

Análise do comportamento reprodutivo, ultraestrutura do sistema reprodutor e viabilidade de cultivo do caranguejo *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788) (Decapoda, Majoidea, Inachoididae)

Mariana Antunes

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Negreiros Fransozo

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Augusto Gregati

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas – Área de Zoologia, do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas – Área de Zoologia.

Botucatu – SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Mariana Antunes da.

Análise do comportamento reprodutivo, ultraestrutura do sistema reprodutor e viabilidade de cultivo do caranguejo aranha *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) / Mariana Antunes da Silva. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Maria Lucia Negreiros Fransozo
Coorientador: Rafael Augusto Gregati
Capes: 20400004

1. Decapode (Crustaceo). 2. Caranguejo - Reprodução.
3. Comportamento sexual dos animais. 4. Espermateca.
5. Cópula.

Palavras-chave: Cópula; Cultivo; Histologia; Receptáculo seminal; Vaso deferente.



NEBECC

Núcleo de Estudos em Biologia, Ecologia
e Cultivo de Crustáceos

“Jamais exigirei que você acredite em qualquer coisa, o importante é quanto à evidência é convincente pra você.”

(Neil deGrasse Tyson)

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”.

(Isaac Newton)

DEDICATÓRIA

*À minha querida vó Clarice (in memorian), meu exemplo de força e fé,
que tanto contribuiu para minha formação e que sempre se orgulhou
das minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Negreiros Fransozo, pela inestimável orientação e pela maneira carinhosa que sempre me tratou durante todos esses anos. Sempre preocupada com o meu bem estar e com o melhor para o meu futuro. Faltam-me palavras para expressar toda minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Rafael Augusto Gregati, por me apresentar ao mundo da aquariorfilia e me instigar a essa fascinante linha de pesquisa, por acreditar na minha capacidade para realização deste trabalho e sempre me apoiar em todos os momentos, além da amizade que persiste apesar da distância.

À Prof^a. Dr^a. Laura Suzana López Greco, pela honra de trabalhar ao seu lado, por todos os seus ensinamentos, pelo seu exemplo de competência e profissionalismo, pela hospitalidade carinhosa com que me recebeu em seu laboratório, juntamente com todos os seus alunos. Em especial ao Hernán e sua família que cederam sua casa, na qual fui tão bem acolhida.

Ao Prof. Dr. Fernando José Zara, pela amizade construída, por todas as condições oferecidas, pela paciência com que me ensinou princípios básicos de histologia e microscopia, pelo entusiasmo e conhecimento fundamentais, sem os quais não seria possível redigir grande parte desta tese. Aos amigos integrantes do IML, Tavani, Márcia, Maria Alice, Jean, Guilherme, Fernanda e Camila, sempre prestativos e solícitos, além de tornarem os dias de trabalho muito mais prazerosos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudo concedida e pelo apoio financeiro mediante os projetos: (CAPES-MINCYT #217/2012) e (CAPES-CIMAR #23038.004309/2014-51), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelos recursos concedidos (CNPq-Universal #481435/2011-5) e (CNPq-Universal #486337/2013-8), a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo financiamento do material utilizado (Biota #2010/50188-8) e ao NEBECC (Núcleo de Estudos em Biologia, Ecologia e Cultivo de Crustáceos), pela infraestrutura dos laboratórios e materiais disponíveis.

Ao ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) e a Polícia Federal, por concederem a licença para a coleta do material nas áreas estudadas.

Às operadoras de mergulho Omnimare, NDS, Orion Dive e as embarcações Primavera e Ubatuba Adventure dos amigos Passarinho e Daniel, respectivamente, pelo apoio logístico e excelente profissionalismo durante as coletas.

Ao meu amigo, agora Prof. Dr. Eduardo Bolla Jr, por me socorrer em todos os momentos de dúvida e agonia em relação ao cultivo, aquários, esquemas do corel, fotos, análises... Não caberia na tese tudo que você me ensinou!

Aos queridos amigos e excelentes profissionais Douglas e Samara, pela prazerosa parceria no início deste trabalho, que perdurou, apesar da distância, até o fim da redação desta tese, além da indispensável ajuda nas coletas, juntamente com o Daniel, que pacientemente aturava minha demora em abrir saquinhos e minha péssima flutuabilidade.

Às minhas amigas Daniela Pimenta (Valderrama) e Natália Salles (Cidinha) pela hospedagem e por todo apoio durante minha estadia em Jaboticabal.

Aos amigos Jairon C. Moura e Jamile Queiroz pelo empréstimo das câmeras para as filmagens descritas no terceiro capítulo desta tese.

Ao prof. Dr. Antônio Leão Castilho que não mediu esforços em me ajudar diante tantas adversidades climáticas e financeiras que enfrentamos durante a elaboração deste trabalho, juntamente com meus queridos amigos e parceiros de coleta Prof. Dr. Valter J. Cobo, Thiago M. Davanso e Isabela Moraes.

A todos os amigos do Nebecc e “Laborantonio”, em especial ao Raphael (Big hair) e Alexandre (Dino) pelos auxílios com a língua inglesa, as amigas Ges, Milena e Joyce por toda ajuda no cultivo, e pela parceria de todas as horas da amiguinha Isabela (Periquisa).

Ao Prof. Dr. Rogério C. da Costa (Cebola), por todo apoio e amizade e a todos os integrantes do LABCAM, pela amizade, parceria e momentos divertidos nas disciplinas, coletas e congressos. Em especial ao Abner, pela hospedagem sempre divertida na rep. do amor.

Ao Departamento de Zoologia e a Seção de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo apoio e estrutura disponibilizada, em especial aos seus funcionários: Juliana Ramos, Flávio da Silva, Hamilton A. Rodrigues, Silvio C. Almeida, Hervaldo M. Santos e Davi B.O. Müller por todo o auxílio, competência e profissionalismo.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e a minha família “botucuda” sempre presente e atuante... Aline, Priscila, Jairon, Jamile, Isabela, Nadayca e Bel.

Muito obrigada!

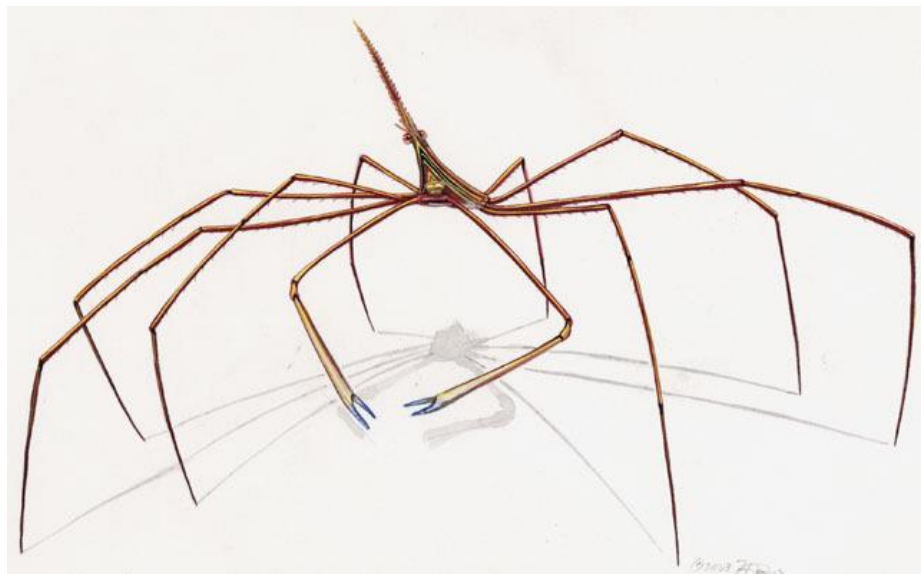
SUMÁRIO

Considerações Iniciais	1
Referências	7
Capítulo I: Morphological analysis of the females reproductive system of <i>Stenorhynchus seticornis</i> (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea (Invertebrate Biology 135(2): 75–86. 2016)	
.....	9
Capítulo II: Morfologia do sistema reprodutor masculino e mecanismos de deiscência dos espermatóforos de <i>Stenorhynchus seticornis</i> (Herbst, 1788) (Decapoda, Majoidea, Inachoididae)	
Resumo	21
Introdução	22
Material e Métodos	24
Resultados	26
Discussão	34
Referências	39
Capítulo III: Análise do comportamento de cópula do caranguejo ornamental <i>Stenorhynchus seticornis</i> (Herbst, 1788) (Decapoda, Majoidea, Inachoididae) em laboratório	
Resumo	44
Introdução	45
Material e Métodos	48
Resultados	50
Discussão	55
Referências	60

Capítulo IV: Efeitos da temperatura e salinidade na sobrevivência larval do caranguejo ornamental *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788) (Decapoda, Majoidea, Inachoididae): em laboratório com manejo de reprodutores e obtenção de larvas em um novo sistema recirculante

Resumo	66
Introdução	67
Material e Métodos	70
Resultados	74
Discussão	82
Referências	87
Considerações Finais	94

CONSIDERAÇÕES INICIAIS



CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os crustáceos estão entre os principais organismos marinhos comercializados com fins ornamentais, juntamente com os peixes e corais. As espécies recebem o status de “ornamentais”, principalmente, por possuírem uma coloração intensa e chamativa, além de apresentarem rusticidade para sua manutenção em aquários. Algumas espécies apresentam características que as tornam alvos ainda maiores de exploração, como hábitos de camuflagem, comportamentos complexos de associação com outras espécies, ou são responsáveis por alguma função específica no aquário. Invertebrados que se alimentam de algas indesejáveis ou de ectoparasitas são exemplos de organismos interessantes na aquariofilia. Tal interesse está concentrado, principalmente, em camarões carídeos, estenopodídeos, nos ermitões e nos caranguejos-aranha (Calado *et al.*, 2003a; 2003b; Gasparini *et al.*, 2005).

Desse modo, com o grande número de espécies exploradas, cujos valores no mercado são elevados, as tentativas em desenvolver técnicas de cultivo têm aumentado para as espécies mais populares. Esses cultivos, além de muito rentáveis e que podem ser desenvolvidos por unidades pequenas de produção, poderiam diminuir o impacto negativo da extração de organismos na natureza. Entretanto, existem ainda vários estrangulamentos para que o cultivo desses organismos possa ser realizado em uma escala comercial, de forma economicamente viável (de modo a competir com o preço dos organismos selvagens obtidos diretamente da natureza). Entre eles, a total dependência da coleta de fêmeas ovígeras selvagens para obtenção de larvas é um desses estrangulamentos, chamados popularmente como “gargalos de garrafa” (Calado *et al.*, 2008).

No entanto, o cultivo dessas espécies, ainda, depende da coleta de fêmeas ovígeras do ambiente natural, utilizadas como reprodutores. Contudo, se os acasalamentos realizados em laboratório e as desovas subsequentes exteriorizadas pelas fêmeas mantidas em cativeiro resultarem em larvas viáveis, haveria a redução do número de progenitores necessários para cultivo. Tal técnica reduziria o custo da atividade e promoveria a preservação desses recursos altamente valorizados, assegurando a sustentabilidade na indústria da aquariofilia (Tlusty, 2002; Penha-Lopes *et al.*, 2006).

O braquiúro *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788) (figura 1A), popularmente conhecido como “yellowline arrow crab” nos Estados Unidos e “caranguejo-aranha” no Brasil, foi a espécie utilizada para os registros comportamentais e avaliação da capacidade de reprodução em cativeiro devido, principalmente, à sua grande popularidade no mercado. Esta espécie de caranguejo possui alto interesse no mercado ornamental marinho mundial, ocorrendo com abundância em quase toda a costa brasileira. Além disso, já foi avaliada mediante a possibilidade de cultivo e demonstrou sucesso, com alta densidade de estocagem e altas taxas de sobrevivência e crescimento durante as fases de zoea e megalopa (Calado *et al.*, 2008; Mendes & Valença, 2008; Hernández *et al.*, 2012).

Adicionalmente, *S. seticornis* é muito resistente à vida em aquários, comumente recomendado para *hobistas* iniciantes (Debelius, 1999); não atacam peixes nem outros invertebrados em sistemas fechados e possuem uma coloração exuberante, com faixas amarelas brilhantes sobre um fundo escuro, bem como quelípodos azulados. A espécie tem ampla distribuição mundial, ocorrendo pelo Atlântico Oriental, desde Madeira até Ilhas Canárias e Angola e Atlântico Ocidental, desde a costa dos Estados Unidos (Florida), Golfo do México, Antilhas, Colômbia, Venezuela, Guianas até o Brasil (do Amapá ao Rio Grande do Sul), Uruguai e Argentina (Melo, 1996).



Figura 1 - *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788). Popularmente conhecido como “caranguejo aranha” ou “caranguejo seta”, esta é a espécie nativa de caranguejo marinho com interesse ornamental, selecionada para o presente estudo. (<http://www.gettyimages.com/photos/arrowcrab>).

Sistemas sexuais e padrões comportamentais são caracteres filogeneticamente informativos e podem auxiliar no entedimento sobre o agrupamento de espécies em determinadas famílias. Entre os representantes da superfamília Majoidea, os acasalamentos ocorrem, predominantemente, com machos e fêmeas com a carapaça calcificada, divergindo do padrão geral; enquanto a maioria dos caranguejos aquáticos acasala, estando a fêmea em estado de pós-ecdise recente (Jones & Hartnoll, 1997).

Neste contexto, a presente tese intitulada “Análise do comportamento reprodutivo, ultraestrutura do sistema reprodutor e viabilidade de cultivo do caranguejo aranha *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae)” pretende contribuir com informações básicas sobre o comportamento reprodutivo de uma espécie de caranguejos marinhos nativos, com interesse ornamental; além de ampliar o conhecimento a cerca da biologia reprodutiva da mesma espécie, a qual pertencente à superfamília Majoidea.

O primeiro e segundo capítulos visam o estudo detalhado das características morfo-funcionais, incluindo análise macro e microscópia dos sistemas reprodutor feminino e masculino, com o uso de microscopia de luz e eletrônica. Tais descrições possuem o intuito de avaliar a capacidade de estocagem de espermátóforos por fêmeas adultas, mantidas em condição de reprodutoras (tecnicamente chamadas matrizes), verificar a existência de espermátóforos no vaso deferente de machos em tamanho, ainda considerados imaturos e o entendimento dos mecanismos de deiscência dos espermátóforos.

No terceiro capítulo, os esforços foram direcionados à avaliação da capacidade de cópula e a reprodução, em laboratório da espécie em foco, utilizando-se técnicas observacionais para inferir sobre possíveis padrões.

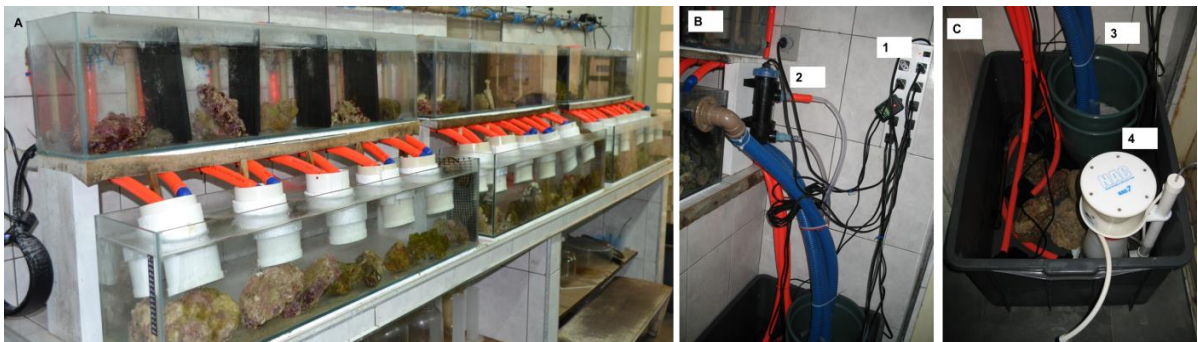
O quarto capítulo descreve e testa um modelo de larvicultura de pequeno porte, com baixo custo e avalia o efeito da combinação dos parâmetros salinidade e temperatura, ideal para aplicação na larvicultura de *S. seticornis* para a costa sudeste do Brasil.

Para a realização deste trabalho estabeleceu-se uma parceria entre dois laboratórios de pesquisa da UNESP: O Núcleo de Estudos em Biologia, Ecologia e Cultivo de Crustáceos - NEBECC, com sede principal no Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu (SP) e o *Invertebrate Morphology Laboratory* – IML, com sede no Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, com sede em Jaboticabal (SP). As

atividades relacionadas ao terceiro e quarto capítulos foram desenvolvidas no laboratório de cultivo do NEBECC; enquanto que, todos os procedimentos laboratoriais do primeiro e segundo capítulos foram realizados no IML.

Para a fase de larvicultura e de observação do comportamento de cópula, foram utilizados sistemas recirculante diferenciados. As fêmeas coletadas ovígeras na natureza foram mantidas no sistema desenvolvido para capturação larval, descrito no quarto capítulo desta tese (Figura 2). Após a eclosão, as larvas foram transferidas para recipientes de vidro com diferentes tratamentos (Figura 3). Enquanto que, os casais selecionados para os acasalamentos foram mantidos no sistema desenvolvido por Bolla Jr. (2014), quando esse autor avaliou os efeitos da acidificação oceânica no desenvolvimento larval do caranguejo intertidal *Eriphia gonagra* (Fabricius, 1781) (Figura 4).

Figura 2 - (A) Sistema recirculante para manutenção de fêmeas ovígeras e capturação



larval. (B) e (C) *Sump* de recirculação. 1- quadro elétrico; 2- filtro ultravioleta; 3- filtragem mecânica e biológica, composta por lã acrílica, carvão ativado, e cerâmica, para fixação de bactérias nitrificantes; 4- *Skimmer* de proteínas.

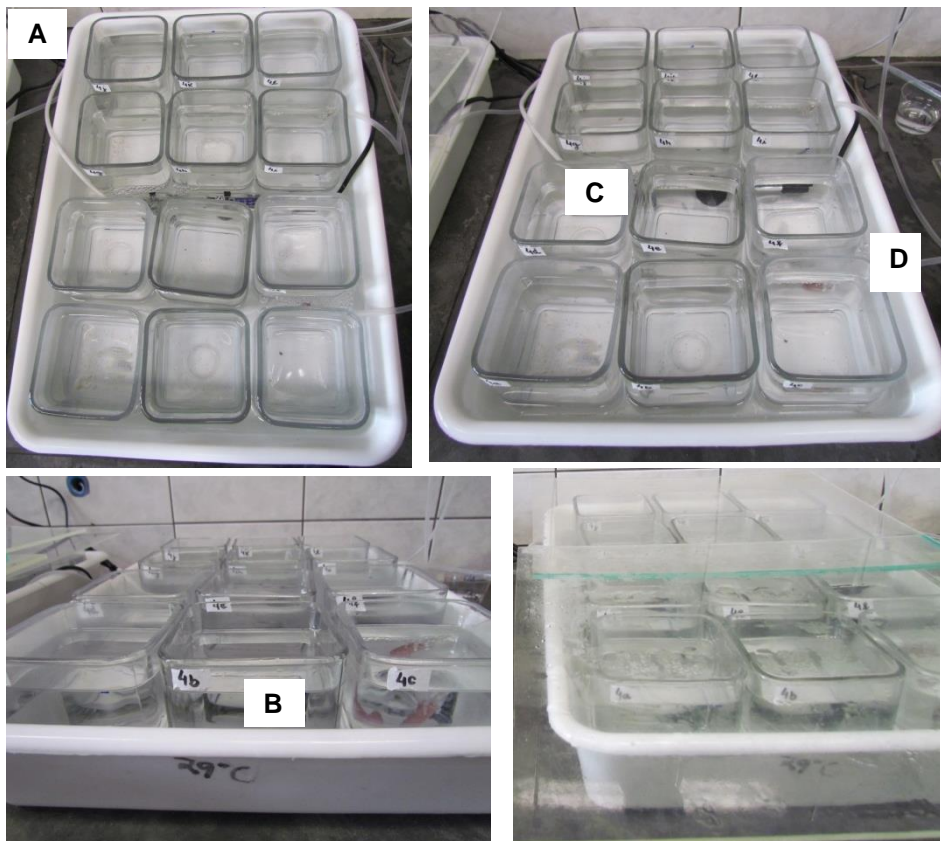


Figura 3 - (A) Sistema para criação de larvas de caranguejos marinhos ornamentais. (B) Recipientes de vidro (500 ml). (C) Aquecedor com termostato. (D) Pedra porosa acoplada em mangueira de silicone para aeração e recirculação da água nas bandejas.



Figura 4 - recirculante
manutenção dos casais selecionados para observação do comportamento de cópula.

Sistema
para
para

Referências

- Bolla Jr., E. A. 2014. Aquecimento global e acidificação oceânica: efeitos da temperatura, salinidade e dióxido de carbono no desenvolvimento larval do caranguejo intertidal *Eriphia gonagra* (Crustacea, Decapoda, Eriphiidae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. 151 p.
- Calado, R.; Lin, J.; Rhyne, A.L.; Araújo, R. & Narciso, L. 2003a. Marine ornamental decapods-popular, pricey, and poorly studied. *Journal of Crustacean Biology*, 23(4): 963-973.
- Calado, R.; Narciso, L.; Araújo, R. & Lin, J. 2003b. Overview of marine ornamental shrimp aquaculture. pp. 221-230 In: Cato, J. C. & Brown, C. L. (Eds.) *Marine Ornamental Species: Collection, Culture & Conservation*. Iowa State Press,
- Calado, R.; Pimentel, T.; Vitorino, A.; Dionísio, G. & Dinis, M. T. 2008. Technical improvements of a rearing system for the culture of decapod crustacean larvae, with emphasis on marine ornamental species. *Aquaculture*, 285: 264-269.
- Debelius, H. 1999. *Guía de crustáceos del mundo: gambas, cangrejos, anfípodos, langostas, gambas mantis*. Grupo Editorial M&G Difusión, 321 p.
- Gasparini, J.L.; Floeter, S.R.; Ferreira, C.E.L. & Sazima, I. 2005. Marine ornamental trade in Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 14: 2883-2899.
- Hernández, J.E.; Palazón-Fernández, J.L.; Hernández, G. & Bolaños, J. 2012. The effect of temperature and salinity on the larval development of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachidae) reared in the laboratory. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(3): 505-513.
- Jones D.R. & Hartnoll R.G. 1997. Mate selection and mating behavior in spider crabs. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 44: 185-193.
- Melo, G.A.S. 1996. *Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do Litoral Brasileiro*. São Paulo, Plêiade/FAPESP. 603p.
- Mendes, G. N. & Valença, A. R., 2008. Observações preliminares sobre o desenvolvimento larval do caranguejo aranha *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788) (Decapoda: Brachyura: Majidae) em laboratório. *Boletim do Instituto de Pesca*, 34: 325-329.
- Penha-Lopes, G.; Rhyne, A.L.; Lin, J. & Narciso, L. 2006. Effects of temperature, stocking density and diet on the growth and survival of juvenile *Mithraculus*

forceps (A. Milne Edwards) (Decapoda: Brachyura: Majidae). *Aquaculture Research*, 37: 398-408.

Thlusty, M. 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*, 205: 203-219.

CAPÍTULO I

Morphological analysis of the females reproductive
system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura:
Inachoididae) and comparisons with other Majoidea

Mariana Antunes, Fernando José Zara, Laura S. López-Greco, and Maria
Lucia Negreiros-Fransozo

Invertebrate Biology 135(2): 75–86. 2016.



Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea

Mariana Antunes,¹ Fernando José Zara,² Laura S. López-Greco,^{3,4} and Maria Lucia Negreiros-Fransozo^{1,a}

¹NEBECC Study Group on Crustacean Biology, Ecology and Culture, Institute of Biosciences and IEAMar-UNESP, São Paulo State University, 18618-970 Botucatu, SP, Brazil

²IML Invertebrate Morphology Laboratory, Department of Applied Biology, Aquaculture Center (CAUNESP), and IEAMar-UNESP, São Paulo State University, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

³Biology of Reproduction and Growth of Decapod Crustaceans Laboratory, Department of Biodiversity and Experimental Biology, University of Buenos Aires, Buenos Aires, C1428 EHA, Argentina

⁴IBBEA, CONICET-UBA, Buenos Aires, C1428EGA, Argentina

Abstract. We examined the female reproductive system of the yellowline arrow crab *Stenorhynchus seticornis* by means of histological and histochemical techniques. Mature specimens obtained in the field were kept in the laboratory for mating experiments. After 24 h, newly mated females were dissected, and their reproductive tract routinely processed for embedding in historesin. The specimens examined each possessed a pair of kidney-shaped seminal receptacles (SR), and these we classified as ventral type, based on the location of the oviduct opening. The mesodermal dorsal region (DR) of SR consisted of a stratified epithelium with scaly cells, while the ectodermal ventral region (VR) was composed of a simple epithelium covered by a cuticle. The oviduct opened at the transition region (TR) between DR and VR and had no velum. The simple epithelium of TR had more folds on the face of the oviduct opening. The vagina exhibited the same features as the TR epithelium and was contiguous to VR, anchored by muscles. In the lumen, from one to three strata of sperm packets were observed, the dorsal one containing free sperm, and the most ventral stratum, spermatophores. An acidophilic glycoprotein layer enclosed the strata. Spermatophores in the ventral stratum were enclosed in a voluminous secretion, composed by acid polysaccharides most likely from the last male mated. The ventral-type receptacle, stratified sperm packets, and polyandry, usually observed in females of Majoidea, suggest the occurrence of sperm competition in *S. seticornis*, favoring the sperm of the last male mated, as its sperm mass is located near the opening of the female oviduct.

Additional key words: crab reproduction, seminal receptacle, spermatophores, histology

In some decapod species, the arrangement of sperm packets within the seminal receptacles (SR) is correlated with morphology of the storage organ, the molting stage of the female during mating, and the origin of the ejaculated material at the time of fertilization (last/first copulation) (Parker 1970; Diesel 1991; Sainte-Marie 2007; González-Pisani et al. 2012). Studies on the reproductive behavior of majoids indicate that in some species, such as *Inachus dorsettensis* (PENNANT 1777), *Libinia emarginata* LEACH 1815, and *Libinia spinosa* H. MILNE EDWARDS 1834, mating occurs between males and hard-shelled

females (González-Gurriarán et al. 1998; Van Den Brink & McLay 2009; Sal Moyano et al. 2010). In other majoids, among them *Chionoecetes opilio* (FABRICIUS 1788), *Chionoecetes bairdi* RATHBUN 1893 and *Maja squinado* (HERBST 1788), both hard and soft-shelled females could mate (Baal 1953; Carlisle 1957; Adams & Paul 1983; Paul 1984). However, copulation does not ensure that the female will use the sperm of a particular male. Females of different arthropods can store the genetic material of more than one male in the SR, resulting in sperm competition (Parker 1970).

The SR of brachyuran females are extensions of the genital tract used for reception, storage, spermatophore dehiscence, and sperm maintenance

^aAuthor for correspondence.
 E-mail: mlnf@ibb.unesp.br

(González-Pisani et al. 2012; Zara et al. 2014), thereby allowing sperm material to be stored for extended periods for fertilization of consecutive broods without copulation. This can minimize the impact of male scarcity caused by fishing (Diesel 1989; Hinsch 1991; Paul & Paul 1992; González-Gurriarán et al. 1998; Sampedro et al. 1999; Sainte-Marie 2007; González-Pisani et al. 2012), a frequent consequence of the male-biased capture strategy used in many crab fisheries. A detailed evaluation of sperm viability before and after fertilization is necessary to understand the resilience of populations of the crabs to fishing pressure (Pardo et al. 2013). Thus, understanding the role of this storage organ is not only of biological interest, but also essential for the sustainable exploitation of crab species of commercial interest. Crab fishery policies should take into account the mating system of the exploited species to avoid indirect negative effects of management (Pardo et al. 2015).

Seminal receptacles of brachyuran females are classified as either dorsal or ventral, based on their position relative to the oviducts (Diesel 1991). In dorsal receptacles, the opening of each oviduct lies dorsal to the seminal receptacle, and ventral to the vagina (as in Portunidae, Xanthidae, Cheiragonidae, Tricopeltariidae, and Pilumnidae) (see McLay & López Greco 2011). In ventral receptacles, both oviduct and vagina openings are located in the ventral region of the receptacle (as in Cancridae, Calappidae, Geryonidae, Leucosiidae, Parthenopidae, Parathelphusidae, Corystidae, Ocypodidae, Oregonidae, Hymenosomatidae, Pinnotheridae, Ocypodidae, Ucididae, Sesarmidae, and some species of Majoidea) (Diesel 1991; López-Greco et al. 2009; McLay & López Greco 2011). However, other studies have shown that not all species fit precisely into this classification. For instance, in *Leurocyclus tuberculatus* (H. MILNE EDWARDS & LUCAS 1842) and *L. spinosa*, the connection of the oviduct with the seminal receptacle occurs between the dorsal and ventral regions in both species and thus is an intermediate type (González-Pisani et al. 2012). Among Majoidea, the intermediate type was previously observed in *Macrocoeloma trispinosum* (LATREILLE 1825) studied by McLay & López Greco (2011) and *Omala-cantha bicornuta* (LATREILLE 1825) by Windsor & Felder (2014).

The arrangement of reproductive organs, especially the connection between oviduct and seminal receptacle in relation to the vagina, has implications for how sperm of different males are used for fertilization (Diesel 1991; Urbani et al. 1998; Sainte-Marie 2007). In Majoidea, the transition

region between dorsal and ventral epithelia has two types of modifications, the velum and the cuticle folds, which are similar structures that play different roles depending on species or condition of the receptacle.

According to Diesel (1989), the first and/or the last male to inseminate the female has a greater probability of having his sperm used in fertilization of oocytes because of proximity of the spermatozoa with the oviduct. Other studies of sperm competition in crabs (Urbani et al. 1998; Van Den Brink & McLay 2009) also support these conclusions.

The species *Stenorhynchus seticornis* (HERBST 1788), commonly known as “yellowline arrow crab” in the United States and “spider-crab” in Brazil, is heavily harvested for ornamental purposes, and numerous studies have aimed at developing large-scale rearing methods (Debelius 1999; Calado et al. 2003a,b; Gasparini et al. 2005). However, there are only two studies on the reproductive biology of *S. seticornis*. Okamori & Cobo (2003) found that females of this species produce large eggs and small clutches, a strategy related to the type of larval development. Cobo (2002) studied the breeding period and observed a high proportion (>60%) of females carrying eggs in all seasons, indicating a continuous reproduction pattern.

Without detailed knowledge of this species' reproductive biology, rearing techniques cannot be improved, and aquacultural techniques that might alleviate harvesting pressure on wild populations cannot be developed. In the present study, we examined and described the macroscopic and microscopic functional anatomy of the seminal receptacle of *S. seticornis*. Additionally, we studied the pattern of seminal fluid storage in newly mated females to investigate the possibility of sperm competition.

