii*, esta informação pode esclarecer um ponto crucial do sucesso de invasão e estabelecimento deste Portunidae ao redor do mundo,

saído do padrão monoandrico ou quase monoandrico (12% das fêmeas de *C. sapidus* mostram dois pacotes de espermatozoide de um ou dois pais) determinado para os siris (para revisão Jivoff et al., 2007). Tais dados permitirão estudos posteriores, com outras espécies do mesmo gênero, as quais podem apresentar esta e, outras várias características, que as favorecem como invasores potenciais.

Por meio de análises genéticas pode-se esclarecer a paternidade, realizar a sexagem dos indivíduos, definir a estrutura das populações, determinar gargalos, padrões de migração, a história demográfica das populações e detectar introgressão (Frankham et al., 2010; Chambers et al., 2014). Análises nas diferenças existentes nas sequências de DNA entre indivíduos e entre populações permite explorar os processos evolutivos e eventos demográficos do passado da espécie (Nosil et al.; 2009). Por outro lado, taxas de dispersão são difíceis de estudar por observação direta, pois muitas vezes são baixas e as dispersões de longa distância são dificilmente mensuradas com precisão (Mirimirin et al., 2009). A falta de dispersão faz com que os acasalamentos não sejam aleatórios e, sendo assim, ocorre déficit de heterozigidade (Frankham et al., 2008). Com o uso de marcadores genéticos é possível fazer inferências a respeito dos padrões de dispersão da população. Informações sobre as paternidades são essenciais para o estudo do impacto do endocruzamento, e conseqüentemente para um maior entendimento do sucesso reprodutivo de espécies invasoras (Mirimirin et al., 2009; Barret, 2015). Além disso, o conhecimento da composição genética de uma espécie invasora e de sua estrutura populacional é fundamental para as ações de conservação de organismos endêmicos, os quais podem ter seus nichos ameaçados por espécies exóticas (Frankham et al., 2008; Mirimirin et al., 2009).

Marcadores STRs (Short Tandem Repeats), também denominados de microssatélites de DNA, estão distribuídos pelo genoma nuclear de eucariotos, e seus polimorfismos são resultados de variações no número de repetições *in tandem* (uma atrás da outra) de uma sequência repetitiva curta de DNA (Bhargava et al., 2010). No caso de STRs estas repetições possuem de 1 a 6 bases que podem se repetir de 5 a 100 vezes por *locus* (Wan et al., 2004). Em muitos casos, quando uma população possui um tamanho significativo (N) e os *loci* são bastante polimórficos, apresentando alto grau de variabilidade, encontrar as mesmas combinações de alelos em dois indivíduos é algo bastante raro. Neste contexto a análise destas regiões podem revelar heterozigose e homozigose para cada indivíduo, sendo assim, são muito utilizados para determinar parentesco, sexo, estrutura e classificação de uma população (Wan et al., 2004). Com o advento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction), microssatélites são utilizados como importantes marcadores genéticos, identificados a partir de um prévio sequenciamento do DNA da espécie (Bhargava et al., 2010). Muitas vezes, podem ser utilizados primers ou oligonucleotídeos de espécies relacionadas para a amplificação heteróloga de microssatélites das espécies de interesse (Farro et al., 2008). Neste contexto, as análises moleculares revelam que a poliandria, múltiplo acasalamento pelas fêmeas é altamente difundido na natureza, incluindo diversas espécies de aves e mamíferos os quais eram considerados classicamente monogâmicos (Waser et al., 2006; Soulsbury, 2010; Chambers et al., 2014,). No que concerne especificamente a invertebrados diversos trabalhos recentes também apontam que a múltipla paternidade é um evento bastante comum (Yue e Chang, 2010; Jossart et al., 2014).