Methods

Animal samples and macroscopic procedures

We caught crabs manually by SCUBA diving in coastal areas of the Ubatuba region, including Rapada Island (23°25'S; 44°54'W) and Couves Island (23°25'S; 44°51'W), São Paulo, Brazil. Once collected, crabs were placed in aerated coolers containing water from the collecting site. Crabs were individually placed in plastic containers provided with many small perforations to allow water circulation, and transported to the laboratory (Nebecc, Unesp) at Botucatu, state of São Paulo, Brazil, where experiments were performed. In the laboratory, we randomly selected five adult male–

female pairs of different sizes and isolated each pair with a plastic screen that divided the aquarium. Crabs were fed daily with pieces of penaeid shrimp and commercially packaged food for ornamental fishes. All five aquaria were provided with a recirculating filtration system (12-h photoperiod, salinity of 35, and temperature of $26 \pm 1^\circ\text{C}$). We recorded the mating behavior of *Stenorhynchus seticornis* using a digital video camera. The size of males ranged 11.9–14.9 mm in carapace width (CW), and females, 10.3 mm–12.9 mm in CW.

For the examination of the reproductive system, recently mated mature females were anesthetized by thermal shock 24 h after copulation, dissected, and fixed in 4% paraformaldehyde in 0.2 mol L^{-1} sodium phosphate buffer (pH=7.4) for 24 h. Some receptacles immersed in fixing solution were photographed under stereomicroscope for anatomical description. After fixation, samples were rinsed with the same buffer, dehydrated in an ascending ethanol series (70–95%), and embedded in historesin (glycol methacrylate). After polymerization, blocks were sectioned with a rotary microtome. The 5–7 μm sections were mounted on slides, and stained with hematoxylin and eosin (HE) (Junqueira & Junqueira 1983), avoiding xylene and ethanol bath (Sant'Anna et al. 2010).

Additionally, contents of the seminal receptacle of two recently mated mature females with stratified sperm packets were stained with bromophenol blue and xylydine ponceau (Mello & Vidal 1980) for proteins (Pearse 1985). Staining with PAS and Alcian blue was carried out for neutral and acid polysaccharides, respectively, as well as the simultaneous staining with these dyes for the detection of the predominant polysaccharide (Junqueira & Junqueira 1983).

The mean SR size of the five females examined, including those used in the histological analysis, was calculated using the largest length \times largest width of each SR. The relative standard deviation (RSD%) was calculated to examine the size variation of SR analyzed. The values obtained were correlated with carapace width (CW) of each individual.

Results

Anatomy of the female reproductive system

In *Stenorhynchus seticornis*, the female reproductive system consisted of a pair of ovaries connected by an oviduct, a pair of seminal receptacles (SR) displaced to the anterior region of the cephalotho-

rax and underneath the branchiostegite, and a vaginal canal anchored by muscles. The relative standard deviation of the SR revealed a size variation of 21% in length ($1.9 \pm 0.4 \text{ mm}$) and 21.4% in width ($1.4 \pm 0.3 \text{ mm}$). The vagina originated from the SR, extending anteriorly and ending in the vulva. The latter opened on the ventral side of the female body, in the sixth cephalothoracic sternite. No remains of an external sperm plug were observed in the opening of the vulva (Fig. 1A). In mature females, ovaries were connected to a calyx-shaped oviduct (OD), along with mature oocytes, narrowing toward the SR. The calyx of eggs and the oviduct were filled with a material consisting of yellow refringent lipid granules that were visible in this region when it was ruptured in aqueous medium, and the material appeared to function as a plug (Fig. 1B,C). From a dorsal-ventral view, the SR was positioned internally on the sixth cephalothoracic sternite but may extend beyond the seventh and fifth sternites, up to the fourth cephalothoracic sternite. The position may vary according to size of the seminal receptacle (full or empty) and size of the female (Fig. 1C). The vagina formed an elongated tube with at least two sets of muscles (Fig. 1D,E,F). The first set consisted of lateral muscles that originated from the vagina and extended obliquely toward the thoracic sternite (Fig. 1E,F). The second set of muscles ran parallel to the length of the vagina from the sternum to the ventral region of SR, near the oviduct opening (Fig. 1F,G). Macroscopically, the oviduct extended toward the ventral region of SR (Fig. 1B,D,G,H).

Histology and histochemistry of the female reproductive system

In medial sagittal sections, the seminal receptacle was kidney shaped, with the ovary located dorsal to this structure, while the oviduct extended toward the ventral region. In the lumen of SR of newly mated females, sperm packets were observed in different strata from ventral to dorsal regions (Fig. 2A).

The oviduct was composed of a glandular epithelium with apocrine cells with a large lucent vesicle that once released, filled the lumen of the oviduct with lipid material (Fig. 2B). This material was present along the entire oviduct forming a lipid plug (Fig. 2C,D). No cellular division was verified in this part of the oviduct. The oviduct opened ventrally to the SR, after the mesodermal dorsal epithelium and before the beginning of the transition region, between the ventral and dorsal epithelia (Fig. 2D–F).

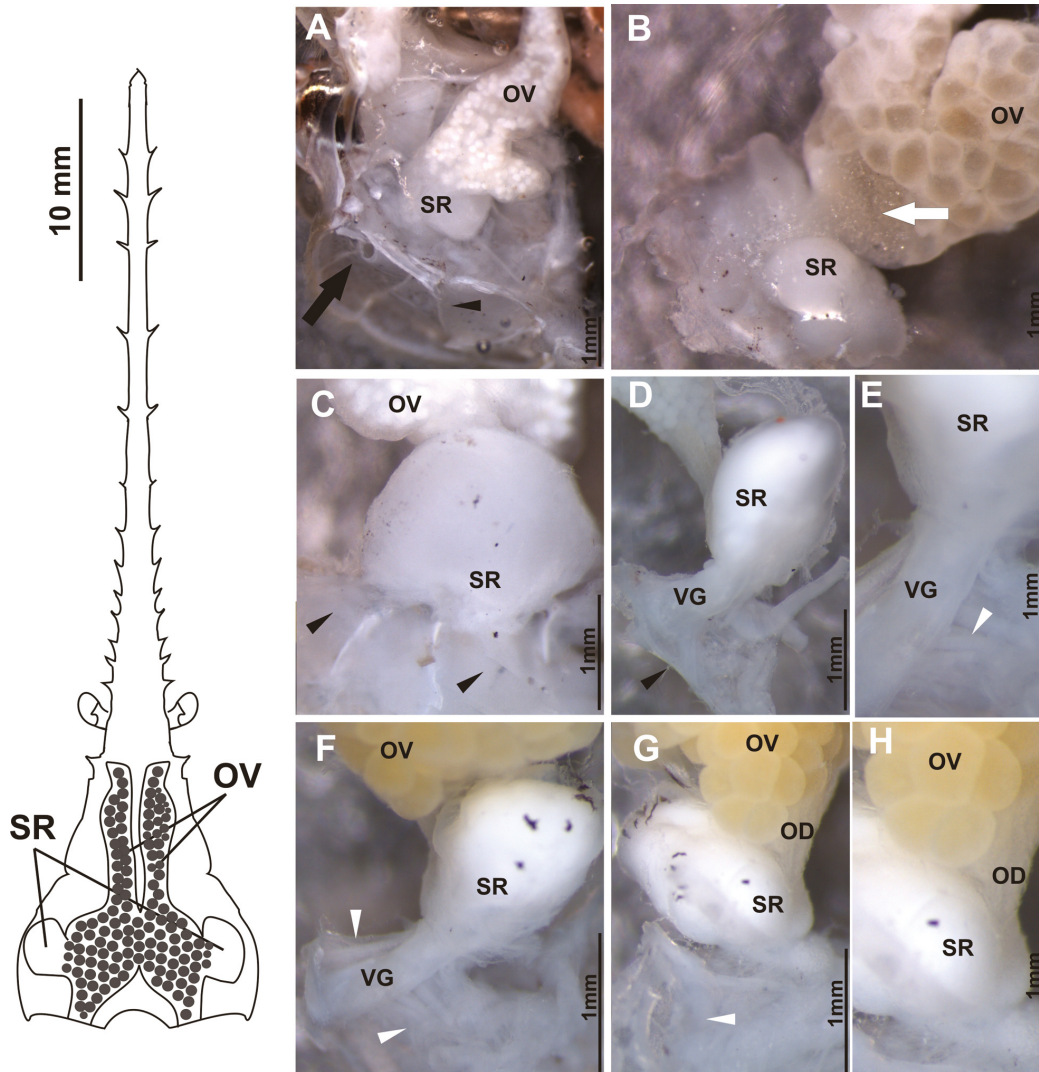


Fig. 1. Diagram of the female reproductive system in *Stenorhynchus seticornis* (left). Gross morphology of the mature female reproductive system 24 h after mating (right). **A.** Ovaries (OV) and seminal receptacles (SR) at intermediate stage of development. Vagina opening (black arrow) anchored by a cuticle (black arrowhead). **B.** Transition region between OV and SR covered by yellow and refringent lipid granules (white arrow). **C.** The pair of SR are kidney-shaped and anchored by a cuticle (black arrowhead). **D.** The vagina (VG) is contiguous with the transition region. **E.** Detail of the vagina anchored by muscles (white arrowhead). **F.** VG and SR showing musculature (white arrowhead), lateral view. **G.** SR connected with oviduct (OD), lateral view. **H.** OD opened at the transition between dorsal and ventral regions.

The epithelium in the transitional region was characterized by several folds, which were smaller facing the opening of the ovary and more prominent in the region opposite to the latter (Fig. 2A,D–F). After the transition region, the ventral epithelium was lined by a cuticle. This epithelium formed a sac in the region opposite the ovary opening (Fig. 2C–E). The epithelium of the ventral region was characterized by cubic cells with central nuclei, similar to that of the vaginal epithelium (Fig. 2E).

The vagina had two main sets of muscles. One lateral set consisted of oblique fibers originating from the ventral region of SR, and along one of the sides of the vagina to the sternum; the second set of muscles ran perpendicular to the axis of the vagina anchored at the base of SR, near the oviduct opening, extending to the sternum (Fig. 2C).

The mesodermal dorsal epithelium of SR was stratified, and in the last stratum, cells with heterochromatic nuclei and scaly cells were seen

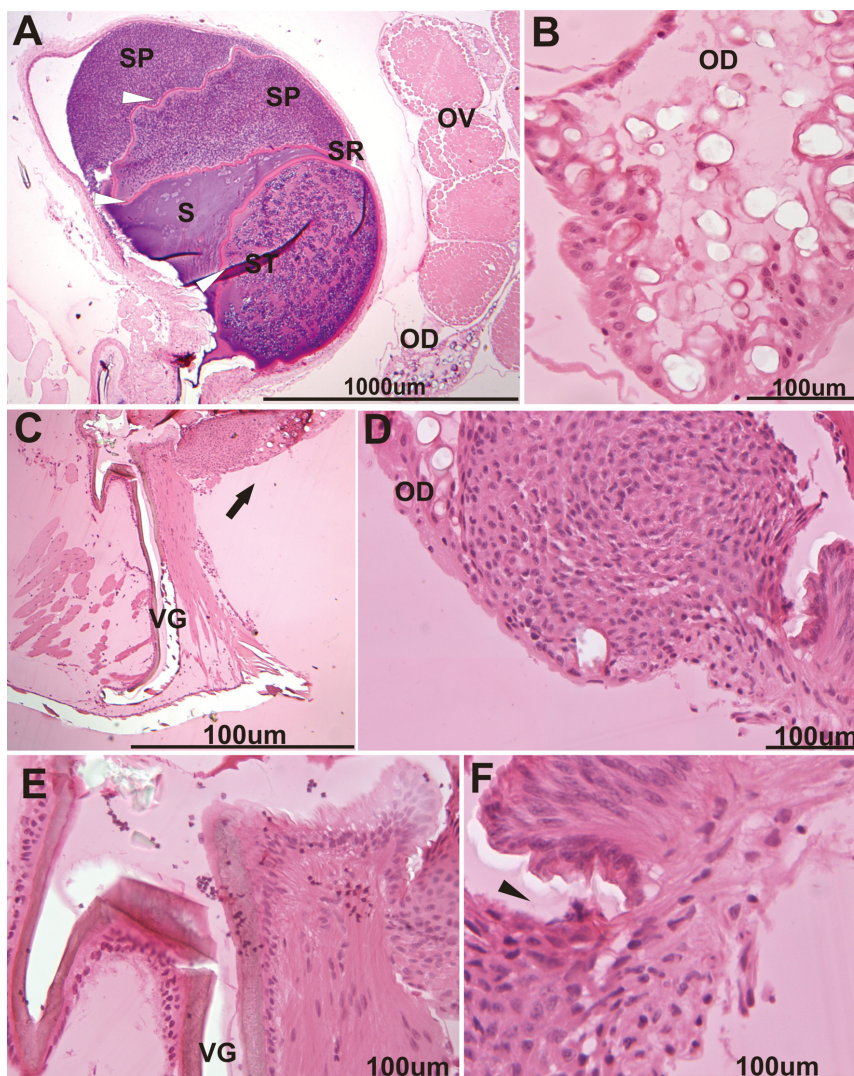


Fig. 2. A. Mature female reproductive system 24 h after mating. Longitudinal sections under light microscopy. Seminal receptacles (SR) with three sperm packets containing spermatophores (ST) or free spermatozoa (SP) and a secretion (S) that delimited the sperm packet (white arrowhead). B. Oviduct (OD) lacked a velum. C. Vagina (VG) encased in simple epithelium, anchored by muscles and contiguous to the ventral region. The oviduct opened at the transition between dorsal and ventral regions (black arrow). D. Detail at the transition region and oviduct (OD). E. The simple epithelium of the transition region had more folds on the face of the oviduct opening, which were covered by a cuticle. F. The dorsal region possessed a stratified epithelium with scaly cells (black arrowhead).

(Fig. 3A,B). In the SR lumen, sperm packets were mainly concentrated near the dorsal epithelium (Fig. 2A, 3A). One to three sperm packets were found in newly mated females in the laboratory. Those closest to the ventral region had spermatophores, and the two dorsal packets were filled with only free sperm, each one delimited by an acidophilic secretion resembling a wall. Sperm in the most dorsal packets were immersed in a basophilic secretion (Fig. 3A–C). The most ventral sperm packet was separated from the others by a basophilic secretion (Fig. 3A,C,D,E). The main

characteristic of this more ventral sperm packet was the presence of round spermatophores immersed in basophilic secretion and delimited by an acidophilic secretion resembling a wall (Figs. 3A,D,E, 4A).

The histochemical analysis revealed that free sperm as well as spermatophores were immersed in a protein secretion. However, the sperm packet with spermatophores stained more strongly with xylydine ponceau than did the free sperm. The secretion that delimited the sperm packet was strongly positive to proteins (Fig. 4B). The secretions of packets con-

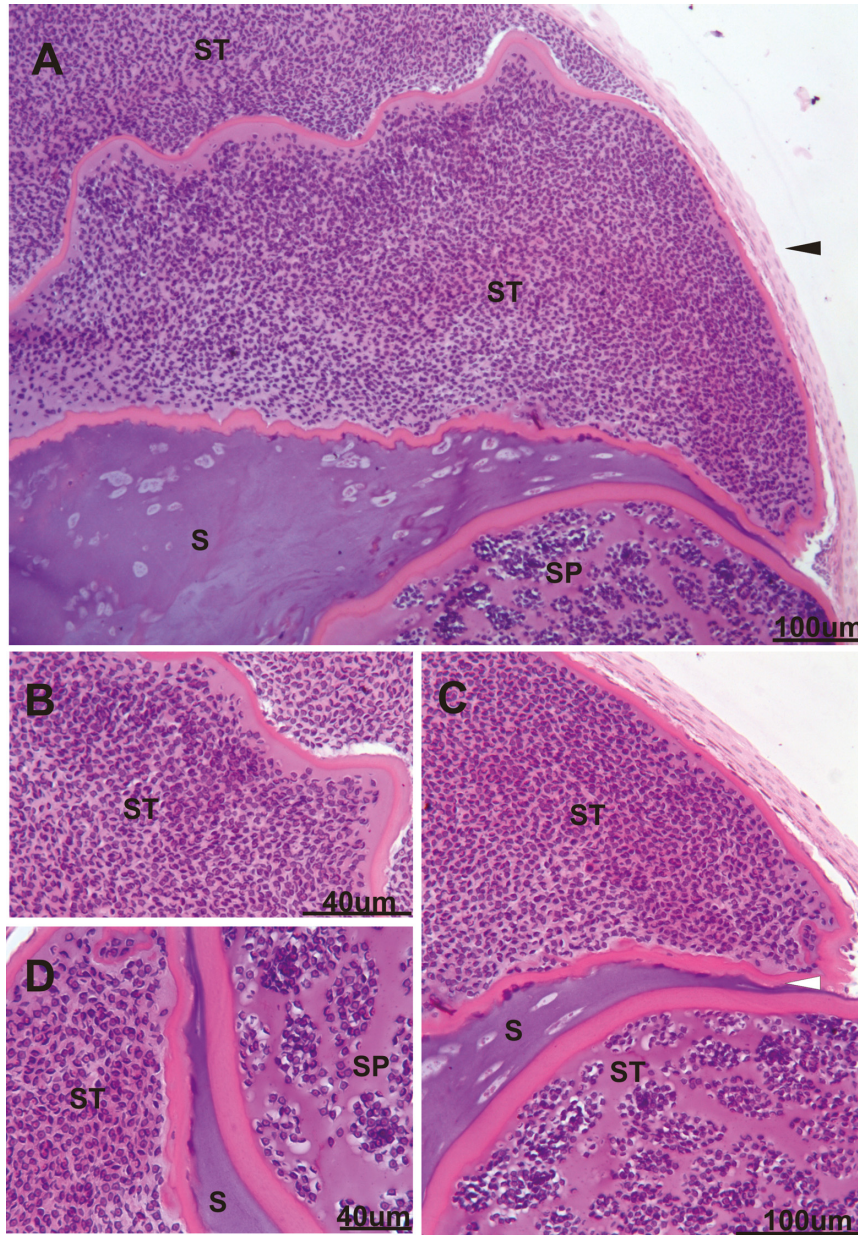


Fig. 3. A. Mature female seminal receptacles (SR) 24 h after mating. A. SR with three sperm packets in different strata, two with free spermatozoa (SP), those closest to the ventral region with spermatophores (ST). The dorsal region with stratified epithelium with scaly cells (black arrowhead). B. SP positioned in dorsal and intermediate region. C. Hematoxylin and eosin staining with ventral ST and intermediate SP in a sperm packet surrounded by acidophilic and glycoprotein layer resembling a wall (white arrowhead) with voluminous secretion (S) composed of acid polysaccharides. D. Hematoxylin and eosin staining of the region between ventral and intermediate sperm packet.

taining only free sperm and the secretions of the spermatophores stained strongly for neutral polysaccharides (Fig. 4A,B,C).

On the other hand, staining of acid polysaccharides was less intense in strata containing free sperm than in those containing spermatophores. In addition, the secretion that surrounded the sperm packet and resembled a wall was negative to

Alcian Blue (Fig. 4D). The simultaneous staining for both polysaccharides confirmed that the secretion of the packet containing spermatophores was predominantly composed of acid polysaccharides, while the packets with free sperm consisted mostly of neutral polysaccharides (Fig. 4E). The results of the histochemical analysis are summarized in Table 1.

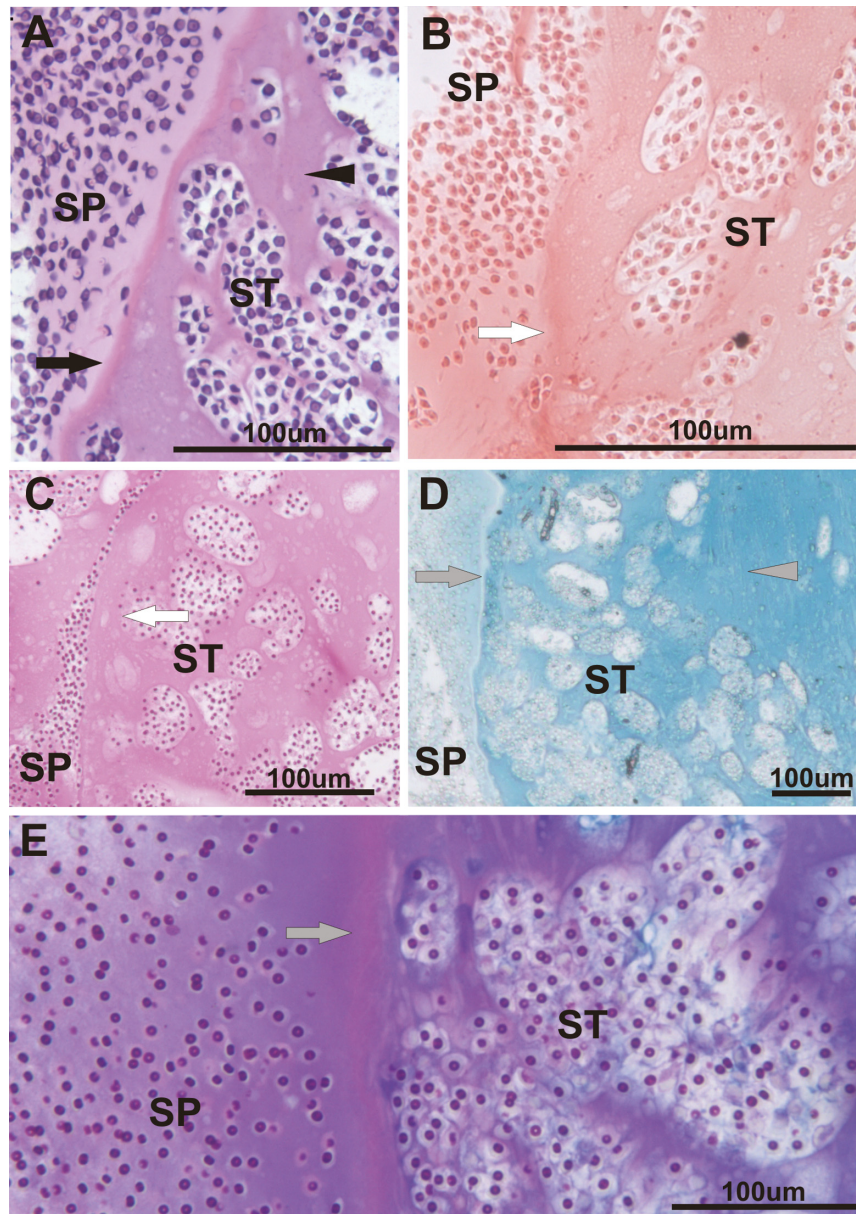


Fig. 4. A. Mature female seminal receptacles 24 h after mating. Hematoxylin and eosin staining shows basophilic secretion (black arrow) with spermatozoa (SP), spermatophores (ST), and an acidophilic secretion resembling a wall (black arrowhead). (B and C) The secretion that delimited the sperm packet was strongly positive to proteins using xylydine ponceau (white arrow). D. Staining of acid polysaccharides was less intense in strata containing free sperm (gray arrow) than in those containing spermatophores (gray arrowhead). In addition, the secretion that surrounded the sperm packet and resembled a wall was negative to Alcian Blue. E. The simultaneous staining for both polysaccharides confirmed that the secretion of the packet containing spermatophores was predominantly composed of acid polysaccharides, while the packets with free sperm consisted mostly of neutral polysaccharides (gray arrow).

Discussion

The connection of the oviduct with the seminal receptacle in *Stenorhynchus seticornis* in the ventral region, compatible with hard-female mating, is consistent with most of the descriptions and observations

reported for Majoidea (Hartnoll 1969; Diesel 1991; McLay & López Greco 2011). However, beyond the absence of velum and sperm plug, which are typically found in Portunidae (Hartnoll 1969), some peculiarities were observed regarding the anatomy of the oviduct. The position of receptacles and the shape of ovaries

Table 1. Histochemical staining pattern of free spermatozoa, spermatophores, and spermatophore wall in *Stenorhynchus seticornis* female.

Histochemical compound	Sperm packet		
	Free spermatozoa	Spermatophores	Spermatophore wall
Acid polysaccharides	++	+++	+++
Neutral polysaccharides	+++	+++	–
Proteins	++	+++	+++

+++ , strongly positive; ++, positive; –, negative.

may be associated with the triangular shape of the crab, which allows the ovary to be displaced centrally, occupying a large portion of the cephalothoracic cavity.

In mature females of *S. seticornis*, the oviduct is filled with refringent granules that act as a plug, blocking access from the oviduct to the seminal receptacle during ovarian development. This feature is similar to the “valve-like tissue” observed in the freshwater crab *Eriocheir sinensis* H. MILNE EDWARDS 1853 (Lee & Yamazaki 1990) and the “holocrine transfer tissue” in Pinnotheridae (Becker et al. 2011). In *S. seticornis*, the cells of the transition region between the oviduct and the SR contain an apocrine instead of holocrine secretion. This secretion of the transition region may not enter the SR during ovarian development, as observed for Pinnotheridae (Becker et al. 2011). Further studies should be carried out on this tissue throughout the gonadal cycle. In *E. sinensis* this tissue acts as a valve, allowing mature oocytes to move into the oviduct and preventing sperm from entering when oocytes are released for fertilization. It also obstructs communication between SR and oviduct in non-ovigerous females (Lee & Yamazaki 1990).

The seminal receptacle in *S. seticornis* had a dorsal region with a mesodermal stratified epithelium and scaly cells, and a ventral region lined by a cuticle. However, the transition between these regions lacks a velum, a structure found in most majoids (see Table 2). Instead, near the connection of the ventral region with the oviduct there are folds, as has also been described in *Chionoecetes opilio* and *Leurocyclus tuberculatus* (Sainte-Marie & Sainte-Marie 1998; González-Pisani et al. 2012). The folds are larger and more prominent in the transition region on the opposite side of the oviduct opening, and smaller in the transition region, adjacent to the oviduct. According to Sainte-Marie & Sainte-Marie (1998), the folds in the transition region guide the ejaculates directly to the vagina, and tend to favor the most recent male because they conduct oocytes predominantly to the last sperm packet. Also, the presence of strong muscles underneath these folds in *S. seticornis* may play an important role during the passage of oocytes associated with the fertilization process, without an intermediary fertilization chamber as those formed by folds in *C. opilio* (Sainte-Marie & Sainte-Marie 1998). In *Inachus phalangium*

Table 2. Anatomical differences in the transition region between the seminal receptacle and the oviduct in different families of Majoidea. Receptacles are classified as “dorsal” if the oviduct is opposite the vagina, “ventral” if the oviduct is beside the vagina, and “intermediate” if it lies in between (McLay & López Greco 2011).

Species	Family	Transition region	Oviduct opening into receptacle	Reference
<i>Stenorhynchus seticornis</i>	Inachoididae	Folds	Ventral	Present study
<i>Leurocyclus tuberculatus</i>	Inachoididae	Folds	Intermediate	González-Pisani et al. (2012)
<i>Inachus phalangium</i>	Inachidae	Velum	Ventral	Diesel (1991)
<i>Inachus communissimus</i>	Inachidae	Velum	Ventral	Diesel (1991)
<i>Libinia spinosa</i>	Epialtidae	Velum	Intermediate	González-Pisani et al. (2012)
<i>Pisa tetraodon</i>	Epialtidae	Velum	Ventral	Diesel (1989)
<i>Maja verrucosa</i>	Majidea	Velum	Ventral	Diesel (1989)
<i>Chionoecetes opilio</i>	Oregoniidae	Folds	Ventral	Sainte-Marie & Sainte-Marie (1998)

(FABRICIUS 1775), *I. communissimus* RIZZA 1839, *Pisa tetraodon* (PENNANT 1777), and *Maja verrucosa* H. MILNE EDWARDS 1834, the velum controls the quantity of sperm used in the ventral region that acts as a fertilization chamber, while the dorsal region acts as a sperm storage chamber (Diesel 1991). In the case of *L. spinosa*, this occurs only when the seminal content in the receptacle is small with only free sperm inside, typical of spawned females (González-Pisani et al. 2012).

The outer layer of the dorsal region of the seminal receptacle of *S. seticornis* consists of a flexible epithelium formed by conjunctive tissue and lined internally by a glandular epithelium. This epithelium is highly stratified in *C. opilio*, *L. tuberculosus*, *M. squinado*, *Hyas araneus* (LINNAEUS 1758), and *Hyas coarctatus* (LEACH 1816), and provides an environment in which spermatozoa are stored for extended periods (McLay & López Greco 2011). According to Beninger et al. (1988), the elastic fibers observed in the epithelium of the dorsal region of the receptacle allow the expansion of the organ during mating, when the duct of the vagina is open. The epithelium of the dorsal chamber of *Libinia spinosa* and *I. phalangium* is composed of layers of cylindrical cells lined by holocrine cells. The ventral region has a simple epithelium of cylindrical cells internally lined by layers of cuticle. The transition region between the dorsal and ventral chambers consists of oval cells with elongated nuclei and muscle fibers (Diesel 1991; Sal Moyano et al. 2010).

In *S. seticornis*, the ventral epithelium exhibits the same characteristics observed in the vaginal epithelium composed of cubic cells with central nuclei. Two groups of muscles support the vagina and contract the opening of the vagina and vulva, allowing access by the male pleopods during mating, control water inflow and entry of spermatophores into the receptacle, and flex the abdomen during spawning (Watson 1970; Beninger et al. 1988). While some species such as *L. tuberculosus*, *L. spinosa*, and *H. araneus* have a “vulvar valve,” a flexible membrane continuous with the vaginal wall that internally blocks the vulva (Hartnoll 1968; González-Pisani et al. 2012), *S. seticornis* lacks such a structure.

The arrangement of sperm packets observed in newly mated females of *S. seticornis* is similar to that reported for other Majoidea, in which packages are stored in the dorsal region of the receptacle. (Diesel 1989; Sainte-Marie & Sainte-Marie 1998). Twenty-four hours after mating, the packet positioned more ventrally still contained apparently intact spermatophores, similar to that observed in *C. opilio*. In

the latter, spermatophores are densely aggregated and intact after transfer (Beninger et al. 1988). Benhalima & Moriyasu (2000) reported two types of spermatophores based on the composition of the wall surrounding them. These authors suggested that some spermatophores rupture during mating, while others persist and are stored in the receptacle. This indicates that fertilization by the last male is ensured due to the quantity of spermatophores capable of immediate dehiscence (Benhalima & Moriyasu (2000). Diesel (1989, 1990) observed that in mating experiments, males of *I. phalangium* transfer a single sperm packet, enclosed by sperm gel, to the lowermost region of each receptacle, a behavior similar to that observed in *S. seticornis*.

On the other hand, in histological sections of receptacles of adult individuals of *L. spinosa* no intact spermatophores were observed, indicating that spermatophores rupture during mating; this pattern is likely to favor sperm from the last male when there is sperm competition among stored ejaculates (Sal Moyano et al. 2010). The presence of free sperm in the dorsal chamber of the receptacle and absence of spermatophores in the ventral region indicate that *L. spinosa* does not store sperm for extended periods (Sal Moyano et al. 2010; González-Pisani et al. 2012). These authors suggested that this species, as well as *L. tuberculosus*, mate only once during the breeding season, using all sperm stored for each brood. Based on the scarce quantity of secretion in the receptacle of *S. seticornis*, spermatozoa are apparently stored for a short period and used rapidly. However, further studies are needed to determine shelf life of sperm packets in strata.

The chemical composition of secretions that fill the receptacle and surround the sperm packets consist mainly of proteins, combined with acid and neutral polysaccharides. Bactericidal and bacteriostatic activities have been attributed to acid polysaccharides. The source (and role) of secretions found in the receptacle of *S. seticornis* cannot be determined from our study because they could be mixed with secretions introduced by the male during insemination (Beninger et al. 1993). Possible roles of secretions include antimicrobial action, especially against bacteria (Johnson 1980; Beninger et al. 1993; Jensen et al. 1996; Jayasankar & Subramoniam 1997; Zara et al. 2014), and removal of dead sperm (Sal Moyano et al. 2010). These acid polysaccharides continue to be produced after spermatophore dehiscence, indicating that the wall that surrounds spermatophores acts as a protective capsule for spermatozoa during mating (Zara et al. 2014).

The basophil secretion surrounding the packet of spermatophores found in the most ventral region of the receptacle might be produced by the male and transferred with sperm during mating. During ejaculation, crab males transfer first a large volume of seminal plasma, followed by a small volume of spermatophores (Diesel 1991; McLay & López Greco 2011). The seminal plasma and spermatophores are stored separately; spermatophores harden and form a wall, and the seminal plasma becomes thicker (sperm gel), acting in the displacement of ejaculates from previous mating (Ryan 1967; Diesel 1991). The sperm packet with spermatophores observed in the receptacle of *S. seticornis* is similar to those observed in females of the majoids *I. phalangium* and *C. opilio*, in which sperm packets were considered to be individual ejaculates from a single male (Diesel 1989, 1990; Urbani et al. 1998, respectively).

Studies using genetic markers have demonstrated that in crabs with a ventral receptacle, the sperm of the last male is the most likely to be used, mainly because of the proximity of the ventral region with the fertilization site (Diesel 1990; Koga et al. 1993; Urbani et al. 1998). In *Metacarcinus magister* (DANA 1852), microsatellites were used to determine paternity of embryos produced through controlled laboratory mating and from mated females in the wild. Multiple paternity was discovered in clutches from controlled matings and in 40% of clutches carried by crabs of unknown mating history (Jensen & Bentzen 2012). Among species with female sperm storage organs and polyandry, the mechanisms of sperm competition often result in single paternity. Such mechanisms include sperm stratification (in which the last male displaces previous ejaculates to the dorsal region of the receptacle), and probably removal of sperm (males remove previous ejaculates with gonopods) (Birkhead & Hunter 1990; Beninger et al. 1991; Urbani et al. 1998). The position, insertion, and types of setae of the first gonopod, together with the male's hook-shaped gonopods, suggest that this structure functions in the removal of spermathecal contents prior to a consecutive mating. These features may reduce sperm competition within the spermatheca (Beninger et al. 1991). Other studies have hypothesized that the underlying rosette glands could discharge the secreted seminal fluid through gonopod pores during copulation (Diesel 1989). While this function seems implausible for *I. phalangium* due to the reduced length of these setae (Rorandelli et al. 2008), the role of gonopods in sperm competition in *S. seticornis* and other majids needs further analysis.

In conclusion, because the mature females of *S. seticornis* we examined were probably inseminated in the wild and our histological sections were obtained after mating in the laboratory, the arrangement of ejaculates in the SR may be a result of sperm stratification. In addition, the packets containing free sperm may have originated from prior copulations in the wild, while the packet with intact spermatophores was most likely from the more recent mating observed in the laboratory. Thus, *S. seticornis* may be a good model for studies on sperm competition.

Acknowledgments. We thank IML coworkers for laboratory assistance, and Nebec members D. F. R. Alves, S. P. Barros-Alves, and D. J. M. Lima for their assistance in the field. Financial support for research was provided by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel—CAPES (CAPES-MINCYT #217/2012) to LSLG and MLNF, (CAPES-CIMAR #23038.004309/2014-51) to FJZ, Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq—Universal #481435/2011-5) to MLNF, (CNPq—Universal #486337/2013-8) to FJZ, and São Paulo Research Foundation FAPESP (Biota #2010/50188-8) to FJZ. This study was carried out in compliance with current Brazilian state and federal regulations on wild animal collecting (license # 13383 Sisbio).

References

- Adams AE & Paul AJ 1983. Male parents size, sperm storage and egg-production in the crab *Chionoecetes bairdi* (Decapoda, Majidae). *Int. J. Invertebr. Rep.* 6: 181–187.
- Baal HJ 1953. Behavior of spider crab in the presence of *Octopus*. *Nature* 171: 887.
- Becker C, Brandis D, & Storch V 2011. Morphology of the female reproductive system of European pea crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae). *J. Morphol.* 272: 12–26.
- Benhalima K & Moriyasu M 2000. Structure and function of the posterior vas deferens of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Invertebr. Reprod. Dev.* 37: 11–23.
- Beninger PG, Elnor RW, Foyle TP, & Odense PH 1988. Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *J. Crust. Biol.* 8: 322–332.
- Beninger PG, Elnor RW, & Poussart Y 1991. The gonopods of the majid crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). *J. Crust. Biol.* 11: 217–228.
- Beninger PG, Lanteigne C, & Elnor RW 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* (Fabricius). *J. Crust. Biol.* 13: 1–16.
- Birkhead TR & Hunter FM 1990. Mechanisms of sperm competition. *Trends Ecol. Evol.* 5: 48–52.
- Calado R, Lin J, Rhyne AL, Araújo R, & Narciso L 2003a. Marine ornamental decapods-popular, pricey, and poorly studied. *J. Crust. Biol.* 23(4): 963–973.
- Calado R, Narciso L, Araújo R, & Lin J 2003b. Overview of marine ornamental shrimp aquaculture. In: *Marine Ornamental Species: Collection, Culture & Conservation*. Cato JC & Brown CL, eds., pp. 221–230. Iowa State Press, Ames, Iowa.
- Carlisle D 1957. On the hormonal inhibition of moulting in decapod Crustacea. 2. The terminal anecdyosis in crabs. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 36: 291–307.
- Cobo VJ 2002. Breeding period of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* from Couves Island, south-eastern Brazilian coast. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 82: 1031–1032.
- Debelius H 1999. Guía de crustáceos del mundo: gambas, cangrejos, anfípodos, langostas, gambas mantis. Grupo Editorial M&G Difusión, S.L., Elche (Alicante), Spain. 321 pp.
- 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. *J. Crust. Biol.* 9: 266–277.
- 1990. Sperm competition and reproductive success in the decapod *Inachus phalangium* (Majidae): a male ghost spider crab that seals off rivals' sperm. *J. Zool. Lond.* 220: 213–223.
- 1991. Sperm competition and evolution of mating behavior in brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae). In: *Crustacean Sexual Biology*. Bauer R & Martin J, eds., pp. 145–163. Columbia University Press, New York.
- Gasparini JL, Floeter SR, Ferreira CEL, & Sazima I 2005. Marine ornamental trade in Brazil. *Biodivers. Conserv.* 14: 2883–2899.
- González-Gurriarán E, Fernández L, & Muinõ R 1998. Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 220: 269–285.
- González-Pisani X, Barón P, & López Greco LS 2012. Functional anatomy of the female reproductive systems of two spider crabs (Decapoda, Majoidea). *Invertebr. Biol.* 131: 61–74.
- Hartnoll RG 1968. Morphology of the genital ducts in female crabs. *Zool. J. Linn. Soc.* 47: 279–300.
- 1969. Mating in the Brachyura. *Crustaceana* 16: 161–181.
- Hinsch G 1991. Structure and chemical content of the spermatophores and seminal fluid of reptantian decapods. In: *Crustacean Sexual Biology*. Bauer R & Martin J, eds., pp. 290–307. Columbia University Press, New York.
- Jayasankar V & Subramoniam T 1997. Proteolytic activity in the seminal plasma of the mud crab, *Scylla serrata* (Forsk.). *Comp. Biochem. Physiol.* 116: 347–352.
- Jensen PC & Bentzen P 2012. A molecular dissection of the mating system of the Dungeness crab, *Metacarcinus magister* (Brachyura: Cancridae). *J. Crust. Biol.* 3: 443–456.
- Jensen PC, Orensanz JM, & Armstrong DA 1996. Structure of the female reproductive tract in the *Dungeness crab* (*Cancer magister*) and implications for the mating system. *Biol. Bull.* 190: 336–349.
- Johnson PT 1980. *Histology of the Blue Crab, Callinectes sapidus a Model for the Decapoda*. Praeger Scientific, New York. 456 pp.
- Junqueira LCU & Junqueira LMMS 1983. *Técnicas Básicas de Citología e Histologia*, 1st ed. Santos Press, São Paulo. 124 pp.
- Koga T, Henmi Y, & Murai M 1993. Sperm competition and the assurance of underground copulation in the sand-bubbler crab *Scopimera globosa* (Brachyura: Ocypodidae). *J. Crust. Biol.* 13: 134–137.
- Lee TH & Yamazaki F 1990. Structure and function of a special tissue in the female genital ducts of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis*. *Biol. Bull.* 178: 94–100.
- López-Greco LS, Fransozo V, Negreiros-Fransozo ML, & Santos DC 2009. Comparative morphology of the seminal receptacles of *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) (Brachyura, Ocypodoidea). *Zootaxa* 210: 41–50.
- McLay CL & López Greco LS 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? *Zool. Anz.* 250: 378–406.
- Mello MSL & Vidal BC 1980. *Práticas de Biologia Celular*. Edgar Blücher-FUNCAMP, São Paulo. 69 pp.
- Okamori CM & Cobo VJ 2003. Fecundity of the *Stenorhynchus seticornis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 83: 979–980.
- Pardo LM, Riveros M, Fuentes JP, & López-Greco L 2013. Functional morphology of the seminal receptacle in the crab *Metacarcinus edwardsii*. *Invertebr. Biol.* 132: 386–393.
- Pardo LM, Riveros MP, Fuentes JP, Hernández NR, & Veliz D 2016. An effective sperm competition avoidance strategy in crabs drives genetic monogamy despite evidence of polyandry. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 70: 73–81.
- Parker GA 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev.* 45: 525–567.
- Paul AJ 1984. Mating frequency and viability of stored sperm in the tanner crab *Chionoecetes bairdi* (Decapoda, Majidae). *J. Crust. Biol.* 4: 375–381.
- Paul AJ & Paul JM 1992. Second clutch viability of *Chionoecetes bairdi* Rathbun (Decapoda: Majidae) inseminated only at the maturity molt. *J. Crust. Biol.* 12: 438–441.
- Pearse AGE 1985. *Histochemistry: Theoretical and Applied*. Churchill Livingstone, Edinburgh. 624 pp.
- Rorandelli R, Paoli F, Cannicci S, Mercati D, & Giusti F 2008. Characteristics and fate of the spermatozoa of

- Inachus phalangium* (Decapoda, Majidae): description of novel sperm structures and evidence for an additional mechanism of sperm competition in Brachyura. *J. Morphol.* 269: 259–271.
- Ryan EP 1967. Structure and function of the reproductive system of the crab, *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). II. The female system. *Mar. Biol. Assoc. India Symp. Ser.* 2: 522–544.
- Sainte-Marie B 2007. Sperm demand and allocation in decapod crustaceans. In: *Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems*. Duffy JE & Thiel M, eds., pp. 191–210. Oxford University Press, New York.
- Sainte-Marie G & Sainte-Marie B 1998. Morphology of the spermatheca, oviduct, intermediate chamber, and vagina of the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). *Can. J. Zool.* 76: 1589–1604.
- Sal Moyano MP, Gavio MA, & Cuartas EI 2010. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. *Helgol. Mar. Res.* 64: 213–221.
- Sampedro MP, González-Gurriarán E, Freire J, & Muñío R 1999. Morphometry and sexual maturity in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in Galicia, Spain. *J. Crust. Biol.* 19: 578–592.
- Sant’Anna BS, Turra A, & Zara FJ 2010. Simultaneous activity of male and female gonads in intersex hermit crabs. *Aquat. Biol.* 10: 201–209.
- Urbani N, Sainte-Marie B, Sévigny JM, Zadworny D, & Kuhnlein U 1998. Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 55: 1104–1113.
- Van Den Brink AM & McLay CL 2009. Use of the sterile male technique to investigate sperm competition, storage and use in a pillbox crab, *Haliscarcinus cookii* (Brachyura: Hymenosomatidae). *J. Crust. Biol.* 29: 62–69.
- Watson J 1970. Maturity, mating and egg laying in the spider crab, *Chionoecetes opilio*. *J. Fish. Res. Board Can.* 27: 1607–11616.
- Windsor AM & Felder DL 2014. Molecular phylogenetics and taxonomic reanalysis of the family Mithracidae Macleay (Decapoda: Brachyura: Majoidea). *Invertebr. Syst.* 28: 73–145.
- Zara FJ, Pereira GRR, & Sant’Anna BS 2014. Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius*. *Biol. Bull.* 227: 19–32.

CAPÍTULO II

Morfologia do sistema reprodutor masculino e
mecanismos de deiscência dos espermatóforos de
Stenorhynchus seticornis (Herbst, 1788) (Decapoda,
Majoidea, Inachoididae)

Resumo

Por meio da descrição do trato reprodutor masculino do caranguejo *Stenorhynchus seticornis*, utilizando microscopia de luz (ponto de vista histológico e histoquímico) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) do vaso deferente (VD), foi possível propor como ocorre à formação dos pacotes espermáticos no receptáculo seminal de fêmeas recém-copuladas. Adicionalmente, foi investigada a morfologia do primeiro par de gonopódios e os mecanismos de deiscência dos espermatóforos (ST) do vaso deferente (machos), e do receptáculo seminal (SR) de fêmeas recém-copuladas. O par de testículos é tipo tubular e o par de VD consiste de três porções: anterior (AVD), dividida em proximal (AVDp) preenchida por espermatozoides livres (SP) e distal (AVDd) com espermatóforos em formação (ST); porção mediana (MVD), com espermatóforos totalmente formados; e posterior (PVD) com secreções granulares. O par de glândulas acessórias (ACG), que produz somente secreção, está localizado na região de transição entre a MVD e PVD. Os STs com diferentes tamanhos, proveniente da MVD dos machos observados não sofreram deiscência por hidratação em água do mar, enquanto que os STs provenientes do RS das fêmeas sofreram rápida deiscência quando submetidos ao mesmo experimento. A MEV revelou a presença de dentes na porção distal dos gonopódios (machos), que podem contribuir para a ruptura da parede externa do ST, durante a transferência espermática. As secreções da PVD e ACG são transferidas juntamente com os espermatóforos e são responsáveis pela formação dos estratos espermáticos observados nos RS de fêmeas recém-copuladas, contribuindo para o processo de competição espermática.

Palavras-chave: testículo, vaso deferente, histologia, glândula acessória, Inachoididae

Introdução

Estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino e a formação de espermátóforos de Decápodes são essenciais para a compreensão dos processos de maturação sexual das espécies, além de viabilizar ensaios de monitoramento de populações em ambiente natural e/ou cultivo das espécies em cativeiro (Jerry 2001; Akarasanon et al. 2004; López Greco et al. 2007). O sistema reprodutor de machos das espécies de braquiúros já estudados previamente é constituído por um par de testículos, os quais são classificados como lobular ou tubular (Simeó et al. 2009; Stewart et al. 2010; Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013; Tiseo et al. 2014). De acordo com Minagawa et al. (1994) and Nagao & Munehara (2003), testículos lobulares são compostos por numerosos lóbulos seminíferos no mesmo estágio de maturação, acinus ou cistos conectados a um ducto seminífero como um eixo central, enquanto que testículos tubulares consistem de um único túbulo testicular altamente convoluto, com células em diferentes estágios de maturação. O testículo do tipo tubular tem o vaso deferente dividido numa região anterior ou proximal (AVD), onde os espermátóforos são produzidos, uma região mediana (MVD) e uma região posterior ou distal (PVD) (Zara et al. 2012; Klaus et al. 2013).

Em algumas espécies de braquiúros, principalmente Majoidea, os machos apresentam um par de glândulas acessórias (ACG) na porção distal do vaso deferente. Esta glândula pode variar em relação à posição, morfologia e função, as quais causam algumas controvérsias com relação à sua denominação (Simeó et al. 2009). Quando posicionadas na região da MVD são denominadas de divertículos e/ ou expansões e na PVD de cecos, atuando na produção de secreções que auxiliam a transferência dos espermátóforos (Diesel 1989; Simeó et al. 2009; Tiseo et al. 2014). Os espermátóforos são transportados pelos ductos ejaculatórios, que são conectados ao primeiro par de pleópodos, os quais são modificados em gonopódios (Beninger et al. 1991). Os gonopódios são utilizados na transferência dos espermátóforos para dentro do receptáculo seminal da fêmea, no momento da cópula (Bauer 1986). O formato peculiar dos gonopódios e a presença de microestruturas, tais como cerdas e dentes, sugerem que as mesmas possuem diferentes funções durante a cópula (mecanismo de inserção = função das cerdas) (Sal Moyano et al. 2011). A presença de dentes no canal ejaculatório do primeiro par de gonopódios pode contribuir para o rompimento dos espermátóforos,

durante a transferência espermática, atuando como um mecanismo adicional para a deiscência (Rorandelli et al., 2008). O processo causador da deiscência dos espermátóforos no receptáculo seminal dos caranguejos varia entre as espécies (Beninger et al. 1993). Em *Chionoecetes opilio* (Fabricius, 1788), a ruptura da parede dos espermátóforos ocorre por meio de absorção de água, quando o espermátóforo está exposto à água do mar Beninger et al. (1988, 1993). Enquanto que, no portunoidea *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818), a ruptura dos espermátóforos ocorre somente na presença de secreções do receptáculo seminal da fêmea, durante a dissolução do plug espermático, assim como observado em estudos anteriores (Spalding 1942; Adiyodi e Anilkumar 1988; Diesel 1989; Zara et al. 2014).

Em estudo recente sobre o receptáculo seminal de fêmeas recém-copuladas de *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788), Antunes et al. (2016) sugerem que o arranjo dos pacotes espermáticos observados nas fêmeas, pode ser resultado de estratificação espermática e que o papel dos gonopódios nos mecanismos de competição espermática devem ser analisados com maior detalhe. Visto que, a posição, inserção e os tipos morfológicos de cerdas existentes no primeiro gonopódio podem funcionar na remoção do conteúdo espermático inserido previamente no receptáculo seminal das fêmeas pelo último macho a realizar a cópula, reduzindo a competição espermática no interior dos receptáculos seminais (Beninger et al. 1991). Além disso, a estratificação espermática (na qual o último macho desloca os ejaculados prévios para região dorsal do receptáculo) pode contribuir para a paternidade única em fêmeas que possuem órgãos de armazenamento espermático (Birkhead & Hunter 1990; Beninger et al. 1991; Urbani et al. 1998).

No entanto, os mecanismos que envolvem a formação dos estratos ainda é desconhecido. Assim, este estudo visou a descrição do trato reprodutor masculino de *S. seticornis* dos pontos de vista histológico e histoquímico, a varredura do vaso deferente (VD), Glândula Acessória (ACG) e do gonopódio. Adicionalmente, foram determinados os mecanismos de deiscência dos espermátóforos (SPT), oriundos do VD de machos e do RS de fêmeas recém-copuladas, em água do mar.

Material & Métodos

Amostras biológicas e procedimentos histológicos

Os caranguejos foram coletados por meio de mergulho autônomo em áreas costeiras da região de Ubatuba, incluindo a Ilha Rapada (23°250S; 44°540W) e a Ilha das Coves (23°250S; 44°510W), São Paulo, Brasil. Uma vez coletados, os indivíduos foram alocados em caixas térmicas contendo água do local de coleta e aeração, individualizados em recipientes plásticos perfurados para circulação de água e transportados para o laboratório. Em laboratório, dez casais adultos de tamanhos diferentes, mensurados com paquímetro de precisão (0.1 mm), foram selecionados randomicamente e mantidos isolados em aquários divididos por tela plástica. Os caranguejos foram alimentados diariamente com pedaços de camarão e com ração para peixes ornamentais. Os aquários eram providos de sistema recirculante de filtragem (12-h fotoperíodo, salinidade de 35, e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$). O tamanho dos machos variou de 7.6 a 14.9 mm de largura de carapaça (LC), e as fêmeas, de 9.6 mm a 11.0 mm de LC.

Anatomia, histologia e histoquímica

Para análise do sistema reprodutor, seis machos maduros foram anestesiados por choque térmico, dissecados e fixados em paraformaldeído a 4% e tampão fosfato 0,2 M (pH =7.4) por 24h. Parte dos sistemas reprodutores imersos em solução de fixação foi fotografada em estereomicroscópio para descrição anatômica. Após a fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em série crescentes de etanol (70 a 95%), embebidas e incluídas em historresina Leica® (glicol metacrilato). Após a polimerização, os blocos foram cortados no micrótomo rotativo. Os cortes de 5 a 7 μm foram montados em laminas e corados com hematoxilina e eosina (HE) (Junqueira & Carneiro 1983), evitando-se banhos de xilol e álcool (Sant'Anna et al 2010).

Adicionalmente, testículo e vaso deferente foram analisados quanto à distribuição de proteínas por meio das técnicas de azul de bromofenol (Pearse, 1985) e xylydine ponceau (Mello & Vidal 1980), polissacarídeos neutros e ácidos por meio das técnicas PAS e azul de Alcian, respectivamente, além de ambas as técnicas conjugadas para detecção preponderante de um tipo de polissacarídeos (Junqueira & Junqueira 1983).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras do vaso deferente e do primeiro gonopódio foram fixados em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%) em tampão cacodilato de Sódio 0,1 M (pH 7,4) e posteriormente desidratadas em banhos de etanol com concentrações crescentes (50%, 75%, 95%, absoluto) em temperatura ambiente. Após a desidratação, as amostras foram secas em ponto crítico EMS 850. Em seguida, o material foi montado em stubs de alumínio, vaporizados com ouro usando DESK II DENTON VACUUN e examinadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL - JSM 5410, com voltagem variando de 10-20 KV e documentado por fotografia no próprio microscópio.

Experimentos de Deiscência

A deiscência dos espermatozóides foi realizada de acordo com Beninger et al. (1993). Dentre os casais mantidos para a experimentação, três foram escolhidos aleatoriamente para esta parte do estudo. Primeiramente, os espermatozóides oriundos do vaso deferente dos machos e embebidos em fluido seminal, e os espermatozóides provenientes do receptáculo seminal de fêmeas recém-copuladas foram inseridos separadamente em lâminas escavadas e diluídos em 1ml de água do mar. Em seguida, uma outra amostra com material do vaso deferente foi diluído em 1ml da matriz do receptáculo seminal das fêmeas. Os espermatozóides foram observados após 5, 7, 15, 30, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 min transcorridos. Os espermatozóides foram fotografados em Microscópio de Contraste de Fase Leica DM200 com software Leica IM50 e com Microscópio de Contraste Interferencial de Normarski (DIC) Zeiss® Axio Imager Z2.

RESULTADOS

Anatomia do sistema reprodutor de machos

O sistema reprodutor de *S. seticornis* é formado por dois blocos convolutos ligados por comissura dificilmente preservada na dissecação. (Fig. 1A). Devido à arquitetura corpórea desta espécie, pouco usual, o testículo limita-se à região anterior cefalotoraxica, tornando-se extremamente convoluto (Fig. 1A-C). Quando dissecado, a comissura que interliga os testículos normalmente sofre ruptura (Fig. 1C). O vaso deferente pode ser dividido em três regiões: anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD). A AVD, logo após o testículo é um túbulo delgado, sinuoso e esbranquiçado (Fig. 1A e C). A MVD tem como característica anatômica ser menos convoluta e dilatada, com coloração branco-leitosa. Na região de transição entre a MVD e PVD, observa-se o conjunto de glândulas acessórias (ACG), bem desenvolvidas, de aspecto saculiforme e alongadas (Fig. 1C e D). A PVD tem a superfície bastante ondulada e apresenta-se menos esbranquiçada que a MVD (Fig. 1 D).

Histologia, histoquímica e microscopia de varredura do sistema reprodutor masculino

Testículo do tipo tubular, com a luz do túbulo seminífero bastante ampla em determinadas regiões (Fig. 2 A). As células germinativas encontram-se no mesmo estágio de espermatogênese, distribuídas aleatoriamente ao longo do testículo (Fig. 2 B). As espermatogônias ficam localizadas em um dos pólos, sobre o túbulo seminífero (Fig. 2 C). Os espermátócitos primários, facilmente identificáveis, por apresentarem em seus núcleos volumosos, os diferentes estágios da prófase meiótica (Fig. 2 D). Os espermátócitos secundários apresentam cromatina bastante homogênea (Fig. 2 E). Durante o processo de espermiogênese, as espermátides modificam seu núcleo de arredondado para a forma de letra “C”, ao mesmo tempo em que a vesícula acrossomal, PAS positiva, vai aumentando em volume. Ainda nesta etapa, as células acessórias ou células de sertoli, apresentam os núcleos bastante volumosos e citoplasma desenvolvido (Fig. 2 F). Os espermatozoides, encontrados na luz do túbulo seminífero, possuem a vesícula acrossomal completa, circundado quase que, completamente, pelo núcleo delgado em forma de “C”, além da presença de braços radiais (Fig. 2 G).

A AVD pode ser dividida em duas porções distintas: a proximal (AVDp) e a distal (AVDd), devido à formação dos espermátóforos. Os espermatozoides na luz da AVDp encontram-se livres, formando uma massa compacta de células. Entremendo os espermatozoides há uma pequena quantidade de secreção eosinófila negativa para proteínas, mas com intensa reação para polissacarídeos neutros (Fig. 3A-C). O epitélio desta porção varia de pavimentoso a cúbico simples, sendo cúbico na AVDd, assentado sobre delgada camada muscular (Fig. 3A-C). Na AVDd a secreção eosinófila, intensamente reativa ao PAS, separa as massas dos espermatozoides em estruturas circulares formando os espermátóforos (Fig. 3 C). O epitélio torna-se mais alto, porém ainda cúbico, com núcleos ocupando a região central (Fig. 3D).

A MVD encontra-se repleta de espermátóforos, os quais estão imersos em uma secreção homogênea. Nota-se nesta região, quando fraturada ao SEM, a formação de aglomerados de espermatozoides, cuja parede envoltória é pouco conspícua (Fig. 3 E-F). Somente com a remoção do conteúdo estocado na MVD, nota-se que os espermátóforos apresentam parede extremamente delgada (Fig. 3 G-H). Ao microscópio de luz, a secreção luminal é eosinófila, intensamente reativa para proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 3 I-L). O epitélio colunar simples desta região está assentado sobre uma camada muscular mais espessa que a região anterior (Fig. 3 I). A transição entre a MVD e a PVD é marcada pela abertura das glândulas acessórias. A PVD encontra-se preenchida por secreção, com ausência de espermátóforos, estando estes, estocados somente na MVD (Fig. 4A).

A glândula acessória é uma estrutura saculiforme, alongada, recoberta por inúmeras fibras musculares, dispostas em diferentes sentidos, lembrando uma trama. Quando fraturada, nota-se que o lúmen encontra-se totalmente preenchido por secreção (Fig. 4 B e C). A porção mais saculiforme da glândula encontra-se preenchida por três tipos distintos de secreções. A secreção tipo 1, homogênea e eosinófila, separada uma da outra pela presença da secreção tipo 2, basófila, o que torna a secreção tipo 1 semelhante a um mosaico. Nas margens da secreção 1, encontra-se a secreção tipo 3, menos eosinófila, a qual recobre a periferia da porção de secreção do tipo 1 (Fig. 4 E-I). O epitélio desta porção da glândula é simples e pavimentoso e está assentado sobre uma espessa camada muscular (Fig. 4 A-B-E). Parte da glândula acessória, próximo da região de abertura da PVD, sofre uma modificação, tornando-se mais estreita e composta por epitélio cúbico, também envolto por musculatura, porém mais delgada

(Fig. 4 F). Do ponto de vista histoquímico, a secreção do tipo 1 é glicoproteica, apresentando somente polissacarídeos neutros. A secreção do tipo 2 é composta por polissacarídeos ácidos e neutros, sendo fortemente reativa para polissacarídeos neutros. A secreção do tipo 3 é composta exclusivamente por proteínas (Fig. 4 G-H-I).

A PVD encontra-se preenchida exclusivamente por três diferentes tipos de secreções, com aspecto mais fluido e menos compacto. A secreção do tipo 1 forma uma matriz finamente granular, a qual parece ser produzida pelo epitélio dessa mesma região. Esta secreção é acidófila e fracamente reativa para proteínas, sendo intensamente positiva para polissacarídeos neutros e, negativa para os ácidos. Circundando secreção do tipo 1, encontra-se a secreção do tipo 2, basófila com reação positiva para polissacarídeos neutros e ácidos. Ainda na PVD, encontra-se a secreção do tipo 3, globular, positiva exclusivamente para proteínas (Fig 4 J-L). O epitélio da PVD, extremamente sinuoso, apresenta as mesmas características do epitélio da glândula acessória. (Fig. 4. M).

Deiscência dos espermatóforos

Os espermatóforos oriundos da MVD, mantidos em água do mar, não apresentaram deiscência após observação por um período de 120 minutos (Fig 5 A e B). Contudo, o material procedente do receptáculo seminal, apesar de manterem massas espermáticas aparentemente arredondadas, não é constituído de espermatóforos (Fig. 5 C). O material existente no receptáculo seminal, quando analisado em maiores aumentos ao microscópio DIC, confirmou a presença de espermatozoides com até cinco braços radiais, sendo um deles o processo mediano posterior (Fig. 5 D). A análise da ultraestrutura do primeiro par de gonopódio revelou a presença de dentes extremamente agudos, os quais se encontram concentrados, particularmente, no ápice interno do canal gonopodial. Todo o restante do canal, no qual passam os espermatóforos, é liso (Fig. 5. E-H).