Trabalhos recentes também apontam que fêmeas de diversos crustáceos possuem comportamento poliândrico, comprovado pela análise de STRs que demonstra claramente a múltipla paternidade em embriões de ovos fecundados (Baggio et al., 2011; Jensen e Bentzen,

2012; Ma et al., 2013; Rojas-Hernandez et al., 2014; Dennenmoser e Thiel, 2015). Dentre os trabalhos existentes, recentemente foram identificados em *C. feriata* 47 STRs sendo que 10 se apresentaram altamente polimórficas e com heteroziguidade (*H*) na população variando de 41-81% (Ma et al., 2013). Em razão da grande proximidade filogenética entre *C. feriata* e *C. hellerii* este trabalho abre a perspectiva da utilização de oligonucleotídeos hierólogos de *C. feriata* para estudos populacionais e de paternidade múltipla de *C. hellerii*, o qual apesar de representar uma espécie invasora não só no Brasil, mas também em diversos países como a Venezuela, Colômbia, Estados Unidos e Turquia (Sant'Anna et al., 2012) ainda carece de estudos a variedade populacional e poliandria. Adicionalmente, a amplificação hieróloga das STRs permitiria clonar e sequenciar os microsatelites, permitindo a determinação de oligonucleotídeos específicos para STRs de *C. hellerii*.

Sabe-se que *C. hellerii* foi bem sucedido, tanto na invasão, como no estabelecimento de suas populações ao redor do mundo. Com isso vários estudos como Dineen et al. (2001), Mantellato e Garcia (2001), Tavares e Amouroux (2003), Sant'Anna et al. (2012), Watanabe et al. (2015) e Negri et al. (2018) aumentaram significativamente o conhecimento acerca da espécie. Nota-se que esta espécie parece influenciar espécies nativas associadas a substratos consolidados (costões rochosos) no Brasil, como *C. ruber* (Mantelatto et al., 2009; Sant'Anna et al., 2012), não afetando as espécies de substratos não consolidados como os *Callinectes* (Sant'Anna et al., 2012). Porém, ainda existem várias lacunas cruciais para o entendimento do sucesso de invasão e estabelecimento destes animais. Dentre elas, sem dúvida, o conhecimento da biologia reprodutiva é o que se destaca, e várias dúvidas ainda necessitam ser esclarecidas, como elencadas a seguir: 1) quais os principais hábitos comportamentais exibidos durante a cópula; 2) as fêmeas podem aceitar mais de um macho; 3) as fêmeas de *C. hellerii* recebem ou

não plug espermático transferido pelos machos, 4) devido a presença ou ausência de plug espermático, as fêmeas são monoândras ou poliândras; 5) se a progênie produzida é oriunda de um único ou vários machos.

Baseado nas informações disponíveis desta espécie e seu sucesso no processo de invasão, ao se investigar as questões previamente levantadas, espera-se que *C. hellerii* apresente um padrão de produção de fluido seminal, estocagem de espermatozoides, comportamento reprodutivo e genética da progênie distinto das espécies nativas já estudadas como *Arenaeus* e *Callinectes*, as quais são tipicamente formadoras de “plug” espermático. Caso isso seja confirmado, as características reprodutivas de *C. hellerii* podem ser mais um fator adicional para o sucesso da invasão, além dos já levantados por Dineen et al. (2001), fechando assim as lacunas de conhecimento para esta espécie.

Deste modo, esta tese foi dividida em capítulos, na qual o primeiro trata da morfologia e ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Callinectes* sendo este gênero considerado modelo para espécies de Portunidae, e além disso, estas espécies são tipicamente formadoras de “plug” espermático. No segundo capítulo, figura a morfologia e ultraestrutura do sistema reprodutor masculino do siri invasor *C. hellerii* mostrando as diferenças para as espécies formadoras de plug espermático e no terceiro capítulo, é apresentado a morfologia e ultraestrutura do sistema reprodutor feminino de *C. hellerii*, com a adição comportamento reprodutivo em laboratório e a análise de paternidade da progênie deste siri invasor.