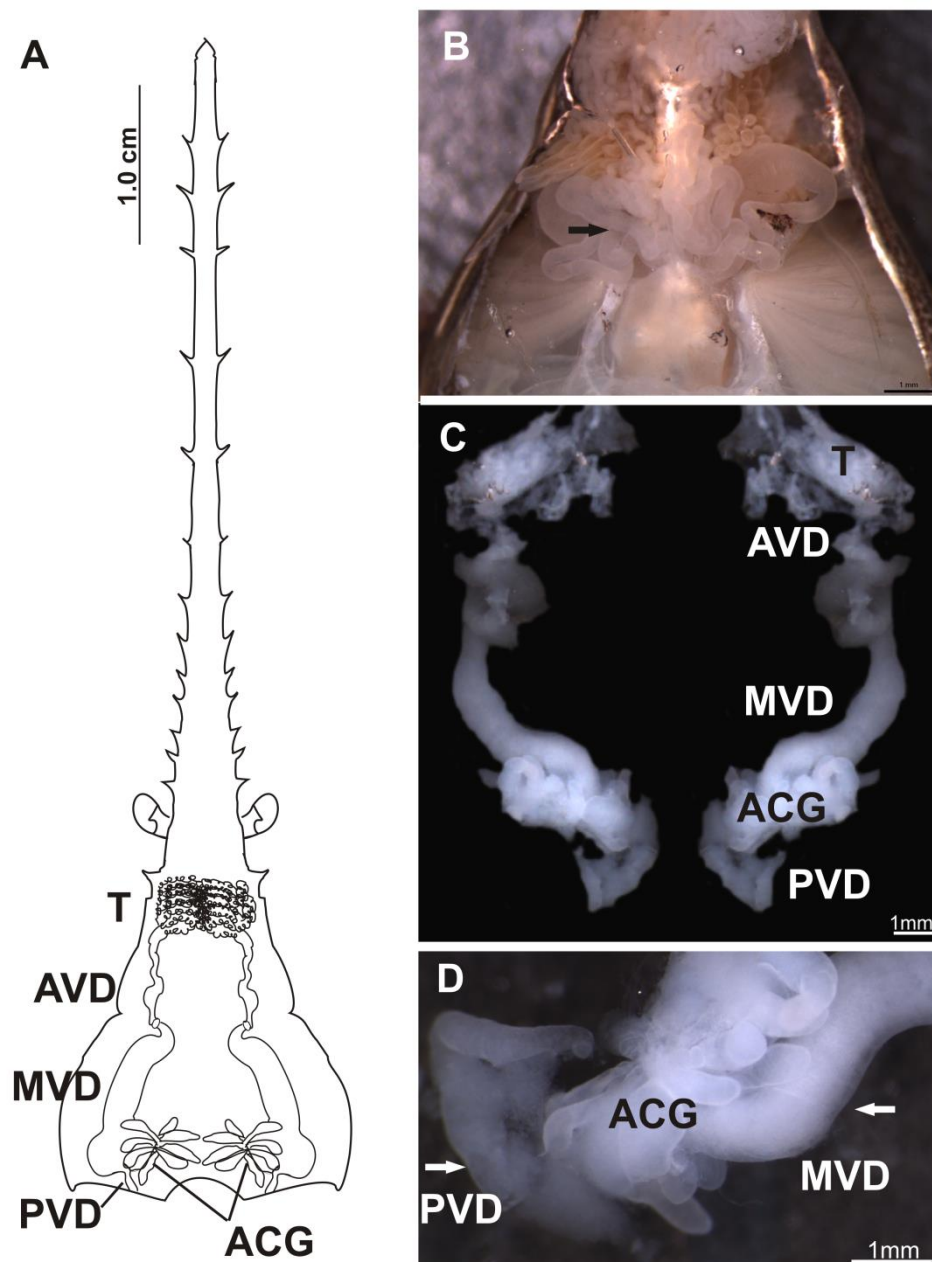


Figura 1. *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788). (A) Diagrama do sistema reprodutor masculino (esquerda). Morfologia geral do sistema reprodutor masculino (direita) (A e B). Nota-se o par de testículos, localizado em ambas às margens superiores do cefalotórax, contínuo com o par de vasos deferentes, os quais se estendem longitudinalmente sobre o hepatopâncreas e abaixo do coração, em direção à região posterior ventral do corpo. (C) Esquema geral do vaso deferente mostrando as diferentes regiões anatômicas e glândula acessória. (D) Detalhe da glândula acessória. . T= testículo; AVD= vaso deferente anterior; MVD= vaso deferente médio; PVD=vaso deferente posterior; ACG= glândula acessória.

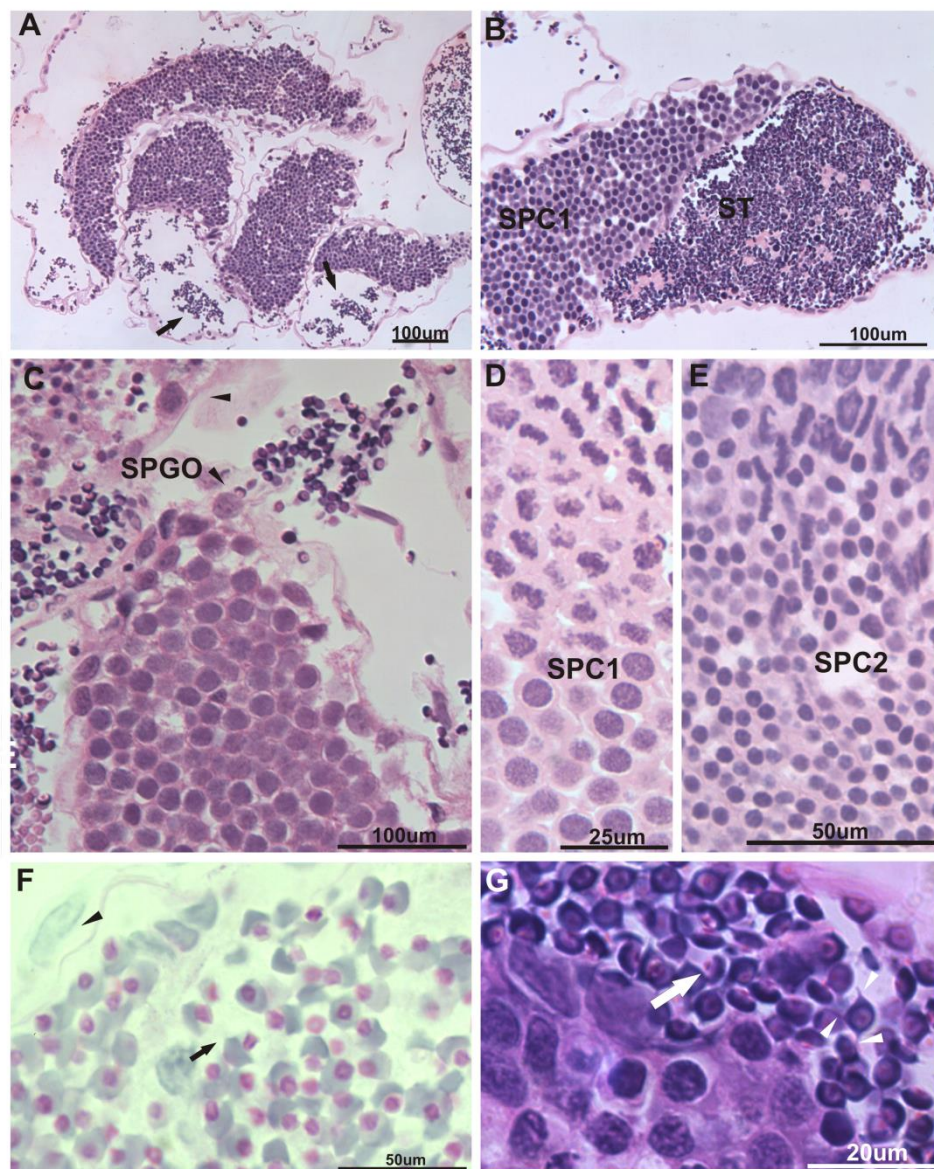


Figura 2. *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788). Sistema reprodutor masculino. (A) Testículo tubular com zonas de maturação regionalizadas, células no mesmo estágio de desenvolvimento e luz do túbulo seminífero (seta preta) em HE. (B) Zona de maturação mostra espermatócitos primários (SPC 1) distribuídos aleatoriamente ao longo do testículo e espermatídeos (ST). (C) Espermatogônias (SPGO) sobre o túbulo seminífero. (D) SPC1 em diferentes estágios de prófase meiótica. (E) Espermatócitos secundários (SPC2). (F) Espermatídeos (seta negra) com vesícula acrossomal PAS positiva e células de sertoli (cabeça de seta negra) durante processo de espermiogênese. (G) Espermatozoides na luz do túbulo seminífero, vesícula acrossomal completa (seta branca) e braços radiais (cabeça de seta branca).

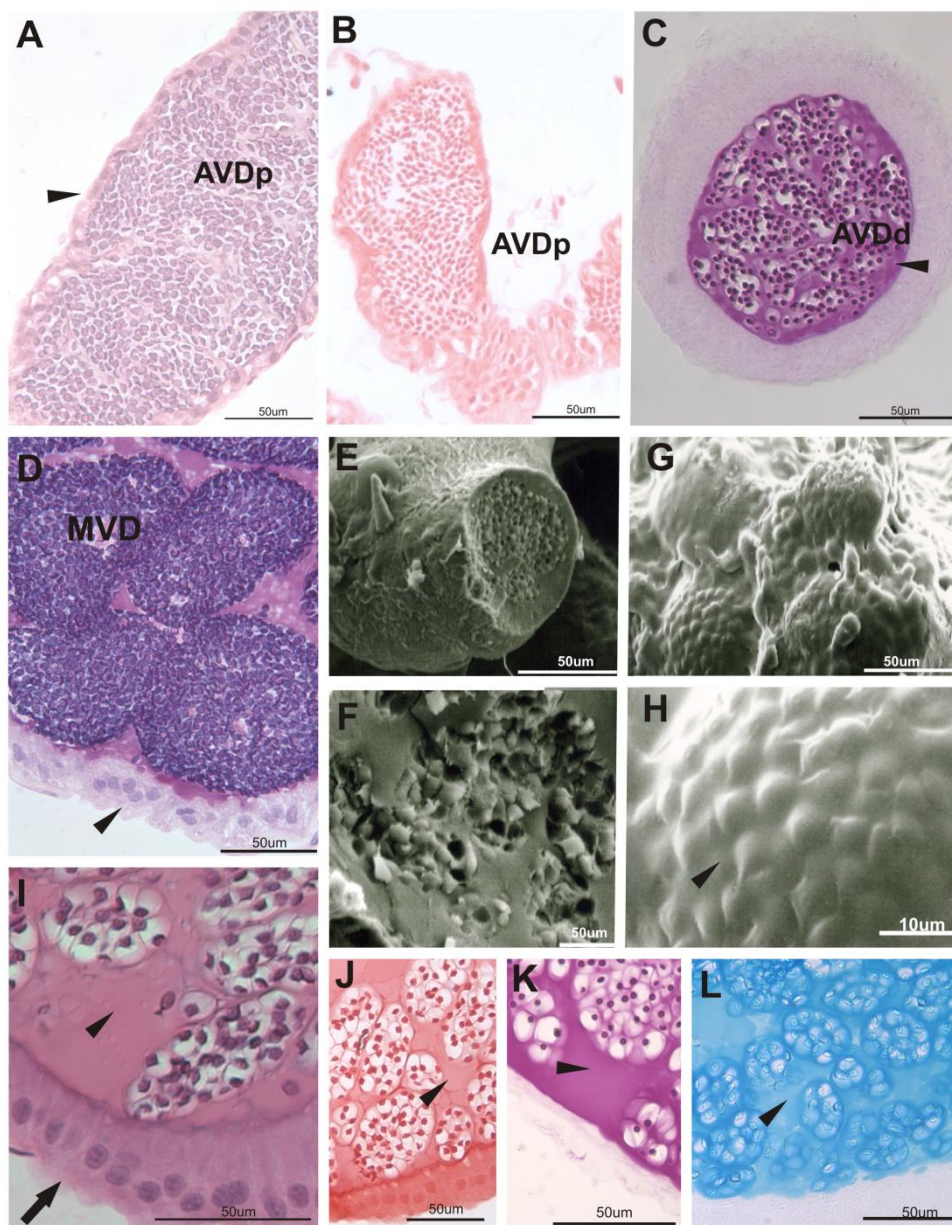


Figura 3. *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788). Sistema reprodutor masculino. (A e B) Vaso deferente anterior proximal (AVDp), com aglomerado de espermatóforos livres imersos em secreção eosinófila negativa para proteínas. Epitélio cúbico simples com camada muscular delgada (cabeça de seta negra). (C) Formação dos espermatóforos no vaso deferente anterior distal (AVDd), com secreção eosinófila intensamente reativa ao PAS (cabeça de seta negra). (D) Vaso deferente médio (MVD) com espermatóforos e epitélio mais alto, com núcleos ocupando a região central (cabeça de seta negra). (E-F) Espermatóforos são revestidos por uma película delgada. (G e H) Região da glândula composta somente por secreção. MEV. (I) Epitélio da MVD é colunar simples com camada muscular menos espessa que da AVD (seta negra). (I-L) Secreção da MVD é eosinófila, intensamente reativa para proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos (cabeça de seta negra).

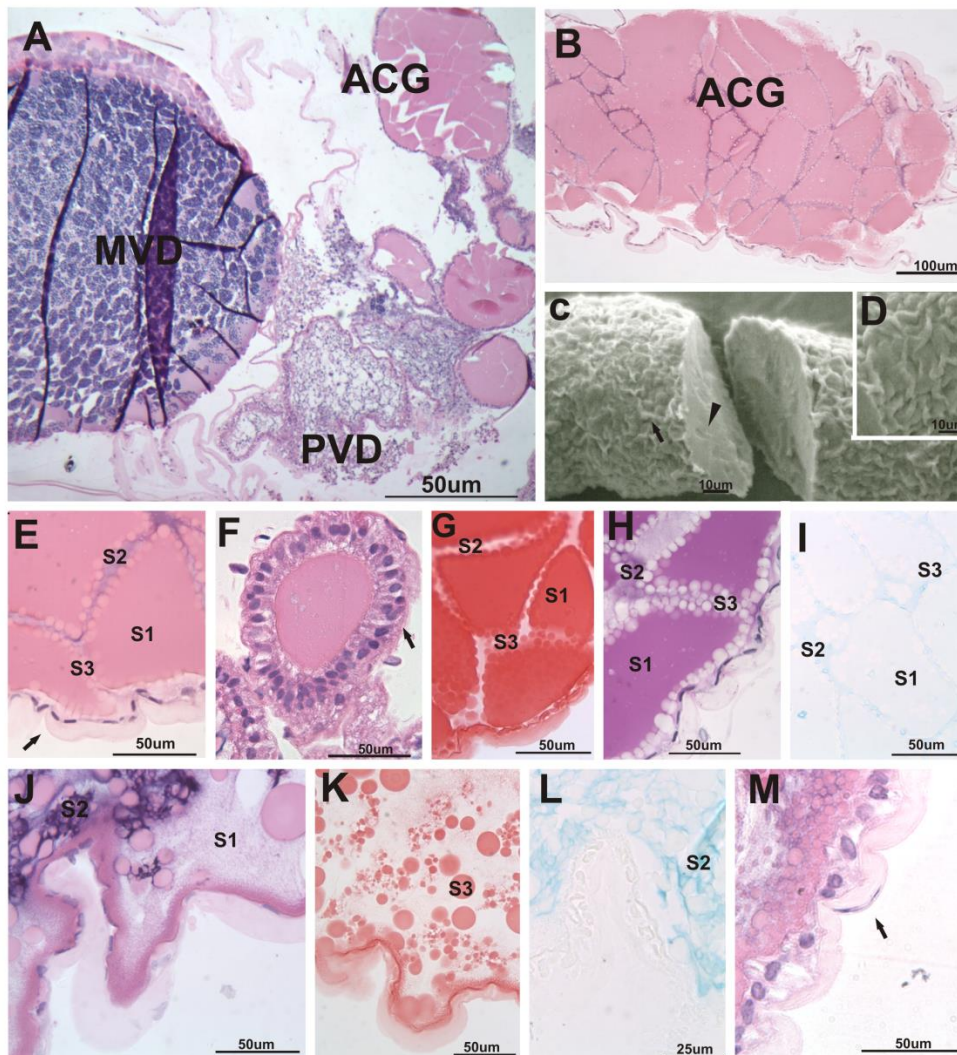


Figura 4. *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788). Sistema reprodutor masculino. (A) Região de transição entre o vaso deferente médio (MVD) e vaso deferente posterior (PVD) marcada pela abertura da glândula acessória (ACG). (B) ACG preenchida somente por secreção. (C) ACG recoberta por inúmeras fibras musculares (seta preta) e lúmen totalmente preenchido por secreção (cabeça de seta). (D) Detalhe das fibras musculares da ACG. (A-B-E) Glândula acessória encontra-se preenchida por três tipos de secreções. Tipo 1 (S1), homogênea e eosinófila; tipo 2 (S2), basófila; e tipo 3 (S3), menos eosinófila e envolvendo a secreção do tipo 1. (F) Glândula torna-se mais estreita e com epitélio cúbico, envolto em musculatura mais delgada (seta negra) na região mais próxima da abertura da PVD. (G-H-I) S1: glicoproteica com polissacarídeos neutros. S2: polissacarídeos ácidos e neutros. S3: proteínas. (J-M) PVD preenchida por três secreções distintas. A S1 é finamente granular, acidófila e fracamente reativa para proteínas; a S2 é basófila, positiva para polissacarídeos ácidos e neutros; e a S3 é globular e reativa para proteínas. (K) Epitélio da PVD simples, sinuoso e assentado em espessa camada muscular (seta negra).

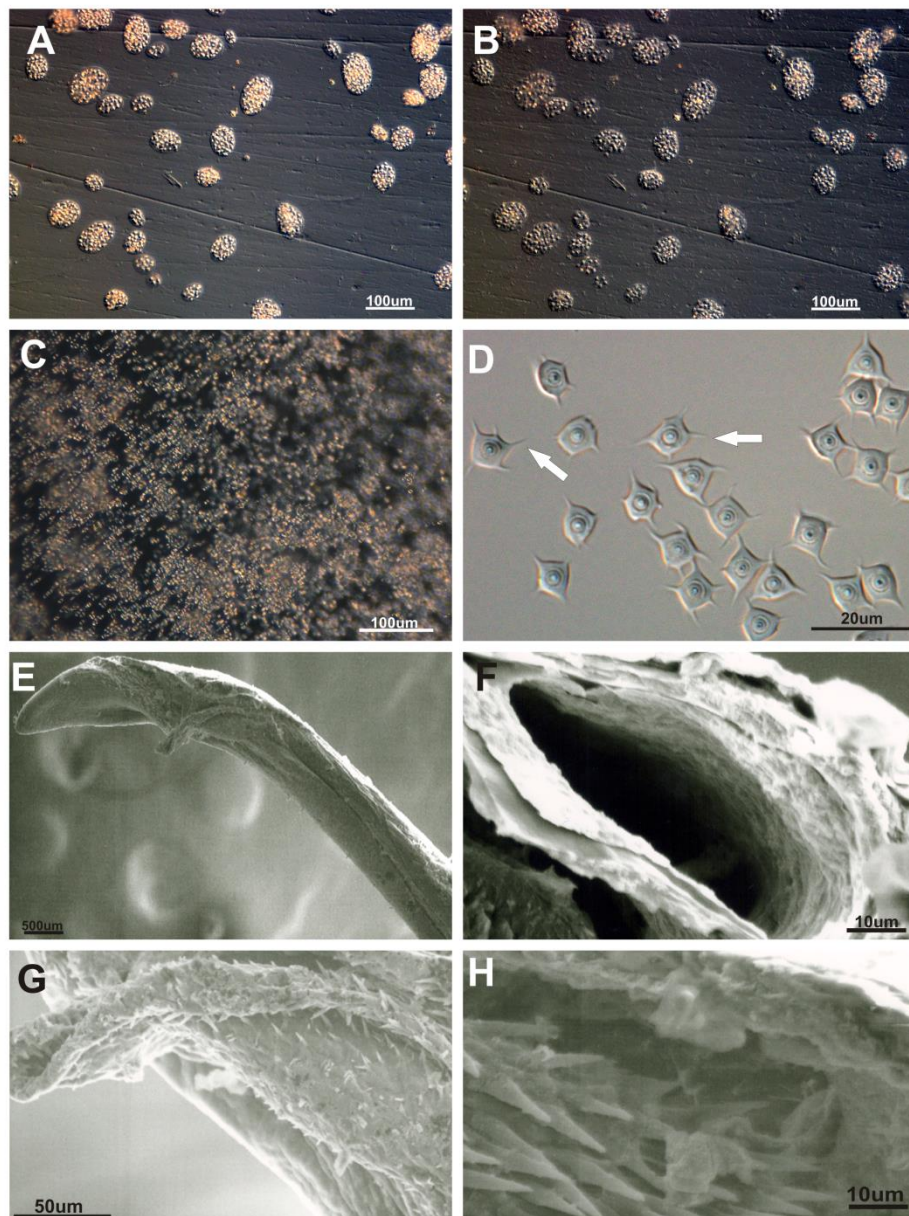


Figura 5. *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788). Deiscência dos espermatóforos da MVD após 5 min em água do mar (A). Espermatóforos da MVD intactos, após permanência de 120 min em água do mar. (C) Aglomerados de espermatozoides oriundos do receptáculo seminal, após 5 min em água do mar. (D) Aglomerados de espermatozoides analisados ao DIC (setas apontam para braços radiais). (E) Visão geral do primeiro gonopódio. Região apical com poros e setas de diferentes tamanhos. (F) Visão interna do canal gonopodial, mostrando parede totalmente lisa. (G) Detalhe da abertura no ápice do primeiro gonopódio revestida por dentes. (H). Detalhe dos dentes que revestem a abertura do primeiro gonopódio.

Discussão

Em Brachyura, o sistema reprodutor dos machos localiza-se na região do cefalotórax, sobre o hepatopâncreas, estendendo-se longitudinalmente em ambos os lados do corpo (Krol et al. 1992; Simeó et al. 2009). Em *S. seticornis*, o testículo limita-se à região cefalotorácica anterior, devido à sua morfologia corpórea distinta (alongada no sentido antero-posterior). A comissura observada por Mouchet (1931), que conecta os testículos está presente, mas é extremamente delicada; visto que, rompia-se com facilidade durante a dissecação dos espécimes estudados. O testículo segue o padrão observado em outros Majoidea (Kon & Honma 1970; Sapelkin & Fedoseev 1981; Simeó et al. 2009) e classifica-se como tubular, pois consiste em único túbulo altamente convoluto (Minagawa et al. 1994; Nagao & Munehara 2003). Com exceção de espécies pertencentes às superfamílias Grapsoidea (Tiseo et al. 2014) e Xanthoidea (Binford, 1913), a maioria das espécies de Brachyura apresentam testículos do tipo lobular (Simeó et al. 2009; Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013), compostos por numerosos lóbulos seminíferos e cada lóbulo, envoltos por células acessórias, libera espermatozoides no interior do ducto seminífero (Gupta & Chatterjee, 1976; Hirsch, 1988; Minagawa et al. 1994; Suganthi & Anilkumar, 1999; Moriyasu et al. 2002; Nagao & Munehara, 2003; Garcia & Silva, 2006; Cuartas & Petriella, 2007; Jivoff et al. 2007; Castilho et al. 2008; Stewart et al. 2010; Zara et al. 2012).

Apesar do testículo de *S. seticornis* ser do tipo tubular, as células germinativas estão distribuídas aleatoriamente, sem a delimitação de zonas específicas para cada atividade celular, como proposto por Nagao & Munehara (2003) e observado em outras espécies de braquiúros, que possuem testículos tubulares (Binford 1913; Erkan et al. 2009; Simeó et al. 2009, 2010). Em *S. seticornis*, estas zonas são observadas em corte transversal, sendo sequenciais em cada altura, enquanto que, em *Maja brachydactyla* Balss 1922, por exemplo, o túbulo seminífero é dividido em três zonas, chamadas de germinativa, de transformação e zona de evacuação, em que cada região apresenta um conteúdo diferente e desempenha um papel específico durante a espermatogênese (Simeó et al. 2009).

A espermatogênese em *S. seticornis* segue o padrão geral descrito para outras espécies de Brachyura (Castilho et al. 2008; Santos et al. 2009; Zara et al. 2012; Tiseo et al. 2014), sem diferenciação entre os estágios de espermátides e diminuição do

volume do núcleo, como observado em Portunoidea (Stewart et al. 2010; Nascimento e Zara 2013) e Ucididae, como *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) estudado por Castilho et al. (2008) e diferindo de *M. brachydactyla*, no qual não foi notado redução do núcleo (Simeó et al. 2009).

Quando formados, os espermatozoides de *S. seticornis* tornam-se estruturas penta radiais, com cinco braços laterais, semelhante à morfologia observada em *Inachus phalangium* (Fabricius, 1775) (Rorandelli et al. 2008) e que representa uma tendência geral entre os Brachyura (Felgenhauer & Abele 1990). No entanto, nos Majoidea *Cyrtomaja furici* Richer de Forges & Guinot, 1988 e *Platymaia rebierei* Guinot & Richer de Forges, 1986 (Inachinae), *Sphenocarcinus stuckiae* Guinot & Richer de Forges, 1986, *S. orbiculatus* Guinot & Richer de Forges, 1986 e *Libinia emarginata* Leach, 1815 (Pisinae), os espermatozoides possuem apenas três braços laterais (Hinsch, 1969; Jamieson et al. 1998). Em *Chionoecetes opilio* (Oregoninae) verificou-se uma variação de quatro a dez braços nucleares, mas as projeções não foram distinguidas entre nucleares laterais ou ventrais (Chiba et al. 1992; Rorandelli et al. 2008). De acordo com Jamieson et al. (1998), a morfologia dos espermatozoides de caranguejos braquiúros parece ser uma adaptação funcional para o encapsulamento dentro do espermatóforo ou para o contato entre o esperma e os ovócitos. Em adição aos braços laterais, pode haver uma extensão mediana posterior que pode conter materiais nucleares com ou sem microtúbulos (Tudge et al., 2014). Além de *S. seticornis*, estas extensões também foram observadas em *L. emarginata* e *Phito lherminieri* (Desbonne in Desbonne & Schramm, 1867) (Hinsch, 1973; Tudge et al. 2014).

Assim como em *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803), *M. brachydactyla*, *Callinectes danae* Smith, 1869 e *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Garcia & Silva 2006; Simeó et al. 2009; Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013), a região da AVD em *S. seticornis*, também, pode ser dividida em duas regiões, proximal (AVDp) e distal (AVDd). Cada região desempenha um papel diferente na formação dos espermatóforos, o qual se inicia na região proximal e termina na porção distal, que também parece armazenar os espermatóforos (Simeó et al. 2009). Além de funções distintas, as duas regiões, também, são caracterizadas por diferenças na espessura do epitélio e nas características histoquímicas das secreções. Segundo Nascimento & Zara (2013), as mudanças no epitélio estão relacionadas com o volume de secreções, que se altera de uma região para outra. A presença de secreções eosinófilas entre os pacotes

espermáticos na AVD de *S. seticornis*, também, foi constatada para *C. danae* e *C. ornatus* e está envolvida na formação dos espermátóforos (Simeó et al. 2009; Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013). Uma vez formados, os espermátóforos de *S. seticornis* são armazenados na MVD, que pode absorver produtos secretados pela AVD durante o processo de compartimentação dos espermatozoides em espermátóforos (Hinsch & Walker 1974). A mudança na musculatura na região da MVD, que se torna mais espessa, pode estar relacionada com a movimentação dos espermátóforos para as regiões posteriores do vaso por meio de contrações musculares (Ryan 1967).

A função da PVD pode variar entre as espécies de *Brachyura* (Krol et al. 1992; Simeó et al. 2009; Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013), desde o armazenamento de espermátóforos e fluído seminal, produção de secreções ou até a fagocitose de espermatozoides e espermátóforos, como ocorre na porção distal da PVD de *C. opilio* no estudo realizado por Benhalima & Moriyasu (2000). Esses autores sugeriram a atividade fagocítica e de reabsorção do excesso de espermátóforos e espermatozoides na PVD de *C. opilio*, devido à alta atividade celular dessa porção. Enquanto que, em *S. seticornis*, a PVD encontra-se preenchida somente por secreção e o armazenamento dos espermátóforos limita-se apenas a MVD, corroborando com Sal Moyano et al. (2010), quando analisaram o trato reprodutor de *Libinia spinosa* (Milne Edwards, 1834).

Em *S. seticornis*, o par de glândulas localiza-se na região de transição entre a MVD e PVD, assim como em *Pachygrapsus transversus* e *P. gracilis* (Tiseo et al. 2014). Apesar de Diesel (1989) descrever as glândulas acessórias em *Inachus phalangium* em forma de numerosos cecos na PVD, a estrutura é semelhante ao observado neste estudo para *S. seticornis*. Estes cecos também foram encontrados na AVD, MVD e PVD de *C. opilio* (Beninger et al. 1988; Benhalima & Moriyasu 2000). Em *M. brachydactyla*, a glândula acessória está localizada na MVD, composta por 7 ou 8 divertículos altamente ramificados e ampliados, conectados à região dorsal da PVD (Simeó et al. 2009). Em algumas espécies a mesma estrutura foi descrita como expansões, como em *G. cruentata* por Garcia & Silva (2006) e evaginações em *U. cordatus* por Castilho et al. (2008). Tiseo et al. (2014) classificaram as glândulas de *Pachygrapsus transversus* e *P. gracilis* como estruturas exócrinas tubulares, simples e ramificadas, devido à conexão, que possuem com o epitélio no qual são originadas e que libera seus produtos dentro do lúmen. Embora a glândula acessória seja descrita com nomenclaturas diferentes, de acordo com sua morfologia e localização ao longo do

vaso deferente, a função desta estrutura é bem semelhante em todas as espécies supracitadas, secretando substâncias importantes na formação do espermátforo e na produção do fluido seminal (Beninger et al. 1988; Sainte-Marie & Sainte-Marie 1999; Garcia & Silva 2006).