Referências

- Abelló, P., Hispano, C. (2006). The capture of the Indo-Pacific crab *Charybdis feriata* (Linnaeus, 1758) (Brachyura: Portunidae) in the Mediterranean Sea. *Aquatic Invasions*, 1: 13-16.
- Baggio, R.A., Pil, M.W., Boeger, W.A., Patella, L.A., Ostrensky, A., Pie, M.R. (2011). Genetic evidence in the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). *Marine Biology Research*, 7: 520-524.
- Baker, C.F., Gublin, Y., Reeve, K.A. (2018). Observations of hard-shell mating in the portunid crab *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards, 1861) (Decapoda: Brachyura). *Journal of Crustacean Biology*, 38: 504-508.
- Balasubramanian, C.P., Suseelan, C. (1998). Reproductive biology of the female deepwater crab *Charybdis smithii* (Brachyura: Portunidae) from the Indian seas. *Asian Fisheries Science*, 10: 211-222.
- Balasubramanian, C.P., Suseelan, C. (2000). Male reproductive system and spermatogenesis in the deep water crab *Charybdis smithii* McLeay (Brachyura: Portunidae). *Indian Journal of Fisheries*, 47: 275-282.
- Barrett, S.C. (2015). Foundations of invasion genetics: the Baker and Stebbins legacy. *Molecular Ecology* 9: 1927-41.
- Bateman, A.J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2(Pt. 3): 349-368.
- Bauer, R.T. (1986). Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 6: 313-325.
- Bawab, F.M., El-Sherief, S.S. (1988). Stages of the reproductive cycle of the female crab *Portunus pelagicus* (L., 1758) based on the anatomical changes of the spermatheca (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Crustaceana*, 54: 139-148.
- Beninger, P.G., Elner, R.W., Foyle, T.P., Odense, P.H. (1988). Functional anatomy of the male reproductive system and female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and the hypothesis for fertilization. *Journal of Crustacean Biology*, 8: 322-332.
- Beninger, P.G., Lanteigne, C., Elner, N.W. (1993). Reproductive processes revealed by spermatophore dehiscence experiments and by histology, ultrastructure and histochemistry of the female reproductive system in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). *Journal of Crustacean Biology*, 13: 1-16.
- Berril, M., Arsenault, M. (1982). Mating behavior of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Bulletin of Marine Science*, 32: 632-638.
- Bhargava, A., Fuentes, F.F. (2010). Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology*, 44: 250-66.

- Blanckenhorn, W.U., Hosken, D.J., Martin, O.Y., Reim, C., Teuschl, Y., Ward, P.I. (2002). The costs of copulating in the dung fly *Sepsis cynipsea*. *Behavioral Ecology*, 13: 353-358.
- Bolaños, J.A., Baeza, J.A., Hernandez, J.E., Lira, C., López, R. (2012). Population dynamics and reproductive output of the non-indigenous crab *Charybdis hellerii* in the south-eastern Caribbean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92: 469-474.
- Calado, T.C.S. (1996). Registro de *Charybdis hellerii* (Milne Edwards, 1867) em águas do litoral brasileiro (Decapoda: Portunidae). *Boletim de Estudos de Ciências do Mar*, 9: 175-180.
- Carqueija, C.R.G., Gouvêa, E.P. (1996). A ocorrência, na costa brasileira, de um Portunidae (Crustacea, Decapoda), originário do Indo-Pacífico e Mediterrâneo. *Nauplius*, 4:165- 168.
- Chambers, G.K., Curtis, C., Millar, C.D., Huynen, L., Lambert, D.M. (2014). DNA fingerprinting in zoology: past, present, future. *Investigative Genetics*, 5: 3.
- Cornell, S.J., Tregenza, T. (2007). A new theory for the evolution of polyandry as a means of inbreeding avoidance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274: 2873-2879.
- Cronin, L.E. (1947). Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of morphology*, 81: 209-239.
- Dennenmoser, S., Thiel, M. (2015). Cryptic Female Choice in Crustaceans. Cryptic Female Choice in Arthropods. *Springer International Publishing* pp.203-237.
- DiBattista, J.D., Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Hendry, A.P. (2008). Are indirect genetic benefits associated with polyandry? Testing predictions in a natural population of lemon sharks. *Molecular Ecology*, 17: 783-95.
- Diesel, R. (1989). Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): observations on sperm transfer, sperm storage and spawning. *Journal of Crustacean Biology*, 9: 266-277.
- Diesel, R. (1990). Sperm competition and reproductive success in a decapod *Inachus phalangium* (Majidae): A male ghost spider crab that seals off rivals sperm. *Journal of Zoology*, 220: 213-223.
- Diesel, R. (1991). Sperm competition and mating behavior in Brachyura. In: Bauer, R.T. & Martin, J.W. (eds), *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, New York, pp. 145-163.
- Dineen, J.F., Clark, P.F., Hines, A.H., Reed, S.A., Walton, H.P. (2001) Life history, larval description, and natural history of *Charybdis hellerii* (Decapoda, Brachyuran, Portunidae), an invasive crab in the western Atlantic. *Journal of Crustacean Biology*, 21: 774-805.
- Emlen, S.T., Oring, L.W. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, 197: 215-223.

- Evans, N. (2018). Molecular phylogenetics of swimming crabs (Portunoidea Rafinesque, 1815) supports a revised family-level classification and suggests a single derived origin of symbiotic taxa. *PeerJ*, 6: e4260.
- Farro, A.P.C., Rollo Jr, M.M., Silva Jr, J.M., Marino, C.L. (2008). Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for spinner dolphin (*Stenella longirostris*). *Conservation Genetics*, 9: 55-59.
- Fielder, D.R., Eales, A.J. (1972). Observations on courtship, mating and sexual maturity in *Portunus pelagicus* (L., 1766) (Crustacea, Portunidae). *Journal of Natural History*, 6: 273-277
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2010). Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press.
- Grosholz, E.D., Ruiz, G.M. (1996). Predicting the impact of introduced marine species: lessons from the multiple invasions of the European green crab *Carcinus maenas*. *Biological Conservation*, 78: 59-66.
- Guinot, D., Quenette, G. (2005). The spermatheca in podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implications. *Zoosystema*, 2: 267-342.
- Hartnoll, R.G. (1969). Mating in the Brachyura. *Crustaceana*, 16: 161-181.
- Hines, A.H., Jivoff, P.R., Bushmann, P.J., van Montfrans, J., Reed, S.A., Wolcott, D.L., Wolcott, T.G. (2003). Evidence for sperm limitation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bulletin of Marine Science*, 72: 287-310.
- Hinsch, G.W. (1988). Morphology of the reproductive tract and seasonality of reproduction in the golden crab, *Geryon fenneri* from the eastern Gulf of Mexico. *Journal of Crustacean Biology*, 8: 254-261.
- Innocenti, G., Vannini, M., Galil, B.S. (1998). Notes on the behavior of the portunid crab *Charybdis longicollis* Leene parasitized by rhizocephalan *Heterosaccus dollfusi* Boschma. *Journal of Natural History*, 32: 1577-1585.
- Jennions, M.D., Petrie, M. (2000). Why do females mate multiply? A review of genetic benefits. *Biological Reviews*, 75: 21-64.
- Jensen, P.C., Bentzen, P. (2004). Isolation and inheritance of microsatellite loci in the Dungeness crab (Brachyura: Cancridae: *Cancer magister*). *Genome*, 47: 325-331.
- Jensen, P.C., Bentzen, P. (2012). A molecular dissection of the mating system of the dungeness crab, *Metacarcinus magister* (Brachyura: Cancridae). *Journal of Crustacean Biology*, 32: 443-456.
- Jivoff, P., Hines, A.H. (1998). Female behaviour, sexual competition and mate guarding in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Animal Behaviour*, 55: 589-603.