A secreção que envolve e delimita os pacotes espermáticos no receptáculo seminal de fêmeas de *S. seticornis* (Antunes et al. 2016), possui as mesmas características histoquímicas da glândula acessória e da PVD dos machos analisados no presente estudo. Tais semelhanças sustentam a hipótese que, as secreções produzidas pelas glândulas acessórias dos machos e transferidas juntos com os espermátforos no momento da cópula, delimitam os pacotes espermáticos em estratos, assim como em *I. phalangium* (Diesel 1989, 1991) e *C. opilio*. (Sainte-Marie & Sainte-Marie 2000). Tal hipótese também pode ser sustentada pelo fato das glândulas e da PVD possuírem uma camada de musculatura muito espessa, que comprime o epitélio, facilitando a saída de grande quantidade de secreção que é transferida juntamente com o pacote espermático no momento da cópula. Enquanto que, em espécies que não apresentam glândula acessória no vaso deferente do macho, como é o caso de *L. spinosa* (Sal Moyano et al. 2010), os espermatozoides estão livres no receptáculo seminal da fêmea, embebidos em esperma gel, mas sem a formação de estratos. A presença de glândulas acessórias e a ausência de espermátforos na PVD são indicativos histológicos de uma provável estratégia dos machos para a competição espermática. Deste modo, a ação conjunta das glândulas e a PVD tem papel fundamental na formação dos pacotes espermáticos observados nos receptáculos seminais das fêmeas recém-copuladas, não sendo meros componentes do fluido seminal.

Verificou-se no presente estudo, que os espermátforos com diferentes tamanhos, proveniente da MVD dos machos observados, não sofreram deiscência por hidratação em água do mar e quando foram diluídos em secreção do receptáculo seminal, enquanto que os espermátforos provenientes do RS de fêmeas recém-copuladas sofreram rápida deiscência, quando submetidos ao mesmo experimento. Assim, parece existir algum mecanismo que age na ruptura da parede dos espermátforos, desde o vaso deferente posterior até o interior do receptáculo. A presença de dentes no ápice do primeiro par de gonopódios pode causar a lesão dos espermátforos no momento da transferência (Rorandelli et al. 2008), visto que a parede

dos espermatozóides de *S. seticornis* é extremamente delgada, assim como *I. phalangium* (Rorandelli et al. 2008).

De acordo com Diesel (1989), o epitélio glandular do receptáculo seminal pode secretar enzimas responsáveis pela ruptura da parede dos espermatozóides. Os dados apresentados neste estudo mostraram que, a hidratação causada pelo contato dos espermatozóides com a água do mar, por si só, não é estímulo suficiente para deiscência total dos espermatozóides de *S. seticornis*, sendo necessária ação mecânica e química, assim como em *C. opilio* (Beninger et al. 1993). A morfologia dos gonopódios de *S. seticornis*, com a presença de dentes em seu ápice, pode contribuir para o rompimento da parede dos espermatozóides durante a transferência espermática, como observado por Rorandelli et al. (2008) em *Inachus phalangium*. Além disso, Beninger et al. (1991) sugerem que, dada a estreita abertura do primeiro gonopódio, cerca de 40 µm em *C. opilio*, os espermatozóides devem sustentar pressão e força mecânica significativa durante a transferência, com os maiores espermatozóides propensos a sofrer mais estresse (50-200 µm de diâmetro). Isso pode representar um mecanismo diferencial para deiscência dos espermatozóides, com os maiores rompendo durante a cópula e os menores preservados para armazenamento (Beninger et al. 1991). As características de deiscência observadas em *S. seticornis* podem ser atribuídas às variações na espessura e composição da parede dos espermatozóides. Beninger et al. (1988) encontraram dois tipos de espermatozóides que diferem em relação à composição da parede que os envolve e, desse modo, sugeriram que alguns deles podem romper-se na hora da cópula, enquanto outros persistem e são armazenados no receptáculo seminal da fêmea.

A origem, função e composição química dos espermatozóides de crustáceos decápodes ainda não foram totalmente elucidadas. Em caranguejos Portunoidea, por exemplo, quitina e polissacarídeos ácidos foram identificados na camada externa dos espermatozóides, enquanto carboidrato, proteínas e lipídeos foram identificados no fluido seminal (Subramoniam 1991). Porém, não fica claro se estes compostos são originados a partir de fluídos dos vasos deferentes ou dos próprios espermatozóides. Os resultados obtidos na análise histoquímica em *S. seticornis* corroboram com os encontrados para *C. danae*, com parede dos espermatozóides composta por glicoproteínas (Zara et al. 2012). Com esse tipo de composição, os espermatozóides podem ser estruturas resistentes e ao mesmo tempo, com moléculas de baixo peso molecular (Uma & Subramoniam 1979). Em Majoidea, a liberação dos ovócitos pode ocorrer logo após a

cópula e a deiscência imediata dos espermátóforos favorece tal estratégia reprodutiva, visto que, a fertilização pode ser imediata, caso os ovócitos da fêmea já estejam prontos para extrusão (Beninger et al. 1988). Diante dos resultados obtidos neste trabalho, tal estratégia parece ser adequada para *S. seticornis*, com os espermatozoides rompendo-se imediatamente após a cópula e utilizados em uma ou mais desovas. Deste modo, a paternidade da prole pode ser assegurada ao último macho que copulou com a fêmea e/ou pela quantidade de espermátóforos com capacidade de deiscência imediata, transferidos para a fêmea. Além disso, este estudo revelou de forma inédita, a importância das secreções produzidas pela glândula acessória, combinadas com a PVD, na formação dos estratos espermáticos observados nas fêmeas de *S. seticornis* por Antunes et al. (2016), ampliando o conhecimento a cerca dos mecanismos de competição espermática na espécie.

Referências

- Adiyodi KG. & Anilkumar G. 1988. Arthropoda-Crustacea. In K. G. Adiyodi & R. G. Adiyodi (eds.) Reproductive Biology of Invertebrates, pp. 261–318, Vol. 3, Accessory Sex Gland, John Wiley, Chichester
- Akarasanon K, Damrongphol P. & Poolsanguan W 2004. Long-term cryopreservation of spermatophore in the giant fresh- water prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquacult. Res. 35: 1415–1420.
- Antunes M, Zara FJ, López-Greco LS & Negreiros-Fransozo ML 2016. Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea. Invertebr. Biol. 135(2): 75–86.
- Bauer R 1986. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. J. Crust. Biol. 6 (3): 313-325.
- Benhalima K & Moriyasu M 1998. Prevalence of bacteria in the spermathecae of female snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachy- ura: Majidae). Hydrobiologia 449:261–266
- Benhalima K & Moriyasu M 2000. Structure and function of the posterior vas deferens of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). Invertebr. Reprod. Dev. 37: 11-23.
- Beninger PG, Elnor RW, Foyle TP & Odense P 1988. Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. J. Crust. Biol. 8: 322-332.
- Beninger PG, Elnor RW & Poussart Y 1991. The gonopods of the majid crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). J. Crust. Biol. 11: 217–228.
- Beninger PG, Lanteigne C & Elnor RW 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). J. Crust. Biol. 13 (1):1-16.
- Binford R 1913. The germ-cells and the process of fertilization in the crab, *Menippe mercenaria* J. Morphol. 24 : (2), 147-201.
- Birkiiead TR & Hunter FM 1990. Numbers of sperm storage tubules in the Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*) and Bengalese Finch (*Lonchura striata*). Auk 107:193-197.

- Castilho GG, Ostrensky A, Pie MR & Boeger WA 2008. Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zool.* 89: 157-161.
- Chiba, A., Kon, T., Honma, Y., 1992. Ultrastructure of the spermatozoa and spermatophores of the zuwai crab, *Chionoecetes opilio* (Majidae, Brachyura). *Acta Zool.* 73, 103–108.
- Cronin LE 1947. Anatomy and histology of the male reproductive system of the *Callinectes sapidus*, Rathbun. *J. Morphol.* 81 : (2), 209-239.
- Cuartas, E.I., Petriella, A.M., 2007. Formación inicial de los espermatozoides en el testículo del cangrejo *Uca uruguayensis* (Brachyura: Ocypodidae). *Rev. Biol. Trop.* 55, 9–14.
- 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. *J. Crust. Biol.* 9: 266-277.
- Diesel R 1991. Sperm competition and the evolution of mating behavior in Brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae), pp. 145-163. In: Bauer, R. T. & J. W. Martin (eds.), *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, New York, NY.
- Erkan M, Tunali Y, Balkis H & Oliveria E 2009. Morphology of testis and vas deferens in the xanthoid crab, *Eriphia verrucosa* (Forskål, 1775) (Decapoda: Brachyura). *J. Crust. Biol.* 29: 458-465.
- Felgenhauer BE & Abele LG 1990. Morphological diversity of decapod spermatozoa. pp 322–341. In: Bauer, R. T. & J. W. Martin (eds) *Crustacean sexual biology*, Columbia University Press, New York, NY.
- Garcia TM & Silva JRF 2006. Testis and vas deferens morphology of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803). *Braz. arch. biol. technol.* 49: 339-345.
- Gupta, R.S., Chatterjee, N.B., 1976. Anatomical observations of the internal male reproductive organs of *Scylla serrata* (Forskål). *Ind. J. Physiol. Allied Sci.* 30, 34–42.
- Hinsch GW 1969. Microtubules in the sperm of the spider crab, *Libinia emarginata* L. *J. Ultrastruct. Res.* 29:525–534.
- Hinsch GW 1973. Sperm structure of Oxyrhyncha. *Can. J. Zool.* 51:421-426.

- 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. *J. Crustacean Biol.* 8, 254–261.
- Hinsch GW & Walker MH 1974. The vas deferens of the spider crab, *Libinia emarginata*. *J. Morphol.* 143, 1-19.
- Jamieson BGM, Scheltinga DM & de Forges BR 1998. An ultrastructural study of spermatozoa of the Majidae with particular reference to the spermatozoon of *Macropodia longirostris* (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Acta Zool.* 79: 193–206.
- Jerry D 2001. Electrical stimulation of spermatophore extrusion in the freshwater yabby (*Cherax destructor*). *Aquaculture* 200: 317– 322.
- Jivoff P, Hines AH & Quackenbush LC 2007. Reproductive biology and embryonic development, pp. 255-286. In: Cronin LE & Kennedy VS (eds.), *The blue crab Callinectes sapidus*. Maryland Sea Grant College, College Park, MD.
- Junqueira LCU & Junqueira LMMS (eds.). 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. Editora Santos, São Paulo.
- Klaus S, Münzner A, Modenbach C, Streit B & Tudge CC 2013. Spermatophore formation and sperm ultrastructure of *Sundathelphusa philippina* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae). *Acta Zool.* 94:267-272.
- Kon, T., & Honma, Y. 1970. Studies on the maturity of the gonad in some marine invertebrates IV: seasonal changes in the testes of the Tanner crab. *Nippon Suisan Gakkai Shi* 36, 1028–1031.
- Krol RM, Hawkins WE & Overstreet RM 1992. Reproductive components. pp. 295-343. In: Harrison FW & Humes AG (eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 10: Decapod Crustacea. Wiley-Liss, New York, NY.
- Mello MSL & Vidal BC 1980. *Práticas de Biologia Celular*. Edgar Blucher – FUNCAMP, São Paulo. páginas
- Minagawa M, Chiu JR, Kudo M & Takashima F 1994. Male reproductive biology of the red frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands, Japan. *Mar. Biol.* 118: 393–401.
- Moriyasu M, Benhalima K, Duggan D, Lawton P, Robichaud D 2002. Reproductive biology of the male Jonah crab, *Cancer borealis* Stimpson, 1859 (Decapoda, Cancridae) on the Scotianshelf, Northwestern Atlantic. *Crustaceana* 75: 891–913.

- Mouchet S 1931. Spermatophores des crustacés décapodes anomures et brachyours et castration parasitaire chez quelques pagures. Ann. Sta. Océanogr. Salammbô VI, 1–203.
- Nascimento FA & Zara FJ 2013. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). Nauplius 21: 161–177.
- Nagao J & Munehara H 2003. Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. Fish Sci 69: 1200-1208.
- Rorandelli R, Paoli F, Cannicci S, Mercati D & Giusti F 2008. Characteristics and fate of the spermatozoa of *Inachus phalangium* (Decapoda, Majidae): description of novel sperm structures and evidence for an additional mechanism of sperm competition in Brachyura. J. Morphol. 269: 259–271.
- Ryan EP 1967. Structure and function of the reproductive system of the crab, *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). II. The female system. Mar. Biolog. Association of India Symposium Series 2: 522–544.
- Sainte-Marie G & Sainte-Marie B 1999. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). II. Multiple types of sperm cells and of spermatophores in the spermathecae of mated females. Can. J. Zool. 77: 451-462.
- Sainte-Marie G, Sainte-Marie B, Se´vigny JM 2000. Ejaculate storage patterns and the site of fertilization in female snow crabs (*Chionoecetes opilio*; Brachyura, Majidae). Can. J. Zool. 78:1902–1917.
- Sal Moyano MP, Gavio MA & Cuartas EI 2010. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. Helgol. Mar. Res. 64: 213-221.
- Sal Moyano MP, Gavio MA & Cuartas EI 2011. Copulatory system of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea: Brachyura: Majoidea). J. Mar. Biolog. Assoc. U.K. 91(08): 1617–1625.
- Sant’Anna BS, Turra A & Zara FJ 2010. Simultaneous activity of male and female gonads in intersex hermit crabs. Aquatic Biology 10: 201-209.
- Santos CM, Lima GV, Nascimento AA, Sales A & Oshiro LMY 2009. Histological and histochemical analysis of the gonadal development of males and females of *Armases rubripes* (Rathbun 1897) (Crustacea, Brachyura, Sesarmidae). Braz. J. Biol 69: 161-169.

- Sapelkin AA & Fedoseev VY 1981. Structure of male reproductive system of tanner crabs. *Soviet J. Mar. Biol.* 7: 37–43.
- Simeó CG, Ribes E & Rotllant G 2009. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Tissue and Cell* 41: 345-361.
- Spalding JF 1942. The nature and formation of the spermatophore and sperm plug in *Carcinus maenas*. *Q J Microsc Sci* 83: 399–423.
- Stewart MJ, Stewart P, Soonklang N, Linthong V, Hanna PJ, Duan W & Sobhon P 2010. Spermatogenesis in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and evidence for histones in mature sperm nuclei. *Tissue and Cell* 42: 137-150.
- Subramoniam T 1991. Chemical composition of spermatophores in decapod crustaceans. In: Bauer RG & Martin JW (eds.) *Crustacean sexual biology*. pp. 308-321. Columbia University Press, New York, New York.
- Suganthi AS & Anilkumar G 1999. Moults related fluctuation in ecdysteroid titre and spermatogenesis in the crab, *Metopograpsus messor* (Brachyura: Decapoda). *Zool. Stud.* 38: 314–321.
- Tiseo R, FL Mantelatto & Zara FJ 2014. Is cleistospermy and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). *J. Crust. Biol.* 34 (6): 704-716.
- Tudge CC, Scheltinga DM, Jamieson BGM, Guinot D, & Richer de Forges B 2014. Comparative ultrastructure of the spermatozoa of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. *Acta Zoologica* 95, 1–20.
- Urbani N, Sainte-Marie B, Se´vigny JM, Zadworny D, Kuhnlein U. 1998. Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55:1104-1113.
- Zara FJ, Toyama MH, Caetano FH & Lopez-Greco LS 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). *J. Crust. Biol.* 32:(2): 249-262.

Zara FJ, Pereira GRR & Sant'Anna BS 2014. Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius*. Biol. Bull. 227: 19–32.

CAPÍTULO III

Análise do comportamento de cópula do caranguejo
ornamental *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788)

(Decapoda, Majoidea, Inachoididae)

em laboratório

RESUMO

A capacidade reprodutiva de *S. seticornis* foi avaliada, em laboratório, com o intuito de compreender os padrões comportamentais num representante da superfamília Majoidea, com interesse ornamental. O acasalamento do caranguejo-aranha foi registrado com uma vídeo-câmera digital. Para tal, 20 casais adultos foram mantidos, em aquários, com sistema de filtragem recirculante (fotoperíodo 12 horas, salinidade 35 e $26 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura), com oferta diária de alimento. O tamanho dos machos variou de 9.1 mm a 14.9 mm de largura da carapaça (LC), enquanto para as fêmeas, de 8.2 mm a 12.4 mm de LC. Todos os casais analisados apresentaram comportamento similar, com exceção de algumas interações incomuns. O tempo médio para o macho notar a presença da fêmea e iniciar a cópula foi de 1.35 ± 0.92 minutos, no qual ele estabelece contato inicial com a fêmea tateando-a, utilizando o segundo par de pereiópodos. Imediatamente, após ocorrer o contato físico entre os casais, o macho agarra a fêmea utilizando seus próprios quelípodos e posiciona a mesma frente a frente de si mesmo, ventralmente, ao seu abdome. Ambos flexionam os abdomes para trás e justapõem as partes ventrais. A duração média da cópula foi de 5.6 ± 1.9 minutos. Dois eventos consecutivos de cópula foram registrados em 2 dos 20 casais observados, enquanto que para os demais, após o primeiro ato de cópula, os machos procuraram as fêmeas novamente, mas estas não se apresentaram receptivas aos mesmos. Os comportamentos de guarda e pós-guarda, comum em outros representantes de braquiúros aquáticos, não ocorreram entre os casais observados. Após 20 dias, desde a ocorrência dos acasalamentos, 2 fêmeas pós-puberais exteriorizaram massas de ovos, indicando a possibilidade de obtenção de larvas para cultivo proveniente de reprodutores, mantidos em laboratório.

Palavras-chave: Reprodução, acasalamentos, cultivo, cópula, sexo.

INTRODUÇÃO

Os crustáceos exibem padrões comportamentais complexos. Entre estes, estão os relacionados aos processos reprodutivos, mais especificamente, ao comportamento de cópula (Schöne 1961). O comportamento sexual e os sistemas de acasalamento têm recebido bastante atenção por parte dos pesquisadores durante as últimas décadas (Knowlton 1980; Nakashima 1987; Bauer 1996; Correa & Thiel 2003). Entretanto, as informações básicas necessárias, na literatura, para uma análise completa dos sistemas sexuais (tais como: interações entre machos e fêmeas pré- e pós-cópula, comportamento de cópula, sucesso de inseminação) são pouco abordadas, especialmente se compararmos com aquelas sobre vertebrados terrestres e outros artrópodes, como insetos (Thornhill & Alcock 1983; Bauer 1992). A compreensão, com detalhes, de quais tipos de comportamento reprodutivo que os espécimes de uma espécie exercem, antes e após a cópula, torna possível estabelecer relações sobre as causas e consequências evolutivas do comportamento de cópula (Correa & Thiel 2003).

Os braquiúros (caranguejos) são dioicos, cujo comportamento de cópula varia entre as espécies. Os machos exibem estratégias complexas e diferenciadas entre as espécies para competir pelas fêmeas receptivas. Em algumas espécies de caranguejos com crescimento indeterminado, como os portunídeos e cancrídeos, a cópula está relacionada com o processo de muda da fêmea, em que o macho a protege durante o estágio de pré-muda (Hartnoll 1969). Neste caso, a cópula ocorre imediatamente após a fêmea sofrer a ecdise (com a carapaça mole), durante o breve período em que a fêmea permanece com a carapaça descalcificada (Salmon 1983). Para outras espécies, como os representantes dos majóideos, cujo crescimento é dito determinado, a cópula pode ocorrer durante o período de intermuda (com a carapaça dura). Neste caso, a atividade reprodutiva não depende do ciclo de muda da fêmea (Hartnoll 1969).

O crescimento determinado, exibido pelos representantes da superfamília Majoidea, é aquele no qual as fêmeas ao atingirem a muda da puberdade, alcançam as mudanças morfológicas necessárias para cópula. Desse momento em diante, os indivíduos não realizam mudas subsequentes (Jones & Hartnoll 1997), pelo menos para as espécies conhecidas quanto a este aspecto. Consequentemente, apenas um evento de cópula ocorre, enquanto a fêmea está com a carapaça descalcificada, nos acasalamentos posteriores a carapaça estará calcificada (Moyano & Gavio 2012). Estudos sobre o

comportamento reprodutivo de majóideos indicam que algumas espécies, tais como *Inachus dorsettensis* (Pennant, 1777), *Libinia emarginata* Leach, 1815, *Libinia spinosa* Milne Edwards, 1834, copulam predominantemente com a carapaça rígida (Sagi et al. 1994; Jones & Hartnoll 1997; González-Gurriarán et al. 1998; Van den Brink & McLay 2009; Sal Moyano et al. 2010). Em outras espécies de majóideos a cópula pode ocorrer com a carapaça rígida ou descalcificada (Baal 1953; Carlisle 1957; Adams & Paul 1983; Paul 1984), entre elas: *Chionoecetes opilio* (Fabricius, 1788), *Chionoecetes bairdi* Rathbun, 1893 e *Maja squinado* (Herbst, 1788).

A comunicação durante o comportamento sexual desempenha um papel importante na atração entre machos e fêmeas e na formação de um casal. Em Brachyura, a comunicação durante o período reprodutivo pode ocorrer por meio visual, químico, acústico e por estímulos táteis, que podem atuar sinergicamente (Sastry 1983). Assim, informações sobre as condições internas de um indivíduo podem ser transmitidas para os outros membros da população, caracterizando sua condição hormonal, gonadal ou estágio de muda. Em caranguejos terrestres e semiterrestres o reconhecimento sexual é possível por meio de sinais visuais, táteis e acústicos (Crane 1957; Lisenmair 1967; Salmon & Atsides 1968). As fêmeas de espécies de caranguejos aquáticos podem depender da liberação de feromônios associados à urina, que são muitas vezes combinados com estímulos visuais e táteis (Eales 1974; Ryan 1966; Gleenson 1991). Os feromônios emitidos pelas fêmeas (presumivelmente a partir dos ovários) promovem a procura e o comportamento pré-copulatório de exibição e corte dos machos (Hinsch 1968; McCleese et al. 1977; Hooper 1986; Cowan 1991), distinguindo-as das fêmeas inseminadas ou ovígeras do alcance dos machos.

O reconhecimento desses feromônios pelos machos é visível pelo aumento na atividade locomotora (Jones & Hartnoll 1997) ou no movimento das antênulas e maxilípedes (Bouchard et al. 1996). Kamio et al. (2002) sugerem que, pelo menos, dois tipos de feromônios podem estar envolvidos no processo inicial de acasalamento: “feromônio de distância”, que induz o comportamento pré-copulatório de guarda e o “feromônio de contato”, que induz a cópula. Alguns autores sugerem que o acasalamento, provavelmente, envolva o feromônio de contato, em vez do feromônio de distância (Herborg et al. 2006).

A competição agonística entre os machos, geralmente, assegura o sucesso na cópula entre caranguejos. A diferenciação de tamanho no quelípodo dos machos está,

muitas vezes, relacionada com a maturidade morfológica e seu aumento é uma característica sexual secundária, que provavelmente facilita o comportamento de guarda e o abraço copulatório. Outra característica sexual adquirida pelos machos com a muda puberal é a modificação dos gonopódios, formados pelo primeiro e segundo pares de pleópodos (Beninger et al. 1991), utilizados na transferência dos espermatóforos para o receptáculo seminal da fêmea, durante os eventos de cópula (Bauer 1986). Os machos que realizaram a muda puberal são considerados morfológicamente maduros e, assim, capazes de se reproduzir (Sampedro et al. 1999; Mura et al. 2005).

No entanto, em várias espécies de majoidea, machos morfológicamente imaturos, que ainda não sofreram a muda da puberdade, podem conter, ocasionalmente, espermatóforos totalmente formados no vaso deferente (Beninger et al. 1988) e, frequentemente, copulam com sucesso (Moriyasu & Conan 1988; Sagi et al. 1994; Sainte-Marie et al. 1997). Entretanto, a ocorrência da cópula não garante a produção de descendentes, visto que as fêmeas podem copular com mais de um macho e armazenar os espermatóforos transferidos durante as cópulas nos receptáculos seminais, promovendo um processo denominado de competição espermática (Parker 1970).

Este estudo faz parte de um programa de pesquisas que tem como intuito a obtenção de informações básicas sobre o comportamento reprodutivo de caranguejos marinhos nativos, com interesse ornamental, e ampliar o conhecimento a cerca da biologia reprodutiva dos representantes da superfamília Majoidea. Os esforços deste estudo foram direcionados à avaliação da capacidade de reprodução, em laboratório, da espécie altamente explorada, o “caranguejo-aranha” *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788) com vistas à descrição do comportamento de cópula, utilizando-se técnicas observacionais experimentais para inferir sobre possíveis padrões.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e seleção dos reprodutores

Exemplares de *S. seticornis* foram obtidos, por meio de mergulho autônomo, no sublitoral das ilhas litorâneas no município de Ubatuba, Estado de São Paulo: Ilha da Rapada (23°25'S-44°54'W) e Ilha das Couves (23°25'S-44°51'W). Estas localidades foram selecionadas pelo fato desta espécie ser abundante em tais localidades (ver Cobo 2002; Okamori & Cobo 2003; Alves et al. 2012) e pela experiência que a equipe possui em amostrar esta área. Os caranguejos foram capturados, manualmente, durante sessões diurnas de mergulho autônomo e isolados em sacos plásticos, para prevenir a perda de apêndices. Na embarcação, os caranguejos foram colocados em caixas térmicas, contendo água do local de coleta e aeração constante; posteriormente, transportados até o continente. Durante o transporte até o laboratório de cultivo, situado na UNESP, campus de Botucatu, os caranguejos foram mantidos, individualmente, em pequenos potes plásticos numerados e perfurados para que houvesse circulação da água. O material biológico foi aclimatado para seguir viagem, em caixas térmicas com água do mar do local de coleta, sob aeração constante (por aerador à bateria) e gelo preso à tampa (sem contato com a água).

Manutenção dos reprodutores

Em laboratório, os reprodutores foram mantidos em aquários numerados, que consiste de três módulos interligados (dois aquários com 0,40 m × 0,23 m × 0,25 m, e um reservatório [caixa plástica tipo Marfinite®] com 0,70 m × 0,50 m × 0,40 m), formando um sistema com recirculação de água que totaliza cerca de 70 litros de água do mar. A cada dois dias foram efetuados testes de salinidade (refratômetro de mão), amônia, nitrito (testes titulométricos Tropic Marin®), temperatura e pH (Hanna Instruments, modelo Misura Line 1030) para a caracterização da qualidade da água. Em cada aquário havia substrato, oriundo do local de coleta e fragmentos de rochas calcárias para refúgio dos caranguejos. O fotoperíodo foi mantido em 12 horas de claro e 12 de escuro, salinidade 35 e temperatura 25°C. Diariamente, os reprodutores foram

alimentados, em excesso, com ração para peixes ornamentais (Tetra Marine Flakes® e Tetra Color®), pedaços de músculo de camarão e lula.

Experimentos de acasalamento

Os acasalamentos foram observados, em laboratório; os caranguejos mantidos em aquários com dimensões de 0,45 m x 0,20 m x 0,30 m. Os caranguejos foram filmados em aquário, separados por tela plástica, para aclimatação por pelo menos 5 horas. Quando as telas foram removidas, as atividades dos caranguejos foram observadas e gravadas por uma câmera de vídeo posicionada em tripé frente ao aquário, por um período de 20 min (tempo médio, no qual o macho não demonstrava mais interesse pela fêmea). Os comportamentos observados foram agrupados em categorias, analisados em relação à sua frequência e apresentados em forma de pranchas fotográficas.

As combinações, que contaram com o mínimo de 3 e máximo de 5 réplicas, foram classificadas de A-E (todos caranguejos em estágio de intermuda):

A - 01 macho adulto maior que a fêmea + fêmea adulta (pós-puberal – fêmea que sofreu a muda da puberdade, em laboratório)

B - 01 macho adulto menor que a fêmea + fêmea adulta

C - 02 machos adultos (com tamanhos distintos) maiores que a fêmea + fêmea adulta

D - 01 macho adulto maior que a fêmea + 01 fêmea ovígera

E - 01 macho adulto maior que a fêmea + 01 fêmea ovígeras + 01 fêmea adulta

Análise dos resultados

Além da descrição e do detalhamento do comportamento reprodutivo da espécie, algumas variáveis foram mensuradas e analisadas. Os dados foram submetidos a testes de homocedasticidade (Levene, $\alpha = 0,05$) e normalidade (Shapiro-Wilks, $\alpha = 0,05$), como pré-requisitos na escolha do teste estatístico (Sokal & Rohlf 1995). O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para demonstrar diferenças no tempo gasto pelos machos na fase pré-copulatória. Uma análise de variância (ANOVA one way) foi efetuada para examinar se houve diferença no tempo de duração da cópula entre as combinações de casais, com o teste de Tukey *a posteriori* ($\alpha=5\%$), para testar quais grupos diferiram entre si (Sokal & Rohlf 1995).

RESULTADOS

Durante todo o período de experimentos, 20 eventos de cópula foram observados e registrados. Nos eventos em que a cópula ocorreu com sucesso, todos os machos exibiram comportamento similar, independente do tamanho, com diferenças apenas no tempo despendido na fase pré-copulatória, a qual variou de 30 segundos a 4 minutos, com média de 1.35 ± 0.92 minutos e fase de cópula, a qual variou de 2 a 8 minutos, com tempo médio de 5.6 ± 1.9 minutos (tabela 1). Alguns eventos peculiares ocorreram durante os experimentos de observação da cópula e foram descritos como padrões anômalos.

A seguir, encontram-se descritos as atividades desenvolvidas por machos e fêmeas nas condições anteriormente descritas:

- Fase pré-copulatória - Em todos os eventos registrados, o comportamento pré-copulatório iniciou-se imediatamente após a retirada da tela divisória do aquário. Ao notar a ausência da barreira, o macho desloca-se imediatamente em direção à fêmea. Não foi registrado nenhum tipo de corte ou dança realizado pelo macho, apenas contato sutil do segundo pereiópodo do macho sobre a fêmea. A fêmea neste primeiro momento aguarda a aproximação do macho e, posteriormente, caminha pelo aquário. O macho persegue a fêmea na maior parte do tempo, tateando todo o seu corpo com o segundo par de pereiópodos (Figura 1 A e B).

- Fase de cópula. - Imediatamente após o contato físico entre os casais, o macho agarra a fêmea utilizando seus próprios quelípodos e posiciona a mesma, frente a frente ventralmente ao seu abdome. Ambos flexionam os abdomes para trás e justapõem as partes ventrais (Figura 1 C-H). Foram registrados dois eventos consecutivos de cópula em 2 dos 20 casais observados, enquanto que para os demais, após o primeiro ato de cópula, os machos procuraram as fêmeas novamente, mas estas não estavam mais receptivas.

- Fase pós-cópula. - Os comportamentos de guarda e pós-guarda não ocorreram entre os casais observados.

- Desova. - 2 fêmeas pós-puberais (que sofreram a muda da puberdade, em laboratório) exteriorizaram massas de ovos 20 dias após realizarem a cópula, mas as larvas não completaram o desenvolvimento embrionário.

- Padrões anômalos – Comportamentos peculiares foram observados durante a realização dos experimentos de cópula. Entre eles: a ocorrência de canibalismo e inaptidão pelos machos sobre as fêmeas; agressividade e não receptividade da fêmea por outro macho, logo após uma cópula; ocorrência de muda em um dos machos, alguns dias após ocorrência de cópula.

- Canibalismo - dois machos (13.7 e 14.7 mm de LC) apresentaram comportamento de canibalismo sobre as fêmeas, após algumas tentativas de cópula, sem sucesso. No primeiro caso, o macho não sai à procura da fêmea logo após a retirada da tela, é a fêmea que toca no macho, enquanto caminha pelo aquário. Assim que é tocado pela fêmea, 19 s. após a retirada da tela, o macho inicia comportamento similar aos demais machos observados, posicionando-a para cópula. Este procedimento levou 9 min e 50 s, sem sucesso. Em seguida, ele arranca alguns pereiópodos da fêmea e se alimenta dos mesmos. A fêmea consegue fugir para o outro lado do aquário, após ter três pereiópodos arrancados pelo macho. No segundo caso, o macho levou 1min e 10s para perceber a presença da fêmea e 1min e 20s para tocá-la. Apesar de tatear a fêmea, o macho não demonstra interesse em segurá-la para cópula. Somente após 3 min, a fêmea esbarra no macho e ele a segura para posicioná-la para cópula. Transcorrido 13 min sem conseguir posicionar a fêmea, o macho começa a arrancar os pereiópodos e ingeri-los.

- Inaptidão do macho para cópula - Um macho de 9.7 mm de LC foi colocado junto à fêmea de 12.4 mm para réplica da combinação entre machos menores e fêmeas maiores no dia 07/07. Apesar de aparentar estar maduro morfologicamente e realizar os mesmos movimentos que outros machos que copularam com sucesso, ele não conseguia encaixar o gonopódio no gonóporo da fêmea. No dia seguinte ele foi colocado com uma fêmea menor (9.0 mm) e repetiu o mesmo comportamento. Este macho sofreu muda em 19/07, doze dias após a tentativa de cópula.

- Ocorrência de muda após a cópula - Macho (10.2 mm) que copulou normalmente com fêmea ovígera (9.0 mm) no dia 06/07 sofreu muda em 15/07, nove dias após a ocorrência da cópula. O mesmo copulou normalmente após a incidência de muda; nenhuma diferença de comportamento foi observada entre os acasalamentos ocorridos antes e depois da ecdise.

- Agressividade da fêmea - Não foi possível avaliar a capacidade das fêmeas em realizar cópulas múltiplas com machos diferentes, em um mesmo dia. As fêmeas sujeitas a este experimento, após copular com o primeiro macho eram agressivas e não

permitiam a aproximação de machos diferentes para realização de nova cópula. No entanto, quando o primeiro macho era inserido novamente junto a ela, o acasalamento ocorria novamente.

- Agressividade dos machos - Os machos submetidos ao experimento com combinação de 2 machos maiores + 1 fêmea menor e/ou 1 macho maior + 1 macho menor + 1 fêmea apresentaram comportamento agressivo e por isso não foi possível realizar as cinco réplicas pretendidas para esta combinação. Em todos os casos, imediatamente após a retirada da tela de separação no aquário, o macho maior ia diretamente ao encontro do outro macho, agarrando-o e arrancando os pereiópodos do oponente. Entre os machos que tiveram membros arrancados por outro indivíduo, um deles sofreu autotomia dos membros restantes no dia seguinte ao do experimento. Só foi possível a realização desta combinação com apenas três machos menores que 12 mm de LC.

Em relação às combinações dos casais submetidos aos experimentos, o tempo da fase de cópula nas combinações “C” e “D” foi o mais longo, com média de 7.5 ± 1.11 e 7.4 ± 0.84 minutos, diferindo significativamente dos demais ($F=15.293$, $p<0,001$). Apesar dos valores discrepantes observados em relação ao tempo gasto durante a fase pré-copulatória, não foi constada diferença significativa entre as combinações ($H = 9,804$, $p = 0,04$). Os machos que levaram menos tempo na fase pré-copulatória foram os submetidos à combinação “E”, com média de 0.54 ± 0.34 segundos. Porém, os machos mantidos na combinação “A” gastaram em média 2.03 ± 1.10 minutos até iniciarem a fase da cópula (Tabela 1).

Os dois eventos consecutivos de cópula ocorreram entre casais da combinação “A” e “D”. O casal da combinação “A” constituía-se por 1 macho (14.9 mm) + 1 fêmea pós-puberal (10.3 mm) que copularam por 5 min no primeiro evento e por 2 min no segundo. Na combinação “D”, composta por 1 macho (12.4 mm) + 1 fêmea ovígera (12.2), o primeiro evento durou 8.5 min e o segundo 3.4 min.

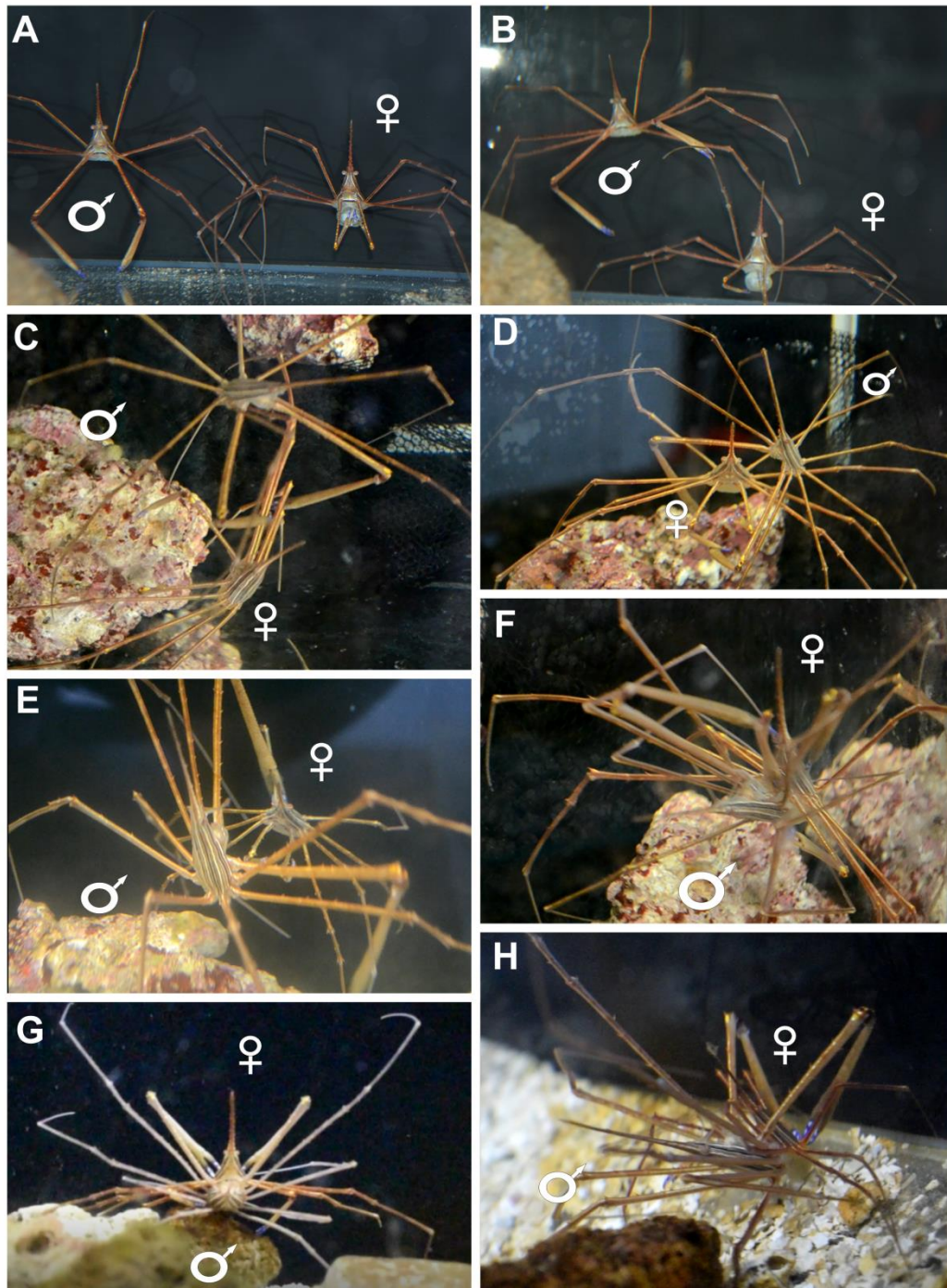


Figura 1. *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788). Comportamento de cópula. A-B Fase de pré-cópula: macho persegue a fêmea, tateando todo o seu corpo com o segundo par de pereiópodos e agarrando-a com os quelípodos. C-H Fase de cópula: o macho posiciona a fêmea ventralmente ao seu abdome. Ambos flexionam os abdomes para trás

e justapõem as partes ventrais, com ambos os pléons abertos para inserção dos gonopódios do macho no par de gonóporos da fêmea.

Tabela 1. *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788). Duração em minutos (média \pm DP) de cada uma das fases do comportamento de cópula, em cada combinação. N = número de observações; LC = Largura da carapaça (média \pm DP).

Combinações				Fase pré-copulatória	Fase de cópula
	N	LC ♂	LC ♀	Tempo	Tempo
A:1 ♂ maior + 1 ♀ menor (pós-puberal)	4	13.8 \pm 1.04	11.0 \pm 1.01	2.03 \pm 1.10	3.9 \pm 1.61
B:1 ♂ menor + 1 ♀ maior	3	11.4 \pm 1.1	12.9 \pm 1.41	1.5 \pm 1.12	3.4 \pm 1.01
C:2 ♂ maiores + 1 ♀ menor	3	11.1 \pm 2.1	9.8 \pm 1.01	1.12 \pm 0.50	7.5 \pm 1.11
D:1 ♂ maior + 1 ♀ ♀	5	12.9 \pm 1.6	10.4 \pm 1.10	1.73 \pm 1.17	7.4 \pm 0.84
E:1 ♂ maior + 1 ♀ ♀ + 1 ♀	5	11.1 \pm 1.3	9.4 \pm 1.96	0.54 \pm 0.34	5.0 \pm 0.83

Discussão

O comportamento copulatório, observado em *S. seticornis*, é semelhante ao descrito anteriormente para outros majóideos (Watson 1970; Laufer & Ahl 1995; Bouchard et al. 1996; Jones & Hartnoll 1997; González-Gurriarán et al. 1998), o qual é caracterizado pela aproximação do macho em direção à fêmea, posicionando a parte ventral do seu corpo para cima e a fêmea com o lado ventral voltado para baixo, de frente para o abdome do macho, com ambos os pléons abertos para inserção dos gonopódios do macho no par de gonóporos da fêmea (Sal Moyano & Gavio 2012). O comportamento de guarda pós-copulatório, comum entre caranguejos braquiúros (Hartnoll 1968; Laufer & Ahl 1995; Jones & Hartnoll 1997; Sainte-Marie et al. 1997; Sal Moyano & Gavio 2012) não ocorreu neste estudo para *S. seticornis*, observado em cativeiro. González-Gurriarán et al. (1998), também, relataram a ausência de qualquer proteção pós-copulatória em *Maja squinado*. O comportamento de guarda, geralmente, está relacionado com a condição da fêmea, quando a mesma está com a carapaça descalcificada no momento da cópula (Hartnoll 1969; Salmon 1983).

Este estudo mostrou que a cópula com a carapaça calcificada é uma situação usual para *S. seticornis*. Este sistema de acasalamento foi descrito, anteriormente, para outras espécies de Majoidea, tais como *Inachus dorsettensis* estudada por Diesel (1989, 1991) e *Libinia emarginata* investigada por Hinsch (1968). Nessas espécies, o desenvolvimento das gônadas começa após a muda puberal e, em *M. squinado*, o desenvolvimento dos receptáculos seminais apresenta a mesma sequência temporal. Enquanto que, o desenvolvimento dos ovários e dos receptáculos seminais de espécies de Majoidea que copulam com a carapaça descalcificada e apresentam comportamento de guarda, inicia-se antes da muda puberal (Lanteigne et al. 1996; González-Gurriarán et al. 1998). Somente com o conhecimento sobre o desenvolvimento gonadal de *S. seticornis* é que se poderia afirmar se esta espécie apresenta o padrão descrito acima ou outro tipo de relação com o tipo de cópula. Desse modo, há necessidade de um estudo mais detalhado sobre as condições de desenvolvimento gonadal de *S. seticornis* para se chegar a uma posição satisfatória quanto a esta questão.

Em *S. seticornis*, as fêmeas em intermuda com ovos próximos à incubação, ou que incubaram seus ovos, recentemente e, também, as ovígeras são mais atraentes para os machos, assim como verificado por Jones & Hartnoll (1997) em *I. dorsettensis*. Em

contraste, as fêmeas que se tornaram maduras, recentemente, não são muito atrativas. Segundo Jones & Hartnoll (1997), amostras de campo (Hartnoll, unpubl.) mostraram que apenas uma pequena porcentagem das fêmeas que tinham sofrido muda da puberdade, recentemente, havia acasalado, corroborando com a teoria de que a cópula com a carapaça descalcificada, logo após a muda da puberdade não é uma regra. Alguns fatores indicam que esta estratégia reprodutiva pode ser uma adaptação para o sucesso reprodutivo entre as espécies de Majoidea. Tais fatores incluem: a maturação dos ovários ocorrer algumas semanas após a muda da puberdade; intervalo de poucos dias entre a liberação de desovas subsequentes; a capacidade das fêmeas em realizarem cópulas múltiplas e a estrutura do receptáculo seminal, a qual garante que os espermatozoides da última cópula, provavelmente, sejam os fecundados (Jones & Hartnoll 1997).

O tamanho dos machos de *S. seticornis* não parece interferir na receptividade das fêmeas, visto que nas combinações em que o macho era menor que a fêmea, a cópula ocorreu com sucesso. Apenas um, entre os machos selecionados para os experimentos, não conseguiu inserir o gonopódio na fêmea, apesar de aparentar já estar morfológicamente maduro e ser maior que outros machos, que copularam normalmente. Para *C. opilio*, apenas machos grandes, morfometricamente maduros são fisiologicamente funcionais, aptos a se envolver em um abraço pré-copulatório e copular com sucesso; enquanto que os machos menores com quelípodos indiferenciados são funcionalmente imaturos, não demonstram sequências pré-copulatórias, mas têm espermatóforos nos canais deferentes (Conan & Comeau 1986).

Machos imaturos de *S. seticornis*, com o abdome selado, quando dissecados para as análises de descrição do sistema reprodutor masculino, também, continham espermatóforos formados no vaso deferente (observação pessoal). No entanto, estudos realizados em outras espécies demonstraram que, tanto os morfometricamente imaturos, quanto os maduros têm a capacidade de copular (Paul & Paul 1990; Sainte-Marie & Lovrich 1994), embora exibam comportamentos contrastantes (Sainte-Marie et al. 1997). Por esta razão, a maturidade funcional deveria ser definida pela capacidade dos machos (em intermuda) em transferir esperma e fertilizar os oócitos (Elner & Beninger 1989; Sainte-Marie et al. 2008). Machos morfologicamente imaturos de *L. spinosa* copularam com sucesso em ensaios competitivos e não competitivos. Na presença de machos maduros, os caranguejos imaturos de *L. spinosa* só acasalaram quando o macho

maduro não mostrou interesse pela fêmea. Assim, os machos morfologicamente imaturos de *L. spinosa* são funcionalmente maduros e capazes de copular, apesar de não terem sofrido a muda puberal (Sal Moyano & Gavio 2012).

O comportamento agonístico entre machos de tamanhos e estágios de maturação diferentes são fatores que interferem diretamente no sucesso reprodutivo (Rondeau & Sainte-Marie 2001). Os machos exibem tal comportamento agressivo, quando competem pelas fêmeas e, nessas circunstâncias, o tamanho do macho parece ser importante para o acasalamento bem sucedido (Conan & Comeau 1986; Moriyasu & Conan 1988). Em situações competitivas de acasalamento, os machos com quelípodos maiores de *C. opilio* e *L. spinosa* têm mais vantagens na obtenção da fêmea do que indivíduos com quelípodos menores (Sainte-Marie et al. 1997; Sal Moyano & Gavio 2012). Os resultados obtidos para *S. seticornis* parecem ser semelhantes aos de Sainte-Marie et al. (1997) e Sal Moyano & Gavio (2012), devido ao fato dos machos maiores, quando submetidos as combinações com indivíduos menores, impedirem a aproximação do outro macho de maneira muito agressiva, utilizando os quelípodos para segurar e arrancar os pereiópodos do macho menor e, conseqüentemente, garantir a cópula. No entanto, maior número de ensaios é necessário, nesta situação, para se estabelecer um padrão comportamental para *S. seticornis*. Nos experimentos em que a diferença na largura da carapaça entre os machos era menor e pertenciam a uma mesma classe de tamanho, não houve confronto nem manifestações de agressividade. O macho mais ativo, que percebia a presença da fêmea e a tocava primeiramente, obtinha sucesso na cópula, sem a interferência do outro macho presente no aquário.

Alguns autores sugerem que a percepção da presença da fêmea pelo macho seja influenciada por feromônios liberados pela fêmea e dissipados na água, classificados em “feromônios de distância e contato” (Bouchard et al. 1996; Jones & Hartnoll 1997; Kamio et al. 2002). Os feromônios de contato são substâncias insolúveis segregadas através dos canais dos poros distribuídos sobre toda a cutícula da fêmea, que são percebidos pelos machos durante a palpação (tato), por meio de quimiorreceptores localizados em suas patas locomotoras (Kamio et al. 2002). O comportamento de palpação envolve o contato repetido dos machos, com o exoesqueleto de outros indivíduos, usando o segundo par de antenas ou de pereiópodos, os quelípodos e partes do aparelho bucal (Borowsky & Borowsky 1991). O acasalamento em *S. seticornis*, parece ser induzido por feromônios de contato, visto que o feromônio de distância está

mais relacionado com o comportamento de guarda (Kamio et al. 2002), o qual não foi verificado em *S. seticornis*.

Durante os experimentos de cópula de *S. seticornis* foram observados dois eventos de canibalismo dos machos sobre as fêmeas. Estudos recentes sobre canibalismo em Decapoda concentram-se nos efeitos deste comportamento na estrutura das populações naturais e, também de cativeiro, em relação ao recrutamento e densidade de indivíduos, que podem ser ajustados pela predação entre megalopas ou juvenis. (Ryer et al. 1997; Fernández 1999; Luppi et al. 2005). O comportamento canibal em populações naturais pode ser favorável à utilização sustentável de recursos e no controle de indivíduos com desenvolvimento e morfologia irregular (Dutil et al. 1997; Baras et al. 2000; Luppi et al. 2001; Mirera & Moksnes 2013). No entanto, o significado adaptativo ou funcional deste tipo de comportamento no momento da cópula ainda não foi compreendido ou analisado. Greenspan (1982) observou um macho de *Uca pugnax* predando uma fêmea congênere, durante experimento de acasalamento em laboratório, mas não discutiu o caso. Koga et al. (1995) relacionaram as funções do canibalismo em caranguejos violinistas no ambiente natural com a manutenção de uma dieta de alta qualidade e com a redução de concorrentes para alguns recursos, como parceiras para o acasalamento e espaço para as tocas.

Apesar de algumas situações isoladas, que exigem ensaios aprofundados para sua compreensão, o padrão comportamental exibido por *S. seticornis*, em laboratório, foi muito similar aos descritos previamente para outras espécies de Majoidea. Além disso, as fêmeas oriundas da natureza ainda imaturas sofreram a muda da puberdade no laboratório, copularam somente em condições experimentais e exteriorizaram massa de ovos. Tais eventos estimulam a continuidade dos esforços para elaboração de protocolos de cultivo para a espécie, mesmo com o fato dos embriões não terem completado o desenvolvimento. A perda de ovos em cativeiro pode ser relacionada com a ausência de sedimento adequado para desova. Na natureza, as fêmeas ovígeras, provavelmente, selecionariam sedimentos arenosos mais grossos ou mais adequados, de acordo com a preferência de cada espécie para desovarem, possivelmente para um melhor fornecimento de oxigênio à massa de ovos (Pinheiro et al. 1996).

O aprimoramento das lacunas reveladas a partir dos resultados obtidos neste estudo pode ser usado para manutenção de reprodutores em cativeiro e possibilitar sua

reprodução, a qual pode ser utilizada não somente para o cultivo, mas também para o restabelecimento de áreas degradadas.

Referências

- Adams, A. E.; Paul, A. J. 1983. Male parents size, sperm storage and egg-production in the crab *Chionoecetes bairdi* (Decapoda, Majidae). International Journal of Invertebrate Reproduction 6: 181-187.
- Alves, D.F.R.; Barros-Alves, S.P.; Cobo, V.J., Lima; D.J.M., Fransozo, A. 2012. Checklist of the brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda) in the rocky subtidal of Vitória Archipelago, southeast coast of Brazil. Check List. 8, 940-950.
- Baal, H. J. 1953. Behavior of spider crab in the presence of *Octopus*. Nature 171: 887.
- Baras, E.; Maxi, M.Y.J.; Ndao, M.; Mélard, C. 2000. Sibling cannibalism in dorada under experimental conditions (II) Effect of initial size heterogeneity, diet and light regime on early cannibalism. Journal of Fish Biology, 57:1021-1036.
- Bauer, R. T. 1986. Sex change and life history pattern in the shrimp *Thos manningi* (Decapoda: Caridea): a novel case of partial protandric hermaphroditism. Biological Bulletin, 170: 11-31.
- Bauer, R.T. 1996. A test of hypotheses on male mating systems and female molting in decapod shrimp, using *Sicyonia dorsalis* (Decapoda: Penaeoidea). Journal of Crustacean Research 16: 429-437.
- Beninger, P. G.; Elnor, R. W.; Foyle, T. P.; Odense, P. H. 1988. Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. Journal of Crustacean Biology 8: 322-332.
- Beninger, P.; Elnor, R.; Poussart, Y. 1991. The gonopods of the majid crab *Chionocetes opilio* (O. Fabricius). Journal of Crustacean Biology 11, 217-228.
- Bouchard, S.; Sainte-Marie, B.; McNeil, J. N. 1996. Indirect evidence indicates female semiochemicals release male precopulatory behavior in the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae). Chemoecology 7: 39-44.
- Borowsky, B.; Borowsky, R. 1991. The reproductive behaviors of the amphipod crustacean *Gammarus palustris* (Bousfield) and some insights into the nature of their stimuli. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 107:131-144
- Carlisle, D. B. 1957. On the hormonal inhibition of moulting in decapod Crustacea. 2. The terminal anecdysis in crabs. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 36: 291-307.

- Cobo, V. J. 2002. Breeding period of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* from Couves Island, south-eastern Brazilian coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 82: 1031–1032.
- Correa, C.; Thiel, M. 2003. Mating systems in caridean shrimp (Decapoda: Caridea) and their evolutionary consequences for sexual dimorphism and reproductive biology. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76: 187-203.
- Cowan, D. F. 1991. The role of olfaction in courtship behavior of the American lobster, *Homarus americanus*. *Biological Bulletin*, 181: 402-407.
- Conan, G. Y.; M. Comeau 1986. Functional maturity and terminal molt of male snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 43: 1710-1719.
- Crane, J. 1957. Basic patterns of display in fiddler crabs (Ocypodidae, genus *Uca*). *Zoologica*, 42: 69–82.
- 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 Crustacean Biology*, 9: 266–277.
- Diesel, R. 1991. Sperm competition and the evolution of mating behavior in Brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae). In, R. T. Bauer & J. W. Martin (eds.) *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, New York. 220: 213–223.
- Dutil, J-D.; Munro, J.; Peloquin, M. 1997. Laboratory study of the influence of prey size on vulnerability to cannibalism in snow crab (*Chionoecetes opilio* O. Fabricius, 1780). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 212(1997):81-94.
- Eales, A. J. 1974. Sex pheromone in the shore crab *Carcinus maenas* and the site of its release from females. *Marine Behavior Physiology*, 2: 345–355.
- Elner, R. W.; P. G. Beninger 1989. Comment on functional maturity in small male snow crab (*Chionoecetes opilio*): sizing up the evidence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 46: 2037-2039.
- Fernández, M. 1999. Cannibalism in Dungeness crab *Cancer magister*: effects of predator-prey size ratio, density and habitat type. *Marine Ecology Progress Series*, 182:211-230.

- Gleenson, R. A. 1991. Intrinsic factors mediating pheromone communication in the blue crab, *Callinectes sapidus*. Pages 17–32 in R. T. Bauer & J.W. Martin (eds.) Crustacean sexual biology. Columbia University Press, New York. 355 p.
- Greenspan, B.N. 1982 Semi-monthly reproductive cycles in male and female fiddler crabs, *Uca pugnax*. *Animal Behavior*, 30:1084-1092.
- González-Gurriarán, E.L.; Fernandez, J. F.; Muiño, R.1998. Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 220: 269-285.
- Hartnoll, R. G. 1968. Reproduction in the burrowing crab, *Corystes cassivelaunus* (Pennant, 1777) (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana*, 15: 165-170.
- Hartnoll, R. G. 1969. Mating in the Brachyura. *Crustaceana*, 16: 161-181.
- Herborg, L. M.; Bentley, M. G.; Clare, A. S.; Last, K. S.2006. Mating behavior and chemical communication in the invasive Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 329: 1-10.
- Hinsch, G. W. 1968. Reproductive behavior in the spider crab, *Libinia emarginata* (L.). *Biological Bulletin*, 135: 273-278.
- Hooper, R. G. 1986. A spring breeding migration of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (O. Fabr.), into shallow water in Newfoundland. *Crustaceana*, 50: 257-264.
- Jones, D.R.; Hartnoll, R.G. (1997) Mate selection and mating behavior in spider crabs. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 44, 185–193.
- Kamio, M.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. 2002. Copulation pheromone in the crab *Telmessus cheiragonus* (Brachyura: Decapoda). *Marine Ecology Progress Series*, 234: 183-190.
- Knowlton, N. 1980. Sexual selection and dimorphism in two demes of a symbiotic, pair-bonding snapping shrimp. *Evolution*, 34: 161-173.
- Koga, T. 1995. Movements between microhabitats depending on reproduction and life history in the sand-bubbler crab *Scopimera globosa*. *Marine Ecology Progress Series*, 117: 65–74.
- Lanteigne, C., Beninger, P.G., Gionet, C. 1996. Ontogeny of female primary sexual characters in the majid crabs *Chionoecetes opilio* and *Hyas coarctatus*. *Journal of Crustacean Biology*, 16: 501–514.

- Laufer, H.; Ahl, J. 1995. Mating behavior and methyl farnesoate levels in male morphotypes of the spider crab, *Libinia emarginata* (Leach). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 193: 15-20.
- Lisenmair, K. E. 1967. Konstruktion und signalfunktion der sandpyramide der Reiterkrabbe *Ocypode saratan* Forsk (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Zoology Tierpsychology*, 24: 403–456.
- Luppi, R. A.; Spivak, E.D.; Anger, K. 2001. Experimental studies on predation and cannibalism of the settlers of *Chasmagnathus granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* (Brachyura: grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 265: 29-48.
- McCleese, D. W.; Spraggins, R. L.; Bose, A. K.; Praminik, B. N. 1977. Chemical and behavioral studies of the sex attractant of the lobster (*Homarus americanus*). *Marine Behavior and Physiology*, 4: 219-232.
- Mirera, O. D.; Moksnes, P-O. 2013. Cannibalistic interactions of juvenile mud crabs *Scylla serrata*: the effect of shelter and crab size. *African Journal of Marine Science*, 35(4):545-553.
- Moriyasu, M.; Comeau, M. 1988. Aquarium observations on mating behavior of snow crab *Chionoectes opilio*. *International Council for the Exploration of the Sea CM*, K9: 14 pp.
- Mura, M.; Orrù, F.; Cau, A. 2005. Size at sexual maturity of the spider crab *Anamathia rissoana* (Decapoda: Majoidea) from the Sardinian Sea. *Journal of Crustacean Biology* 25: 110-115.
- Nakashima, Y. 1987. Reproductive strategies in a partially protandric shrimp, *Athanas kominatoensis* (Decapoda: Alpheidae): Sex change as the best of a bad situation for subordinates. *Journal Ethology*, 5: 145-159.
- Parker, G. A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, 45: 525-567.
- Paul, A. J. 1984. Mating frequency and viability of stored sperm in the Tanner crab *Chionoecetes bairdi* (Decapoda, Majidae). *Journal of Crustacean Biology*, 4: 375-381.
- Paul, A. J.; Paul, J. M. 1990. Breeding success of sublegal size male red king crab *Paralithodes camtschatica* (Decapoda, Lithodidae). *Journal of Shellfish Research*, 9: 29-32.

- Paul, A.J.; Paul, J.M. 1992. Second clutch viability of *Chionoecetes bairdi* Rathbun (Decapoda: Majidae) inseminated only at the maturity molt. *Journal Crustacean Biology*, 12: 438–441.
- Pinheiro, M. A. A.; Fransozo, A.; Negreiros-Fransozo, M. L. 1996 Distribution patterns of *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Crustacea, Portunidae) in Fortaleza Bay, Ubatuba (SP), Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 56(4): 705-716.
- Okamori, C.M.; Cobo, V.J. 2003. Fecundity of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* in the southeastern Brazilian coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83: 979-980.
- Ryer, C.H.; van Montfrans, J.; Moody, K. E. 1997. Cannibalism, refuge and the molting blue crab. *Marine Ecology Progress Series*, 147:77-85.
- Rondeau, A.; Sainte-Marie, B. 2001. Variable mate-guarding time and sperm allocation by male snow crabs (*Chionoecetes opilio*) in response to sexual competition, and their impact on the mating success of females. *Biological Bulletin*, 201: 204-217.
- Ryan, E. P. 1966. Pheromone: Evidence in a decapod crustacean. *Science*, 151: 340–341.
- Sagi, A.; Ahl, J.; Danaee, H.; Laufer, H. 1994. Methyl farnesoate levels in male spider crabs exhibiting active reproductive behavior. *Hormones and Behavior*, 28: 261-272.
- Sainte-Marie, B.; Lovrich, G. 1994. Delivery and storage of sperm at first mating of female *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae) in relation to size and morphometric maturity of male parent. *Journal of Crustacean Biology*, 14: 508-521.
- Sainte-Marie, B.; Lovrich, G. 1997. Laboratory behavior of adolescent and adult males of the snow crab *Chionoecetes opilio* mated non-competitively and competitively with primiparous females (Brachyura:Majidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 54: 239-248.
- Sainte-Marie, B.; Gosselin, T.; Sèvigny, J. M.; Urbani, N. 2008. The snow crab mating system: opportunity for natural and unnatural selection in a changing environment. *Bulletin of Marine Science*, 83: 131-161.
- Sal Moyano, M. P.; Gavio, M. A.; Cuartas, E. I. 2010. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. *Helgoland Marine Research*, 64: 213-221.