- Jivoff, P.R., Hines, A.H., Quackenbush, L.S. (2007). Reproduction Biology and Embryonic Development. Em: The Blue Crab: *Callinectes sapidus*. Kennedy, V.S. & L.E. Cronin (eds). 2007. College Park, Maryland Sea Grant College, University of Maryland, 774 p.
- Johnson, P.T. (1980). Histology of the blue crab *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda. Praeger, New York. 440p.
- Johnson, S.L., Brockmann, H.J. (2013). Parental effects on early development: testing for indirect benefits of polyandry. *Behavioral Ecology*, art056.
- Jossart, Q., Wattier, R.A., Kastally, C., Aron, S., David, B., De Ridder, C., Rigaud, T. (2014). Genetic evidence confirms polygamous mating system in a crustacean parasite with multiple hosts. *PLoS One*, 9: e90680.
- Katsanevakis, S., Wallentinus, I., Zenetos, A., Leppäkoski, E., Çinar, M.E., Oztürk, B., Grabowski, M., Golani, D., Cardoso, A.C. (2014). Impacts of invasive alien marine species on ecosystem services and biodiversity: a pan-European review. *Aquatic Invasions*, 9: 391-423.
- Kerckhof, F., Haelters, J., Gollasch, S. (2007) Alien species in the marine and brackish ecosystem: the situation in Belgian waters. *Aquatic Invasions*, 2: 243-257.
- Kroll, R.M., Hawkins, W.E., Overstreet, R.M. (1992). Reproductive Components. In: Harrison, FW & AG Humes (eds.). Microscopic anatomy of invertebrates. New York: Wiley-Liss Inc., 10: 295-343.
- Lemaitre, R. (1995). *Charybdis hellerii* (Milne Edwards, 1867), a nonindigenous portunid crab (Crustacea: Decapoda: Brachyura) discovered in the Indian River lagoon system of Florida. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 108: 643-648
- López-Greco, L.S., Lopez, G.C., Rodriguez, E.M. (1999). Morphology of spermatheca in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Graspidae, Sesarminae). *Journal of Zoology*, 249: 490-493.
- López-Greco, L.S., Fransozo, V., Negreiros-Fransozo, M.L., Santos, D.C. (2009). Comparative morphology of the seminal receptacles of *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) (Brachyura: Ocypodoidea). *Zootaxa*, 2106: 41-50.
- Ma, H., Zou, X., Ji, X., Ma, C., Lu, J., Jiang, W., Xia, L., Li, S., Liu, Y., Gong, Y., Ma, L. (2013). Discovery and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in red crab (*Charybdis feriatus*). *Journal of genetics*, 92: e113-5.
- Mantelatto, F.L.M., Dias, L.L. (1999). Extension of the known distribution of *Charybdis hellerii* (A. Milne Edwards, 1867) (Decapoda, Portunidae) along the western tropical South Atlantic. *Crustaceana* 72: 617-620.
- Mantelatto, F.L.M., Garcia, R.B. (2001). Biological aspects of the nonindigenous portunid crab *Charybdis hellerii* in the western tropical South Atlantic. *Bulletin of Marine Science*, 68: 469-477.

- Mantelatto, F.L., Robles, R., Schubart, C.D., Felder, D.L. (2009). Molecular Phylogeny of the Genus *Cronius* Stimpson, 1860, with Reassignment of *C. tumidulus* and Several American Species of *Portunus* to Genus *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae). In: Martin, JW, Crandall, KA, Felder, DL (eds), *Crustacean Issues: Decapod Crustacean Phylogenetics*. CRC Press, pp 567-579.
- McLay, C.L., López-Greco, L.S. (2011). A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: How did a race to be first become a race to be last? *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 250: 378-406.
- Mirimin, L., Westgate, A., Rogan, E., Rosel, P., Read, A., Coughlan, J., Cross, T. (2009). Population structure of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) in the North Atlantic Ocean as revealed by mitochondrial and nuclear genetic markers. *Marine Biology*, 156: 821-83.
- Mizzan, L., Vianello, C. (2009). First record of *Charybdis* (*Charybdis*) *lucifera* (Fabricius, 1798) (Crustacea, Decapoda, Portunidae) in the Mediterranean Sea. *Bollettino del Museo civico di Storia naturale di Venezia*, 59: 27-30.
- Morán, R., Atencio, M. (2006). *Charybdis hellerii* (Crustacea: Decapoda: Portunidae), especie invasora em La Península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela. *Multiciencias*, 6: 202-209
- Nascimento, F.A., Zara, F.J. (2013). Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius*, 21: 161-177.
- Negri, M., Schubart, C.D., Mantelatto, F.L. (2018). Tracing the introduction history of the invasive swimming crab *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) in the Western Atlantic: evidences of high genetic diversity and multiple introductions. *Biological Invasions*, 20: 1771-1798.
- Ng, P.K.L., Guinót, D., Davie, P.J.F. (2008). Systema Brachyurorum: Part I. An Annotated Checklist of Extant Brachyuran Crabs of the World. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 17:1-286.
- Norman, C.P., Nuka, T., Miyazaki, T. (1999). Mating Behavior in *Thalamita picta* (Brachyura: Portunidae) and comparisons with congeneric species. *Crustacean Research*, 28: 16-23.
- Nosil, P., Funk, D.J., Ortiz, D. (2009). Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology*, 18: 375-402.
- Pinheiro, M.A.A., Fransozo, A. (1999). Reproductive behavior of the swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Crustacea, Brachyura, Portunidae) in captivity. *Bulletin of Marine Science*, 64: 243-253.
- Pinheiro, M.A.A., Fransozo, A. (2002). Reproduction of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Brachyura: Portunidae) on the Brazilian coast near 23°30'S. *Journal of Crustacean Biology*, 23: 416-428.