- Sal Moyano, M. P.; Gavio, M. A. 2012. Comparison of mating behavior and copulation in male morphotypes of the spider crab *Libinia spinosa* (Brachyura: Majoidea: Epialtidae). *Journal of Crustacean Biology*, 32(1), 31-38.
- Salmon, M.; Atsides, S. 1968. Visual and acoustic signaling during courtship of fiddler crabs (genus *Uca*). *American Zoology*, 8: 623-639.
- Salmon, M. 1983. Courtship, mating systems, and sexual selection in Decapods. Pp. 143-169. *In: Rebach, S. & Dunhan, D. W. (eds.) Studies in adaptation: the behavior of higher crustacean*, New York: J. Wiley and Sons.
- Sampedro, M. P.; González-Gurriarán, E.; Freire, F.; Muino, R. 1999. Morphometry and sexual maturity in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in Galicia, Spain. *Journal of Crustacean Biology*, 9: 578-592.
- Sastry, A. N. 1983. Ecological aspects of reproduction. Pp. 179-270. *In: Vernberg, F. J. & Vernberg, W. B. (eds.) The Biology of Crustacea, Vol. 8, Environmental Adaptations*, New York: Academic Press.
- Schöne, H. 1961. Complex behavior. *In: Waterman, T. H. (ed.) The Physiology of Crustacea. Vol. II. Sense Organs, Integration and Behavior. Chap. 13*, Academic Press, N.Y. p. 465-520
- Sokal, R.; Rohlf, F.J. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, 3rd edition. WH Freeman and Company, New York.
- Thornhill, R.; Alcock, S. 1983. *The evolution of insect mating systems*. Cambridge, Mass: Harvard University Press.
- van den Brink, A. M.; McLay, C. L. 2009. Use of the sterile male technique to investigate sperm competition, storage, and use in a pill box crab, *Halicarcinus cookii* (Brachyura: Hymenosomatidae). *Journal of Crustacean Biology*, 29: 62-69.
- Watson, J. 1970. Maturity, mating and egg lying in the spider crab, *Chionoecetes opilio*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 27: 1607-1616.

CAPÍTULO IV

Efeitos da temperatura e salinidade na sobrevivência larval do caranguejo ornamental *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788) (Decapoda, Majoidea, Inachoididae): com manejo de reprodutores e obtenção de larvas em um novo sistema recirculante

RESUMO

Testou-se a viabilidade de um sistema recirculante para a manutenção de reprodutores e obtenção de larvas e ainda, verificou-se o efeito da salinidade e temperatura para a sobrevivência larval de *Stenorhynchus seticornis*. Esta espécie é explorada comercialmente e possui fase larval curta (2 estágios de zoea e 1 megalopa). Inicialmente, utilizou-se um sistema composto por seis aquários, com recirculação de água e sistema de filtragem (capacidade de 400 L), para acondicionar os reprodutores e obter as larvas, as quais foram usadas nos experimentos de salinidade e temperatura. As 15 fêmeas ovígeras, mantidas no sistema proposto, liberaram de 1 a 4 lotes de larvas viáveis cada, durante o período de dois meses. As larvas foram submetidas a tratamentos de quatro temperaturas (23, 25, 27 ou 29 °C) e quatro salinidades (25, 30, 35 ou 40), testando-se o efeito dessas variáveis na sobrevivência e duração dos estágios larvais. Um total de 960 larvas (zoeas I), provenientes de sete fêmeas, foi distribuído em lotes de 20 larvas acondicionadas em frascos de vidro (500 ml), os quais foram vistoriados, diariamente, quanto à ocorrência de muda ou morte dos indivíduos. As larvas foram alimentadas com nauplius recém-eclodidos de *Artemia* sp. (5 nauplius/mL). O desenvolvimento larval completo levou de 22 a 25 dias, apenas nas condições experimentais de 23°C de temperatura e 35 de salinidade, no qual 6,6% das larvas atingiram o estágio de juvenil e foram necessários de 20 a 25 dias para o desenvolvimento pós-embriônico completo, considerando todas as condições experimentais.

Palavras-chave: larvicultura, desenvolvimento, crustáceos marinhos, aquicultura

INTRODUÇÃO

Um número crescente de esforços está direcionado para a compreensão do ciclo de vida dos crustáceos marinhos com interesse ornamental, bem como o desenvolvimento de técnicas para seu cultivo (Calado et al., 2003; Calado et al., 2007, 2008; Olivotto et al., 2011). A princípio, o desenvolvimento de métodos para cultivo em escala comercial está focado em um reduzido número de espécies, que inclui principalmente os camarões do gênero *Lysmata* (ver Fletcher et al., 1995; Palmtag and Holt, 2001; Calado et al., 2003a). A larvicultura mostra-se como o principal entrave para o cultivo da maioria das espécies de organismos aquáticos (Borghetti and Ostrensky, 2000); portanto, a apresentação de técnicas específicas para as espécies ornamentais é essencial para o sucesso da produção.

Os sistemas recirculantes têm sido aprimorados nos últimos anos (Calado et al., 2003; Calado et al., 2007, 2008; Palmtag and Holt 2007; Penha-Lopes et al., 2005; Gregati et al., 2010), tanto para o cultivo de larvas, como para manutenção de reprodutores, com intuito de otimizar o tempo requerido para as atividades de rotina e minimizar possíveis estresses dos reprodutores (Calado et al., 2007). Nesse sentido, os avanços também contribuem para a constante busca de melhora na qualidade da água e para criar condições cada vez mais adequadas e eficientes para o cultivo, e.g. eliminando a necessidade de retirada dos reprodutores do sistema, após a liberação das larvas, mas ao mesmo tempo, evitando o canibalismo (Calado et al. 2007).

No entanto, pouca atenção tem sido dada às espécies menos atraentes, mas com funções importantes ou, ainda, pouco valorizadas no mercado da aquariofilia (Calado et al., 2003, 2009; Olivotto et al., 2011), visto que, o baixo custo de coleta de tais espécies na natureza as torna pouco atrativas para o cultivo em escala comercial (Olivotto et al., 2011). Contudo, com o desenvolvimento de sistemas simples, eficientes e com baixos valores de elaboração, aliado a utilização de espécies menos valorizadas pode ser uma alternativa para exploração em ambiente natural e incentivo para comercialização sustentável.

Diversos são os estudos que analisam a influência da temperatura e/ou salinidade sobre o desenvolvimento larval de crustáceos decápodes, principalmente, caranguejos. Entre eles podemos destacar os realizados por Costlow et al. (1960, 1962, 1966), Vinuesa et al. (1985), Fransozo and Negreiros- Fransozo (1986); Negreiros-Fransozo

and Fransozo (1990), Anger et al. (1990), Anger (1991), Pinheiro et al. (1994), Sulkin et al. (1996), Ismael et al. (1997), Lárez et al. (2000), Luppi et al. (2003), Paula et al. (2003), Barría et al. (2005), Li and Hong (2007), Nurdiani and Zeng (2007) e Simith and Diele (2008). Em tais estudos, verificou-se que há a influência desses fatores ambientais no desenvolvimento larval, com consequências importantes, e.g., para o tamanho, o tempo de desenvolvimento e para a mortalidade dessas larvas. A maioria dos trabalhos (acima citados), demonstraram que a temperatura, geralmente, causa um maior efeito sobre o desenvolvimento larval, do que a salinidade (Anger, 1983; Minagawa, 1990; González-Ortegón and Giménez, 2014). Nesse sentido, para *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788), em tratamento com maiores temperaturas registrou-se uma menor duração (dias) das duas fases de zoea, da fase de megalopa e do primeiro estágio de juvenil, a partir de espécimes obtidos na costa leste da Venezuela (Hernández et al., 2012).

Para algumas espécies de crustáceos decápodos verificou-se que uma maior temperatura da água pode resultar em um menor tempo de desenvolvimento e em uma maior taxa de sobrevivência larval, além disso, ainda pode elevar a amplitude de suporte à variação de salinidade (e.g. Calado et al., 2005; Hernández et al., 2012). Entretanto, alguns pesquisadores (Sulkin et al., 1996; Barría et al., 2005; Anger, 2001) apontam que em maiores temperaturas, o desenvolvimento acelerado das fases larvais, pode gerar um baixo incremento de tamanho à longo prazo. Assim, larvas que se desenvolvem em temperaturas “ideais” para a espécie (não necessariamente mais elevadas) tornam-se juvenis mais resistentes e alcançam índices de sobrevivência mais elevados (Anger, 1983; Anger, 1991).

Por outro lado, o efeito da salinidade sobre o tempo de desenvolvimento das larvas de decápodos parece ser mais variado (Anger 2003). Entretanto, para algumas espécies foi possível verificar uma tendência na qual em maiores salinidades observam-se maiores taxas de sobrevivência larval (Anger, 2003). Contudo, sabe-se que algumas espécies podem necessitar de diferentes amplitudes de salinidades, de acordo com o estágio de desenvolvimento larval (Anger et al., 1990; Anger, 1991), o que deve ser verificado para o desenvolvimento de um protocolo adequado de cultivo.

Inicialmente, este estudo descreve e testa um sistema de pequeno porte, fechado dinâmico e com circulação de água, para a manutenção de reprodutores e obtenção de larvas do caranguejo ornamental *S. seticornis*. Adicionalmente, verificou-se o efeito

combinado da salinidade e temperatura no tempo de desenvolvimento e na sobrevivência dos diferentes estágios larvais da espécie selecionada.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e seleção dos reprodutores

Exemplares de *S. seticornis* foram obtidos de 14 de junho de 2013 até 26 de agosto de 2013, no sublitoral rochoso de duas ilhas litorâneas no município de Ubatuba, Estado de São Paulo: Ilha da Rapada (23°25'S-44°54'W) e Ilha das Couves (23°25'S-44°51'W). Estas localidades foram selecionadas pelo fato desta espécie ser abundante em tais localidades (ver Cobo, 2002; Okamori & Cobo, 2003; Alves et al., 2012). Os caranguejos foram capturados, manualmente, durante sessões diurnas de mergulho scuba, em profundidade entre 5 e 10 metros. Logo que capturado, cada exemplar foi individualizado em sacos plásticos, para prevenir a perda de apêndices. Na embarcação, os caranguejos foram colocados em caixas térmicas, contendo água do local de coleta e aeração constante; posteriormente, transportados até o continente. Durante o transporte até o laboratório de cultivo, situado na cidade de Botucatu, os caranguejos foram mantidos, individualmente, em pequenos potes plásticos numerados e perfurados para que houvesse circulação da água. O material biológico foi aclimatado para seguir viagem, em caixas térmicas com água do mar do local de coleta, sob aeração constante (por aerador à bateria) e gelo preso à tampa (sem contato com a água).

Sistema para manutenção de adultos e obtenção de larvas

Em laboratório, cada caranguejo foi mantido isolado, em um aquário retangular numerado (99 cm de comprimento x 19 cm de largura x 24 cm de altura, com volume total de 45 L), no qual havia fragmentos de rochas calcárias para refúgio. Os aquários foram interligados a um sistema recirculante, que formam um sistema de cultivo (baseado nos sistemas descritos por Calado et al., 2007 e Gregati et al., 2010). O sistema, composto por 6 aquários (totalizando 270 L), foi utilizado para acondicionar as fêmeas ovígeras de *S. seticornis*. As fêmeas ovígeras foram mensuradas quanto a maior largura da carapaça (LC) e o número de lotes de eclosão, liberado por cada fêmea ovígeras foi verificado, com intuito de avaliar a eficiência do sistema para manutenção de reprodutoras. O tempo dispensado para realização de todas as atividades de rotina do sistema foi registrado.

O sistema recirculante foi conectado a um sump (51 cm x 67 cm x 67 cm, com volume total de 134 L) equipado com skimmer (Bubble Magus® modelo NAC7), um

controlador de temperatura digital (precisão 0,1 °C) com aquecedores 300 w e filtro com lâmpada ultravioleta de 15 W. A cada dois dias foram efetuados testes de salinidade (refratômetro manual), amônia, nitrito (testes titulométricos Tropic Marin®), temperatura e pH (Hanna Instruments, modelo Misura Line 1030) para a caracterização da qualidade da água. Os caranguejos foram aclimatados em um fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, salinidade 35, temperatura 25° C e aeração contínua, com uma troca parcial de 20% do volume total do sistema realizada, mensalmente, utilizando-se água do mar filtrada e irradiada por luz ultravioleta. Os caranguejos foram alimentados diariamente, pela manhã, com rações para peixes ornamentais (Tetra Marine Flakes® e Tetra Color®) e pedaços de músculo de camarão e de lula. Além disso, durante o procedimento de alimentação, os aquários foram checados quanto à presença de larvas, obtidas por meio das armadilhas luminosas.

Cada aquário, contendo as fêmeas ovígeras, contaram com armadilhas de luz para obtenção das larvas que foram utilizadas no experimento posterior, tornando-se desnecessário o manuseio das matrizes. Ainda, nos sistemas de cultivo utilizados para acondicionar as fêmeas ovígeras estavam dispostos mini tanques-rede, os quais foram confeccionados com tubos de PVC (policloreto de vinil), de 4” de diâmetro e 150 mm de comprimento, sendo a parte inferior do mesmo revestido com tela de nylon com malha de 125 µm, sendo estes tubos utilizados para receber as larvas recém-eclodidas. Em torno destes tubos coloca-se uma tira de Isopor®, que os mantém suspensos verticalmente com a outra extremidade a cerca de 20 mm acima do nível da água no reservatório, formando recipientes de criação massiva.

Sobrevivência e desenvolvimento das larvas nos tratamentos de temperatura e salinidade

A fim de determinar a temperatura e salinidade mais adequadas para o desenvolvimento larval de *S. seticornis*, realizou-se um experimento totalmente casualizado, em esquema fatorial (4x4), com 16 tratamentos e 3 réplicas. O fator 1 foi a temperatura e os níveis testados foram 23, 25, 27 e 29 °C. O fator 2 foi a salinidade e os níveis testados foi 25, 30, 35 e 40. Somente as larvas que eclodiram em até cinco dias após a coleta das fêmeas ovígeras foram utilizadas nos experimentos (Gebauer et al., 2010); sendo que este critério diminui o efeito da criação das fêmeas ovígeras, em

laboratório, sobre a qualidade das larvas obtidas. Assim, no dia em que eclodiram larvas provenientes de, pelo menos, cinco fêmeas ovígeras, as mesmas foram transferidas para placas de Petri e contadas com uma pipeta de ponta grossa. Somente foram utilizadas nos experimentos as larvas que apresentarem movimentos de natação, fototaxia e morfologia normal (presença de todos os apêndices, espinhos e cerdas). Após tal seleção inicial, as larvas foram misturadas em um recipiente.

As larvas utilizadas nos experimentos foram o primeiro e segundo estágio de zoea (ZI e ZII, respectivamente) e o estágio de megalopa. Assim, larvas recém-eclodidas (ZI), provenientes de 7 fêmeas ovígeras de *S. seticornis*, foram capturadas imediatamente após a eclosão, a qual foi verificada todas as manhãs. As ZI foram distribuídas aleatoriamente entre os tratamentos e com isso, foram transferidas para béqueres, com capacidade para 250 mL cada um, com água do mar na temperatura e salinidade correspondente a cada tratamento. Os experimentos foram realizados de forma escalonada, para os estágios larvais subsequentes (ZII e megalopa) de *S. seticornis*. Para cada réplica, foram utilizadas 20 larvas, totalizando a utilização de 960 larvas (cerca de 140 larvas por fêmea) nos experimentos.

A salinidade de cada tratamento foi obtida pelo preparo de água do mar filtrada e UV-irradiada diluída em água deionizada. A salinidade de 40 foi obtida com a adição de sal marinho sintético, próprio para aquários marinhos (Coral Pro Salt, Red Sea®). Os béqueres foram mantidos em banho-maria, aquecidos com aquecedor acoplado a termostato para manutenção das temperaturas testadas com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. As larvas foram alimentadas diariamente, com nauplius recém eclodidos de *Artemia* sp. (5 nauplius/mL). Diariamente, as larvas foram cuidadosamente contadas e vistoriadas quanto ao estágio. Cada recipiente foi limpo, para retirada de restos de alimentos e 50% da água foi trocada por água do mar filtrada e nas mesmas condições de temperatura e salinidade. O experimento encerrou-se quando todas as larvas atingiram o estágio juvenil ou morreram. Todos os indivíduos mortos foram conservados em álcool 70% e as exúvias, em álcool com glicerina (1:1).

Análises dos Resultados

Os resultados foram analisados por meio de técnicas estatísticas padronizadas, de acordo com a natureza dos dados (Sokal and Rohlf, 1995). Primeiramente, os

resultados foram avaliados quanto à distribuição normal (Shapiro-Wilks) e homogeneidade das variâncias (Levene) (Zar, 2010). Os resultados apresentaram natureza não paramétrica, e por isso, as curvas livres de sobrevivência foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log rank, para testar as diferenças entre o tempo de sobrevivência e mortalidade das larvas entre os tratamentos de temperatura e salinidade (Lee, 1992). Além disso, teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para testar a diferença entre o tempo de desenvolvimento entre os diferentes estágios larvais (Zar, 2010). Os resultados foram considerados significativos com $p < 0.05$ (Sokal and Rohlf, 1995).

RESULTADOS

Sistema para manutenção de adultos e obtenção de larvas

A eficiência do sistema recirculante elaborado para este estudo (Figura 1) é evidenciada pelos dados referentes aos parâmetros de qualidade da água, os quais são apresentados na Tabela 1. As 15 fêmeas ovígeras mantidas no sistema variaram com relação ao tamanho médio ($8,91 \pm 1,20$ mmLC) e liberaram de 1 a 4 lotes de larvas viáveis cada, durante o período de dois meses, com média de $2,47 \pm 0,92$ lotes de larvas por fêmea ovígera (Tabela 2).

O tempo dispensado para realização da rotina diária de manejo, tais como a alimentação das fêmeas mantidas no sistema, verificação de liberação de larvas e posterior coleta, monitoramento da temperatura e salinidade da água, limpeza do skimmer e sifonagem de restos de alimento e reposição de água deionizada no sistema variou de 1 a 2 horas por dia.

Sobrevivência e desenvolvimento das larvas nos tratamentos de temperatura e salinidade

O desenvolvimento pós-embrionário de *S. seticornis* consiste de dois estágios de zoea e um estágio de megalopa, antes de atingir o estágio juvenil. As condições experimentais utilizadas no presente estudo, não afetaram este padrão de desenvolvimento.

O desenvolvimento larval completo ocorreu apenas nas condições experimentais de 23°C de temperatura e 35 de salinidade, no qual 6,6% (N = 4) das larvas atingiram o estágio de juvenil; e nas combinações de 25°C e 40 com somente 1,6% (N = 1) dos indivíduos atingindo o estágio juvenil. Nestas combinações de temperatura-salinidade, foram necessários 20 a 25 dias para que o desenvolvimento larval se completasse (Figura 2).

A sobrevivência no estágio de ZI foi de 39,6% (N = 376), considerando todas as condições experimentais. Em relação aos tratamentos, as maiores porcentagens de sobrevivência (81,6%) ocorreram nos tratamentos de 25°C e 35 e 25 ($\log rank = 26.96$, $df = 3$, $p < 0.001$) e a menor (6,6%) foi verificada em 27°C e 40 ($\log rank = 29.101$, $df = 3$, $p < 0.001$), com ambos tratamentos diferindo dos demais. Nos tratamentos de 23°C, combinados com salinidades de 25 e 30, todas as larvas morreram no primeiro e

segundo dia de experimento, respectivamente (Figura 3). O tempo de desenvolvimento variou de 2 a 6 dias entre o estágio de ZI para ZII, sendo que não houve diferença significativa entre o tempo de desenvolvimento entre estes estágios (Kruskal-Wallis; $H=6.02$, $p=0.915$). Nos tratamentos de 29°C, com salinidades de 25, 30 e 35, a primeira muda ocorreu no segundo dia; enquanto em salinidade 40, a primeira muda ocorreu depois de 3 dias. Nos tratamentos de 25°C e 27°C, a variação foi de 2 a 5; enquanto nos de 23°C, de 4 a 6 dias (Tabela 3).

Apenas 14% (N = 53) do total das larvas que atingiram o estágio de ZII sobreviveram até o estágio de megalopa. Entre os tratamentos, observou-se a maior sobrevivência no tratamento de 25°C e 40 (18.3%), diferindo dos demais tratamentos ($\log rank = 40.886$, $df = 3$, $p < 0.001$). Os tratamentos de 23°C e 35 (11.6%), 25°C e 30, 29°C e 30 e 29° e 25° (todos com 8.3%) diferiram dos demais tratamentos ($\log rank = 32.075$, $df = 1$, $p < 0.001$). Não houve sobrevivência nos tratamentos que combinaram 23°C e 25, 30 e 40 ou 27°C e 40 (Figura 3). O tempo de desenvolvimento variou de 3 a 8 dias entre o estágio de ZII para megalopa, sendo que não houve diferença significativa entre o tempo de desenvolvimento entre estes estágios (Kruskal-Wallis $H=12.68$, $p=0.392$). O tempo necessário para as larvas atingirem o estágio de megalopa variou de 3 a 6 nos tratamentos de 25°C, de 4 a 8 dias nos de 27°C, de 4 a 10 nos de 29°C e de 6 a 7 dias nos de 23°C e 35 de salinidade (Tabela 3).

A duração do estágio de megalopa até o estágio de juvenil variou de 10 a 13 dias nos tratamentos de 23°C e 35 e de 11 dias no tratamento de 25°C e 40. Nos demais tratamentos, não houve sobrevivência (Figura 3 e Tabela 3).

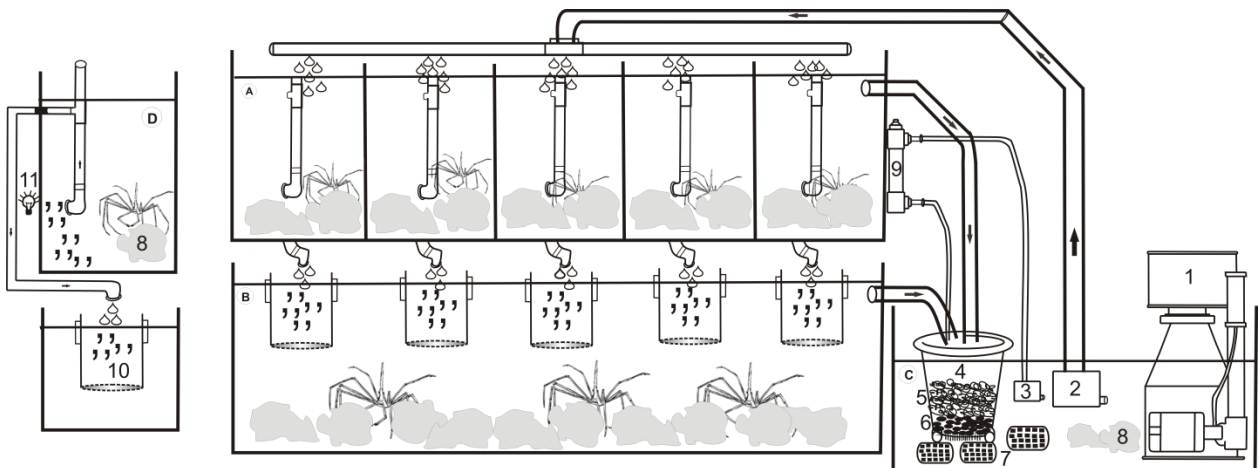


Figura 1. Sistema recirculante para a manutenção de reprodutores e captação de larvas em laboratório. A e B, aquários com 99 cm × 19 cm × 24 cm para manutenção dos reprodutores e captação das larvas; C, reservatório com 51 cm × 39 cm × 67 cm para o sistema de filtragem; 1= skimmer de proteínas; 2= bomba de recalque para os aquários; 3= bomba de recalque para o filtro com lâmpada UV; 4= recipinete de filtragem; 5= lâã acrílica; 6= cerâmica porosa; 7= carvão ativado; 8= rocha viva; 9= filtro UV; D, detalhe do sistema de captação das larvas; 10= recipientes de PVC com fundo de tela; 11= luz de LED. Flechas pretas indicam o sentido do fluxo de água.

Tabela 1. Dados referentes a fatores físico-químicos da água marinha do sistema recirculante para os reprodutores, mensurados diariamente por um período de 30 dias.

Características da água	DIAS																													
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Salinidade*	35	35	36	35	35	36	35	34	33	35	34	35	36	35	35	35	35	33	35	36	35	35	35	33	34	35	35	36	35	35
Temperatura**	25.3	25.0	25.6	25.8	25.0	25.1	24.5	25.0	24.8	25.0	25.0	24.6	24.1	25.6	25.0	25.0	25.9	25.7	25.0	25.3	25.0	26.2	26.3	24.9	25.0	25.0	25.3	25.1	25.0	24.5
Amônia***	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02
Nitrito***	4	4	3	2	4	5	4	2	3	1	3	5	4	1	4	3	4	1	2	3	2	5	6	2	1	2	3	2	2	4
Alcalinidade***	125	133	146	132	164	131	154	143	161	125	154	133	147	145	125	142	130	167	189	154	165	178	201	154	160	189	154	176	188	161
pH****	7.9	8.0	8.0	8.1	8.2	8.0	7.8	8.1	8.2	8.2	7.8	7.8	8.0	8.0	8.1	7.8	7.9	7.9	8.0	7.9	8.1	7.9	7.9	7.9	8.3	8.4	8.2	7.9	7.9	8.0

*refratômetro óptico, com unidade de medida em ‰; **termômetro digital (precisão 0,1°C) com unidade de medida em °C; ***teste titulométrico (Hanna Cheker) com unidades de medida em ppm para amônia e alcalinidade e ppb para nitrito; ****medidor digital (Hanna, modelo Misura Line, 1010), devidamente calibrado

Tabela 2. Número das fêmeas ovígeras (N° FF), maior largura da carapaça (LC) em milímetros (mm) e número de eclosões de cada fêmea em laboratório durante o período de dois meses.

N° FF	LC (mm)	N° de eclosão
1	8.9	3
2	8.3	2
3	8.2	4
4	9.6	4
5	9.8	3
6	9.2	1
7	6.9	3
8	6.7	3
9	11.2	2
10	9.5	3
11	8.5	2
12	10.3	2
13	8.2	2
14	8.7	1
15	9.7	2

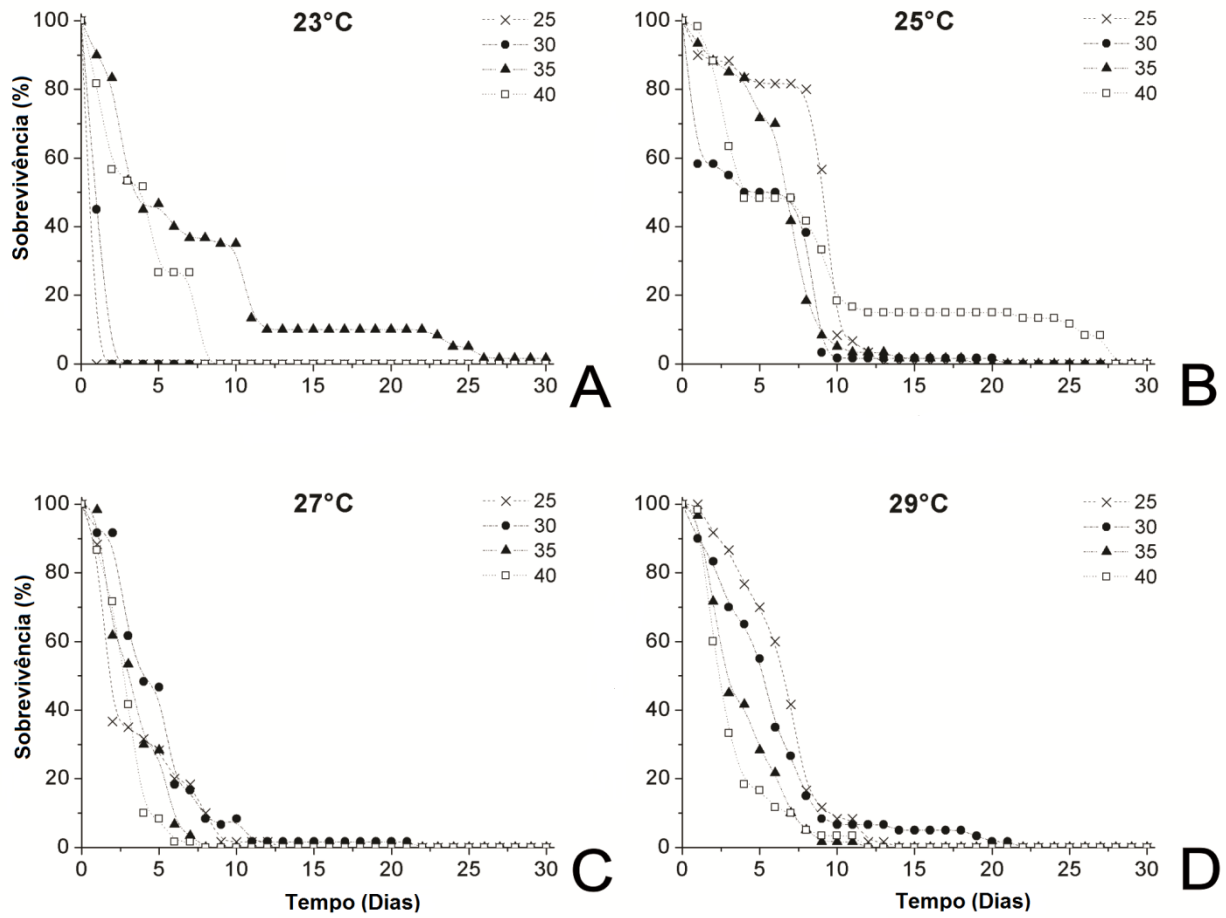


Figura 2. Porcentagem de sobrevivência das larvas de *Stenorhynchus seticornis*, desde a eclosão até o estágio de megalopa em diferentes salinidades: 25, 30, 35 e 40 e temperaturas: 23°C (A), 25°C (B), 27°C (C) e 29°C (D).

Tabela 3. Mínimo (Min), máximo (Max) e média (+SD) do tempo de desenvolvimento (em dias) entre os estágios larvais de *Stenorhynchus seticornis* criados em diferentes salinidades (25, 30, 35 e 40) e temperaturas (23°C, 25°C, 27°C e 29°C). Legendas: ZI, Zoea I; ZII, Zoea II; M, Megalopa; J, Juvenil.