- Pyle, R., Cronin, E. (1950). The general anatomy of the Blue Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Chesapeake Biological Laboratory*, 87: 3-40.
- Ricciardi, A., Steiner, W.W., Mack, R.N., Simberloff, D. (2000). Toward a global information system for invasive species. *BioScience*, 50: 239-244.
- Rosa, R.S. (2014) New records of portunid crabs (Decapoda: Brachyura: Portunidae) from Sergipe, NE Brazil. *Check List* 10: 445-447.
- Rojas-Hernandez, N., Véliz, D., Pardo, L.M. (2014). Use of novel microsatellite markers for population and paternity analysis in the commercially important crab *Metacarcinus edwardsii* (Brachyura: Cancridae) *Marine Biology Research*, 10: 839–844.
- Ryan, E.P. (1967). Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* (Hersbt) (Brachyura: Portunidae) I. The male system. *Proceedings of the Symposium on Crustacea, Marine Biology Association India Ernakulam*, 2: 506-521.
- Sant'Anna, B.S., Watanabe, T.T., Turra, A., Zara, F.J. (2012). Relative abundance and population biology of the non-indigenous crab *Charybdis hellerii* (Crustacea: Brachyura: Portunidae) in a southwestern Atlantic estuary-bay complex. *Aquatic Invasions*, 7: 347-356.
- Sant'Anna, B.S., Branco, J.O., Oliveira, M.M.D., Boos, H., Turra, A. (2015). Diet and population biology of the invasive crab *Charybdis hellerii* in southwestern Atlantic waters. *Marine Biology Research*, 11: 814-823.
- Soulsbury, C.D. (2010). Genetic patterns of paternity and testes size in mammals. *PLoS One*, 5: e9581.
- Soundarapandian, P., Varadharajan, D., Ilavarasan, N., Kumar, J., Kumar, A. (2013). Mating Behaviour of Flower Crab, *Charybdis feriata* (Linnaeus). *Journal of Marine Science Research & Development*, 3: 3.
- Spalding, J.F. (1942). The nature and formation of the spermatophores and sperm plug *Carcinus maenas*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 83: 399-422.
- Stewart, M.J., Stewart, P., Soonklang, N., Linthong, V., Hanna, J.P., Duan, W., Prasert, S. (2010). Spermatogenesis in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and evidence for histones in mature sperm nuclei. *Tissue Cell*, 42: 137-150.
- Tavares, M., Amouroux, J.M. (2003). First record of the non-indigenous crab, *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) from French Guyana (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Crustaceana*, 76: 625-630.
- Tavares, M., Mendonça Jr., J.B. (1996). *Charybdis hellerii* (A. Milne Edwards, 1867) (Brachyura: Portunidae), eighth nonindigenous marine decapod recorded from Brazil. *Crustacean Research*, 25: 151-157.

- Thresher, R., Proctor, C., Ruiz, G., Gurney, R., MacKinnon, C., Walton, W., Rodriguez, L., Bax, N. (2003). Invasion dynamics of the European shore crab, *Carcinus maenas*, in Australia. *Marine Biology*, 142: 867-876.
- Vitousek, P.M., D'Antonio, C.M., Loop, L.L., Rejmánek, M., Westbrooks, R. (1997) Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zealand Journal of Ecology*, 21: 1-16.
- Wan, Q.H., Wu, H., Fujihara, T., Fang, S.G. (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, 25: 2165-2176.
- Waser, P.M., DeWoody, J.A. (2006). Multiple paternity in a philopatric rodent: The interaction of competition and choice. *Behavioral Ecology*, 17: 971-978
- Watanabe, T.T., Zara, F.J., Hattori, G.Y., Turra, A., Sant'Anna, B.S. (2015). Biological associations of color variation in the Indo-Pacific swimming crab *Charybdis hellerii*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87: 219-232.
- Wolcott, D.L., Hopkins, C.W.B., Wolcott, T.G. (2005). Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun: effects of male mating history, male size and season. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 319: 43-55.
- Yeh, F.Y., Boyle, R., Ye, T., Mao, Z. (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis, version 1.31. Alberta, Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta.
- Yue, G.H., Chang, A. (2010). Molecular evidence for high frequency of multiple paternity in a freshwater shrimp species *Caridina ensifera*. *PLoS One*, 9: e12721.
- Zara, F.J., Toyama, M.H., Caetano, F.H., López-Greco, L.S. (2012). Spermatogenesis, spermatophore and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*, 32: 249-262.
- Zara, F.J., Gaeta, H.H., Costa, T.M., Toyama, M.H., Caetano, F.H. (2013). The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae). *Acta Zoologica*, 94: 134-146.
- Zara, F.J., Pereira, G.R.R., Sant'Anna, B.S. (2014). Morphological Changes in the Seminal Receptacle During Ovarian Development in the Speckled Swimming Crab *Arenaeus cribrarius*. *The Biological Bulletin*, 227: 19-32.
- Zeh, J.A., Zeh, D.W. (2001). Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. *Animal Behaviour*, 61: 1051-1063.

Considerações finais

Considerações finais

1- Morfologia do sistema reprodutor

Por meio dos resultados deste estudo, podemos observar as diferenças entre o sistema reprodutor masculino de Portunidae nativo tipicamente produtor de “plug” espermático do gênero *Callinectes* e do siri invasor *Charybdis hellerii*. A diferença do volume dos *vasa deferentia*, além de uma composição química diferente entre as espécies, mostram indiretamente estratégias reprodutivas distintas. Desta maneira, em *Callinectes*, temos a produção de um grande volume de secreção, que vão formar o “plug” espermático no receptáculo seminal das fêmeas e espermatóforos com presença de parede. Já no caso de *C. hellerii*, temos um baixo volume de secreção, estocagem de espermatóforos em uma região distinta da maioria dos outros Portunidae, espermatóforos sem a presença de parede, o que confere deiscência por ação mecânica e osmótica.

As observações no sistema reprodutor masculino refletem nos resultados obtidos para o sistema reprodutor feminino, no qual observamos a presença de espermatozoides livres dentro do receptáculo seminal, juntamente com polissacarídeos ácidos, o que não é encontrado no receptáculo seminal vazio. Além disso, não observamos em nenhum momento a presença de “plug” espermático ou pacotes espermáticos o que juntamente com a secreção holócrina do receptáculo seminal, misture o material genético dentro dele.

2 – Comportamento reprodutivo e análise genética da prole

As investigações morfológicas do sistema reprodutor de *C. hellerii* deram evidências indiretas para a forma que esta espécie se reproduz. Em condições laboratoriais, juntamente com

o que foi observado em campo, vimos que *C. hellerii* se reproduz sem depender que a fêmeas esteja em estágio de muda. Estas observações, juntamente com os resultados morfológicos se refletiram no estudo genético da prole da espécie. *Charybdis hellerii* é comprovadamente uma espécie poliândrica. A hipótese de que o comportamento reprodutivo e morfologia do sistema reprodutor de *C. hellerii* segue o padrão mais comum em Portunidae foi refutada. Estas características aqui descritas são adicionais a outras já descritas por estudos anteriores, as quais em conjunto explicam como esta espécie é bem sucedida na invasão de novos habitats. Assim, com está aberta a possibilidade de que a cópula em estágio intermuda, ausência de “plug” espermático e poliandria descritos para *C. hellerii* serem um padrão para a subfamília Thalamitinae o que seria uma característica relacionada à filogenia deste grupo, devendo ser estudada na região de dispersão deste gênero, o Indo-pacífico.