Estágios	Salinidades	Temperatura 23°C			Temperatura 25°C			Temperatura 27°C			Temperatura 29°C		
		Tempo de desenvolvimento (em dias)											
		Min	Max	Média±SD	Min	Max	Média±SD	Min	Max	Média±SD	Min	Max	Média±SD
ZI - ZII	25	-	-	-	4	5	4.5±0.71	4	4	4.0±0.00	2	5	3.5±1.29
	30	-	-	-	4	4	4.0±0.00	3	5	4.0±1.00	2	4	3.0±1.00
	35	4	6	5.0±1.00	2	4	3.0±1.00	3	4	3.5±0.71	2	5	3.5±1.29
	40	5	6	5.5±0.71	3	5	4.0±1.00	3	4	3.5±0.71	3	5	4.0±1.41
ZII - M	25	-	-	-	6	6	6.0±0.00	4	4	4.0±0.00	5	6	5.5±0.71
	30	-	-	-	4	4	4.0±0.00	4	8	5.7±2.08	4	6	5.0±1.00
	35	6	7	6.5±0.71	5	6	5.5±0.71	3	4	3.5±0.71	5	6	5.5±0.71
	40	-	-	-	5	7	6.0±1.00	-	-	-	7	8	7.5±0.71
M - J	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35	13	14	13.5±0.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	13	13	13.0±0.00	-	-	-	-	-	-

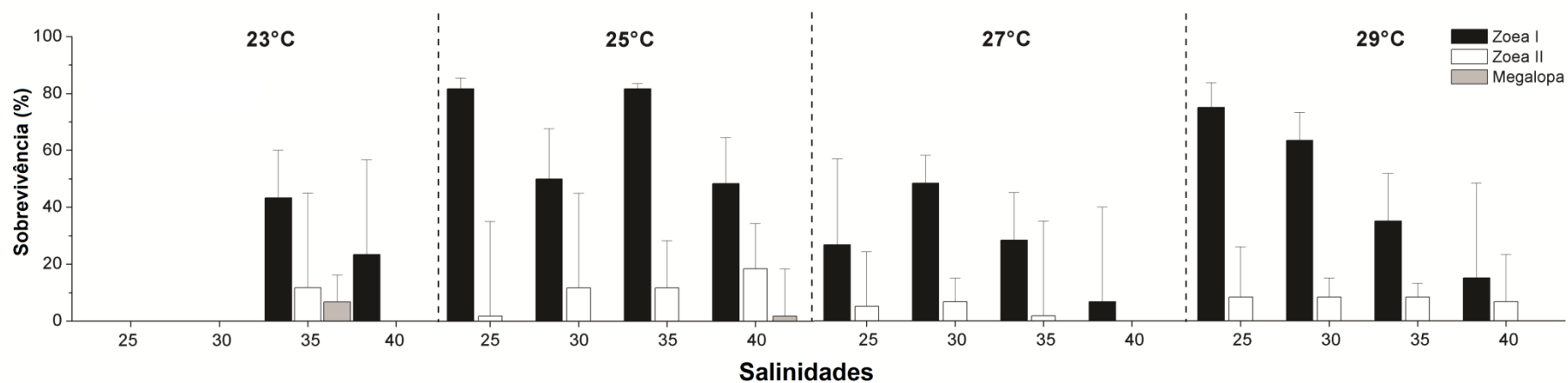


Figura 3. Porcentagem média (+SE) da sobrevivência dos estágios de zoea I, zoea II e megalopa de *Stenorhynchus seticornis* criados em diferentes tratamentos de salinidade (25, 30, 35 e 40) e temperatura (23°C, 25°C, 27°C e 29°C).

Discussão

O sistema de manutenção e criação descrito neste estudo baseou-se nas descrições disponíveis na literatura (Calado et al. 2007; Gregati et al. 2010). Adicionalmente, aprimorou-se o mesmo para preencher algumas lacunas ainda existentes, possibilitando sua utilização para diferentes espécies e finalidades, tanto na criação de larvas, quanto na manutenção de reprodutores.

A diferença do sistema aqui desenvolvido em relação aos demais é que as larvas podem ser transportadas para sistemas individuais, nos quais podem ser incorporados elementos importantes para o assentamento nos estágios finais, conforme sugerido por Calado et al. (2003). Para algumas espécies, como, ermitões e caranguejos braquiúros, a produção pode ser otimizada se as larvas obtidas no sistema recirculante forem movidas para outros sistemas individuais (Davis and Stoner, 1994; Forward et al., 2003). A possibilidade de incluir condições para o assentamento das larvas no estágio de megalopa, como substrato para os caranguejos e conchas de gastrópodes para ermitões, pode reduzir a duração dos últimos estágios larvais e promover maiores taxas de sobrevivência (O'Connor, 1991; Harvey, 1996).

Mas, caso não seja possível o cultivo em outros recipientes, as larvas podem ser mantidas no mesmo sistema, compartilhando a mesma água dos adultos, sem necessidade de manutenção ou troca de redes do recipiente de captura larval, como proposto em Calado et al. (2008). Além disso, a criação de larvas na mesma água onde são mantidos conspecíficos pode acelerar a metamorfose (Weber and Epifanio, 1996). Estudos já evidenciaram que megalopas de *Petrolisthes cinctipes* and *P. eriomerus* respondem positivamente à presença de adultos conspecíficos (Jensen, 1989); também, verificou-se que o tempo para metamorfose pode ser afetado em *Pagurus maclaughlinae* e *Paguristes tortugae*, quando colocados na mesma água que os adultos (Harvey, 1996).

O fato de todas as fêmeas ovígeras mantidas no sistema terem liberado alguns lotes de larvas viáveis num período de 2 meses, comprova a eficiência do sistema. Ainda, observou-se que há viabilidade de obtenção de larvas provenientes de desovas posteriores, sem interferência de cópula, o que reduz a necessidade de captura de outros indivíduos na natureza. As fêmeas de *S. seticornis* podem armazenar conteúdo espermático de mais de um macho no receptáculo seminal e fertilizar óvulos em

desovas consecutivas (Antunes et al. 2016), assim como em outros *Majoidea* (Diesel 1989; Sainte-Marie & Sainte-Marie 1998).

Estudos com *Mithraculus forceps* (A. Milne Edwards, 1875) demonstraram que, o uso de reprodutores em cativeiro contribui para o desenvolvimento da aquicultura sustentável, visto que, a média de sobrevivência e taxa de desenvolvimento das larvas da primeira e segunda desova, quando comparadas, não apresentaram diferença estatística, além de que, em ambos os casos, as larvas atingiram o estágio de juvenil (Penha-Lopes et al. 2006). Deste modo, o aprimoramento dos sistemas de criação para que possam ser utilizados para manutenção e cópula controlada, como o descrito neste estudo, é de suma importância no desenvolvimento de protocolos de cultivo, pois diminui a necessidade de captura dos casais na natureza. Além disso, previne-se o estresse ocasionado pela remoção dos casais para diferentes recipientes e o canibalismo entre adultos e larvas (Calado et al. 2007).

O controle e monitoramento da cópula, também são possíveis, visto que os indivíduos são mantidos isolados fisicamente, mas compartilhando a mesma água, favorecendo a dissipação de feromônios associados à urina, liberados pelas fêmeas, que muitas vezes, são combinados com estímulos visuais e táteis (Eales, 1974; Ryan, 1966; Gleenson, 1991). Os feromônios emitidos pelas fêmeas (presumivelmente a partir dos ovários) promovem a procura e o comportamento pré-copulatório de exibição e corte pelos machos (Hinsch, 1968; McCleese et al., 1977; Hooper, 1986; Cowan, 1991). Deste modo, a cópula poderá ocorrer no momento em que a barreira física for removida, possibilitando o monitoramento do acasalamento, sem a necessidade de filmagens constantes durante todo o dia.

A qualidade das larvas e a prevenção dos efeitos negativos da inanição podem ser obtidos administrando o alimento imediatamente após a eclosão (Calado et al., 2005a, b). O sistema aqui apresentado permite que os nauplius de *Artemia* sp. sejam adicionados aos recipientes de captura larval antes mesmo da liberação, aprimorando o sistema proposto por Calado et al. (2007).

O melhor tratamento de temperatura e salinidade para o cultivo de *S. seticornis* foi de 23° C e 35, no qual 6.6% das larvas alcançaram o estágio de juvenil. Apesar de a sobrevivência final ter sido baixa, ainda assim, foi superior aos resultados obtidos por Hernández et al. (2012), que não ultrapassaram 1%, mesmo considerando todos os tratamentos; e a maior média obtida foi de 4% na combinação de 25°C e 30. De acordo

com vários autores (Thorson, 1950; Morgan, 1995; Hernández et al., 2012), a sobrevivência não alcança 2% em condições não controladas. Além da sobrevivência diminuir exponencialmente com o tempo, mesmo quando as causas de mortalidade, tais como, a predação ou a probabilidade de encontrar condições ambientais adversas são, relativamente, constantes durante o tempo de vida de uma larva (Thorson, 1950; Morgan, 1995).

Os demais estudos que testaram a sobrevivência das larvas de *S. seticornis*, encerraram os experimentos quando as larvas atingiram o estágio de megalopa. Yang (1976) cultivando larvas de *S. seticornis* coletados em águas rasas (2 m) da Flórida, obteve 41% de sobrevivência em temperaturas de 17 a 29°C; enquanto Mendes and Valença (2008) com material da costa nordeste do Brasil, conseguiram 30% de sobrevivência após 15 dias de cultivo, em temperaturas de 27,5 e 29,2°C.

As diferenças encontradas em relação às melhores combinações de cultivo, nas diferentes localidades mencionadas anteriormente, podem ser atribuídas à plasticidade ambiental de suporte da espécie nas diferentes populações (São Paulo e Pernambuco, no Brasil; Isla Marguerita, na Venezuela; e Flórida). No litoral sudeste brasileiro, as condições ambientais de temperatura e salinidade registradas nas ilhas, onde os caranguejos foram coletados, são próximas às melhores combinações de fatores obtidos no presente estudo (ver: Cobo, 2002; Cobo, 2006).

Embora a temperatura seja um dos principais fatores ambientais que modulam o desenvolvimento e crescimento dos crustáceos (Anger 1983; Minagawa 1990; Mendes and Valença, 2008; González-Ortegón and Giménez 2014), em condições controladas, a nutrição e o assentamento parecem ser os fatores mais influentes em relação à sobrevivência das larvas de *S. seticornis*, principalmente, ao atingirem o estágio de megalopa (Zhang et al., 1997; Mendes and Valença, 2008; Hernández et al., 2012).

O conhecimento sobre a preferência alimentar nos estágios finais de desenvolvimento larval torna-se necessário, visto que, os adultos de *S. seticornis* são omnívoros, enquanto que, as zoeas são carnívoras (Williams, 1984). Talvez a mudança da dieta carnívora da zoea para uma dieta omnívora, típica dos adultos de *S. seticornis*, aconteça na fase de megalopa, e, portanto, exigiria uma dieta mista (animal e vegetal), não necessariamente de origem planctônica. Além disso, o custo metabólico em cada fase pode ser diferente e as megalopas talvez requeiram taxas mais elevadas de energia e / ou crescimento, bem como a preparação do organismo para metamorfose como

apresentado por outros decápodes (Barros and Valenti, 2003; Hernández et al., 2012). Segundo Yang (1976), a principal causa de mortalidade na fase de megalopa de *S. seticornis* em seu experimento, poderia estar relacionada à dificuldade do caranguejo em remover os longos pereiópodos do exoesqueleto velho, no momento da muda. Neste caso, tal hipótese deveria ser testada a partir de utilização de vários tipos de substratos, que ofereçam superfícies irregulares, as quais facilitariam o decapodito a se desfazer do exoesqueleto antigo. Os experimentos realizados por Gebauer et al. (1998) com *Neohelice granulata* (Dana, 1851), por exemplo, demonstraram que as megalopas podem adiar o momento da metamorfose, dependendo do tipo de substrato e do estímulo percebido no ambiente em que estão inseridas e que o assentamento está diretamente relacionado com o habitat preferido pelos adultos (Gebauer et al., 1998).

Durante o estágio de assentamento, os decápodos respondem a características químicas e físicas do ambiente, que provavelmente envolvem a integração de várias modalidades sensoriais (Montfrans et al., 2003). Além disso, a preferência por um habitat específico pode mudar diante da vulnerabilidade das espécies nesta fase do ciclo de vida, assim como nos períodos de recrutamento, incubação e pós-muda (Varisco et al., 2015). No entanto, as informações sobre os requisitos para o assentamento, disponíveis na literatura, referem-se à fase de recrutamento das espécies, principalmente (Rodríguez et al., 1993; Perkins-Visser et al., 1996; Moksnes, 2002).

Embora experimentos laboratoriais não reproduzam as condições naturais com exatidão, é possível avaliar como as larvas respondem às variações ambientais em cada estágio de desenvolvimento. Diante dos resultados encontrados neste estudo, fica claro que a interação dos fatores ambientais influencia diretamente a sobrevivência das larvas, e que a combinação de tais fatores, proporciona melhores condições para o desenvolvimento completo, viabilizando a oferta de juvenis para a comercialização de espécies ornamentais.

A obtenção constante de larvas viáveis, oriundas de desovas sucessivas, comprova a eficácia do sistema apresentado e viabiliza futuros ensaios em escala comercial para as espécies ornamentais. O conhecimento sobre as melhores condições de temperatura e salinidade são essenciais para o desenvolvimento das larvas em cativeiro, mas não são suficientes para o estabelecimento de protocolos de cultivo para o desenvolvimento completo dos caranguejos. Em estudos futuros, os esforços em relação a *S. seticornis* devem ser direcionados às condições de assentamento nas fases

de transição entre o estágio de megalopa e juvenil e na preferência alimentar do caranguejo nos estágios finais de desenvolvimento larval.

Referências

- Alves, D.F.R., Barros-Alves, S.P., Cobo, V.J., Lima, D.J.M., Fransozo, A., 2012. Checklist of the brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda) in the rocky subtidal of Vitória Archipelago, southeast coast of Brazil. *Check List*. 8, 940-950.
- Anger, K., 1983. Temperature and the larval development of *Hyas araneus* L. (Decapoda: Majidae); extrapolation of laboratory data to field conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 69, 203–215.
- Anger, K., 1991. Effects of temperature and salinity on the larval development of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72, 103-110.
- Anger, K. 2001. The biology of decapod crustacean larvae. *Crustacean Issues*, Vol. 14, A.A. Balkema, Lisse, The Netherlands, 419 pp.
- Anger, K. 2003. Salinity as a key parameter in the larval biology of decapod crustaceans. *Invertebr. Reprod. Dev.* 43. 29-45.
- Anger, K., Harms, J., Montú, M., de Bakker, C. 1990. Effects of salinity on the larval development of a semiterrestrial tropical crab, *Sesarma angustipes* (Decapoda: Grapsidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 62, 89-94.
- Antunes, M., Zara, F.J., López-Greco, L.S., Negreiros-Fransozo, M.L., 2016. Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea. *Invertebr. Biol.* 135, 75-86.
- Barría, E. M., Jara, C. G., Paschke, K. A., 2005. La temperatura como factor de variabilidad en el desarrollo y morfología de larvas zoeas de *Acanthocyclus hassleri* Rathbun (Decapoda, Brachyura, Atelecyclidae) cultivadas en laboratorio. *Investig Mar CICIMAR*. 33, 25-41.
- Barros, H. P., Valenti, W. C., 2003. Ingestion rates of *Artemia nauplii* for different larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquacult.* 217, 223–233.
- Borghetti, J. R., Ostrensky, A., 2000. A cadeia produtiva da aquicultura brasileira. pp. 73-106. In: Valenti, W. C., Poli, C. R., Pereira, J. A., Borghetti, J. R. (eds.) *Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília, CNPq/ Ministério de Ciência e Tecnologia.

- Calado, R., Lin, J., Rhyne, A.L., Araújo, R., Narciso, L., 2003. Marine ornamental decapods-popular, pricey, and poorly studied. *J. Crust. Biol.* 23, 963-973.
- Calado, R., Rosa, R., Nunes, M., Narciso, L., 2005a. Amino and fatty acid dynamics of *Lysmata seticaudata* (Decapoda: Hippolytidae) embryos during early and late reproductive season. *Mar. Biol.* 147, 341–351.
- Calado, R., Vitorino, A., Dionísio, G., Dinis MT., 2007. A recirculated maturation system for marine ornamental decapods. *Aquacult.* 263, 68–74.
- Calado, R., Pimentel, T., Vitorino, A., Dionísio, G., Dinis, M. T., 2008. Technical improvements of a rearing system for the culture of decapod crustacean larvae, with emphasis on marine ornamental species. *Aquacult.* 285, 264-269.
- Calado, R., Vitorino, A., Reis, A., Lopes da Silva, T., Dinis, M. T., 2009. Effect of different diets on larval production, quality and fatty acid profile of the marine ornamental shrimp *Lysmata amboinensis* (De Man, 1888), using wild larvae as a standard. *Aquac. Nutr.* 15, 484–491.
- Cobo, V. J., 2002. Breeding period of the spider crab *Mithraculus forceps* (A. Milne-Edwards) (Crustacea, Majidae, Mithracinae) in the southeastern Brazilian coast. *Revta. brasileira Zool.* 19, 229-234.
- Cobo, V. J., 2006. Population biology of spider crab, *Mithraculus forceps* (A. Milne-Edwards, 1875) (Majidae, Mithracinae). *Crustaceana.* 78, 1079–1087.
- Costlow, J. D., Bookhout, C. G., Monroe, R., 1960. The effect of salinity and temperature on larval development of *Sesarma cinereum* (Bosc) reared in the laboratory. *Biol. Bull.* 118, 183-202.
- Costlow, J. D., Bookhout, C. G., Monroe, R., 1962. Salinity-temperature effects on the larval development of the crab, *Panopeus herbstii* Milne-Edwards, reared in the laboratory. *Physiol. Zool.* 35: 79-93.
- Costlow, J. D., Bookhout, C.G., Monroe, R., 1966. Studies on the larval development of the crab, *Rhithropanopeus harrisi* (Gould). I. The effect of salinity and temperature on larval development. *Physiol. Zool.* 34, 81-100.
- Cowan, D. F., 1991. The role of olfaction in courtship behavior of the American lobster, *Homarus americanus*. *Biol. Bull.* 181, 402-407.
- Davis, M., Stoner, A.W., 1994. Trophic cues induce metamorphosis of queen conch larvae (*Strombus gigas* Linnaeus). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 180, 83–102.

- 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. *J. Crust. Biol.* 9, 266–277.
- Eales, A. J. 1974. Sex pheromone in the shore crab *Carcinus maenas* and the site of its release from females. *Mar. Behavior Physiology.* 2, 345–355.
- Fletcher, D. J., Kotter, I., Wunsch, M., Yasir, I., 1995. Preliminary observations on the reproductive biology of ornamental cleaner prawns. *Int. Zool. Yearbook.* 34, 73-77.
- Forward Jr., R.B., Tankersley, R.A., Welch, J.W., 2003. Selective tidal-stream transport of the blue crab *Callinectes sapidus*: an overview. *Bull. Mar. Sci.* 72, 347-365.
- Fransozo, A., Negreiros-Fransozo, M. L., 1986. Influência da salinidade no desenvolvimento larval de *Eriphia gonagra* (Fabricius, 1781) e *Sesarma (Holometopus) rectum* Randall, 1840 (Crustacea, Decapoda) em laboratório. *Rev. Bras. Biol.* 46, 439-446.
- Gebauer, R.L.E., Strain, B.R., Reynolds J.F., 2008. The effect of elevated CO₂ and N availability on tissue concentrations and whole plant pools of carbon-based secondary compounds in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Oecologia*, 113, 29–36.
- Gebauer, P., Paschke, K., Anger, K., 2010. Seasonal variation in the nutritional vulnerability of first-stage larval porcelain crab, *Petrolisthes laevigatus* (Anomura: Porcellanidae) in southern Chile. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 386, 103-112.
- Gleenson, R. A., 1991. Intrinsic factors mediating pheromone communication in the blue crab, *Callinectes sapidus*. Pages 17–32 in R. T. Bauer and J.W. Martin eds. *Crustacean sexual biology*. Columbia University Press, New York. 355 p.
- González-Ortegón, E., Giménez, L., 2014. Environmentally mediated phenotypic links and performance in larvae of a marine invertebrate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 502, 185–195.
- Gregati, R. A., Negreiros-Fransozo, M. L., López-Greco, L. S., Fransozo, V., 2010. Reproductive cycle and ovarian development of the marine ornamental shrimp *Stenopus hispidus* in captivity. *Aquacult.* 306, 185-190.
- Harvey, A.W., 1996. Delayed metamorphosis in Florida hermit crabs: multiple cues and constraints (Crustacea: Decapoda: Paguridae and Diogenidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141, 27–36.

- Hernández, J. E., Palazón-Fernández J. L., Hernández G., Bolãnos J., 2012. The effect of temperature and salinity on the larval development of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachidae) reared in the laboratory. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 92, 505–513.
- Hinsch, G. W., 1968. Reproductive behavior in the spider crab, *Libinia emarginata* (L.). Biol. Bull. 135, 273-278.
- Hooper, R. G., 1986. A spring breeding migration of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (O. Fabr.), into shallow water in Newfoundland. Crustaceana. 50, 257-264.
- Ismael, D., Anger, K., Moreira, G. S., 1997. Influence of temperature on larval survival, development, and respiration in *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda). Helgoländer Meeresunters. 51, 463-475.
- Jensen, G.C., 1989. Gregarious settlement by megalopae of the porcelain crabs *Petrolisthes cinctipes* (Randall) and *P. eriomerus* Stimpson. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 131, 223–231.
- Lárez, M. B., Palazón-Fernández, J. L., Bolaños, C. J., 2000. The effect of salinity and temperature on the larval development of *Mithrax caribbaeus* Rathbun, 1920 (Brachyura, Majidae) reared in the laboratory. J. Plankton Res. 22, 1855-1869.
- Lee, E. T., 1992. Statistical Methods for Survival Data Analysis. Ed. John Wiley & Sons.
- Li, H. Y., Hong, S. Y., 2007. The effect of temperature and salinity on survival and growth of *Crangon uritai* (Decapoda: Crangonidae) larvae reared in the laboratory. Mar. Ecol. Prog. Ser. 28, 288-295.
- Luppi, T. A., Bas, C. C., Spivak, E. D., 2003. The effect of temperature and salinity on larval development of *Armases rubripes* Rathbun, 1897 (Brachyura, Grapsoidea, Sesamidae), and the southern limit of its geographical distribution. Estuar. Coast. Shelf. Sci. 58, 575-585.
- McCleese, D. W., Spraggins, R. L., Bose, A. K., Praminik, B. N., 1977. Chemical and behavioral studies of the sex attractant of the lobster (*Homarus americanus*). Mar Behav Physiol. 4, 219-232.
- Mendes, G. N., Valença, A. R., 2008. Observações preliminares sobre o desenvolvimento larval do caranguejo aranha *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788) (Decapoda: Brachyura: Majidae) em laboratório. Bol. do Inst. de Pesca. 34, 325-329.

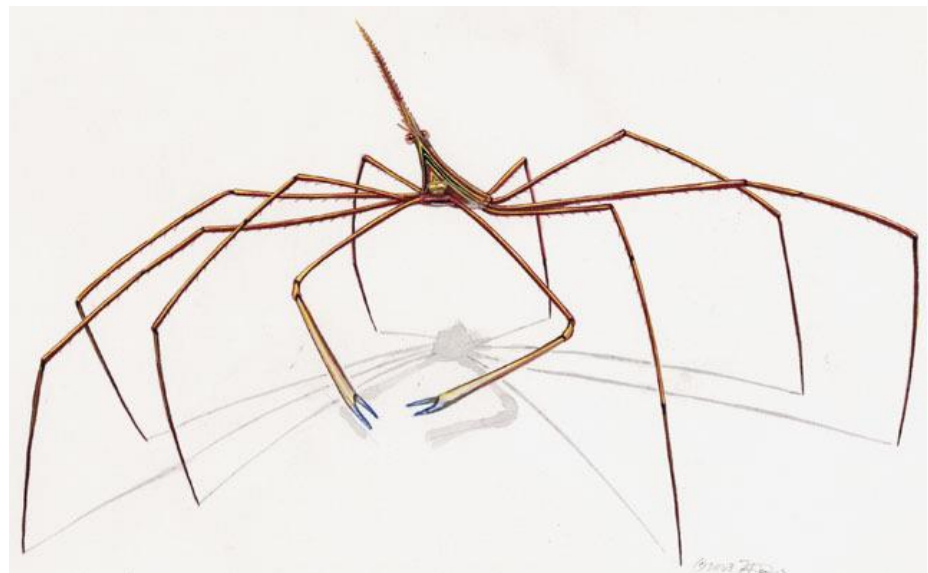
- Minagawa, M., 1990. Influence of temperature on survival, feeding and development of larvae of the red frog crab, *Ranina ranina* (Crustacea, Decapoda, Raninidae). *Nippon Suisan Gakkaishi*. 56:755–760.
- Moksnes, P., 2002. The relative importance of habitat-specific settlement, predation and juvenile dispersal for distribution and abundance of young juvenile shore crabs *Carcinus maenas* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 271, 41-73.
- Montfrans, J., Ryer, C. H., Orth, R. J., 2003. Substrate selection by blue crab *Callinectes sapidus* megalopae and first juvenile instar. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 260, 209-217.
- Morgan, S.G., 1995. Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation. In McEdward L. (ed.) *Ecology of marine invertebrate larvae*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 279–321.
- Negreiros-Fransozo, M. L., Fransozo, A., 1990. The effect of salinity on the post-embryonic development of *Panopeus americanus* Saussure, 1857 and *Eurypanopeus abbreviatus* (Stimpson, 1859) (Crustacea, Xanthidae). *Atlântica*. 12, 95-104.
- Nurdiani, R., Zeng, C., 2007. Effects of temperature and salinity on the survival and development of mud crab, *Scylla serrata* (Forsskål), larvae. *Aquac. Res.* 38, 1529-1538.
- O'Connor, N.J., 1991. Flexibility in timing of the metamorphic molt by fiddler crab megalopae *Uca pugilator*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 68, 243–247.
- Okamori, C.M., Cobo, V.J., 2003. Fecundity of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* in the southern Brazilian coast. *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.* 83: 979-980.
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G. J., Avella, M. A., Calado, R., 2011. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *J. World Aquacult. Soc.* 42: 135-166.
- Palmtag, M. R., Holt, G. J., 2001. Captive rearing of the shrimp *Lysmata debelius*. Texas Sea Grant College Program Research Report, pp. 1-4
- Palmtag, M. R., Holt, G. J., 2007. Experimental studies to evaluate larval survival of the fire shrimp, *Lysmata debelius*, to the juvenile stage. *J World Aquac Soc.* 38,102–113.
- Paula, J., Mendes, R. N., Mwaluma, J., Raedig, C., Emmerson, W., 2003. Combined effects of temperature and salinity on larval development of the mangrove crab

- Parasesarma catenata* Ortman, 1897 (Brachyura: Sesarmidae). J. Mar. Sci. 2, 57-63.
- Penha-Lopes, G., A. L. Rhyne, J. Lin, L. Narciso., 2005. The larval rearing of the marine ornamental crab, *Mithraculus forceps* (A. Milne Edwards, 1875) (Decapoda: Brachyura: Majidae). Aquac. Res. 36:1313–1321.
- Penha-Lopes, G., Rhyne, A.L., Lin, J., Narciso, L., 2006. Effects of temperature, stocking density and diet on the growth and survival of juvenile *Mithraculus forceps* (A. Milne Edwards) (Decapoda: Brachyura: Majidae). Aquacul. Res. 37, 398-408.
- Perkins-Visser, E., Wolcott, T., Wolcott, D., 1996. Nursery role of seagrass beds: enhanced growth of juvenile blue crabs (*Callinectes sapidus*) Rathbun. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 198, 155-173.
- Pinheiro, M. A. A., Fransozo, A., Negreiros-Fransozo, M. L., 1994. Estimativa da duração larval em função da temperatura para a família Majidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura). Bol. Inst. Pesca. 21, 75-81.
- Rodríguez, S., Ojeda, F., Inestrosa, C., 1993. Settlement of marine benthic invertebrates. Mar. Ecol. Prog. Ser. 97, 193-207.
- Ryan, E. P. 1966. Pheromone: Evidence in a decapod crustacean. Science 151: 340–341.
- Sainte-Marie, G., Sainte-Marie, B., 1998. Morphology of the spermatheca, oviduct, intermediate chamber, and vagina of the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). Can. J. Zool. 76, 1589–1604.
- Simith, D. J. B., Diele, K., 2008. O efeito da salinidade no desenvolvimento larval do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Ocypodidae) no Norte do Brasil. Acta. Amazonica. 38, 345-350.
- Sokal, R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research, 3rd edition. WH Freeman and Company, New York.
- Sulkin, S. D., Mojica, E., McKeen, G. L., 1996. Elevated summer temperature effects on megalopal and early juvenile development in the Dungeness crab, *Cancer magister*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 2076-2079.
- Thorson, G., 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. Biological Reviews. 25, 1–45.

- Varisco, M., Martín, L., Zaixso H., Velasquez, C., Vinuesa, J., 2015. Food and habitat choice in the spider crab *Leucippa pentagona* (Majoidea: Epialtidae) in Bahía Bustamante, Patagonia, Argentina. *Sci. Mar.* 79, 107–116.
- Vinuesa, J. H., Ferrari, L., Lombardo, R. J., 1985. Effect of temperature and salinity on larval development of southern king crab (*Lithodes antarcticus*). *Mar. Biol. Res.* 85, 83-87.
- Weber, J.C., Epifanio, C.E., 1996. Response of mud crab (*Panopeus herbstii*) megalopae to cues from adult habitat. *Mar. Biol.* 126, 655–661.
- Williams, A. 1984. Shrimps, lobsters and crabs of the Atlantic coast of the eastern United States, Maine to Florida. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.
- Yang, W., 1976. Studies on the western Atlantic arrow crab genus *Stenorhynchus* (Decapoda: Brachyura: Majidae). I. Larval characters of two species and comparison with other larvae of Inachinae. *Crustaceana.* 31, 157–177.
- Zar, J.H. 2010. Biostatistical analysis. 5th edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall.
- Zhang, D., Lin, J., Creswel, R. L., 1997. Larviculture and effect of food on larval survival and development in golden coral shrimp *Stenopus scutellatus*. *J. Shellfish. Res.* 16, 367-369.

CONSIDERAÇÕES

FINAIS



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando-se em conta que os crustáceos decápodos marinhos possuem papéis insubstituíveis em diversos ecossistemas, como por exemplo, nos recifes de coral, e ainda assim, estão sujeitos à exploração excessiva ou até mesmo à extinção, o cultivo torna-se uma boa alternativa para satisfazer a demanda por estas espécies.

Os resultados inéditos, aqui apresentados, apontam que *S. seticornis* pode ser um bom modelo para estudos de competição espermática. Analisando-se o receptáculo seminal de fêmeas recém-copuladas, verificou-se que o arranjo dos pacotes espermáticos observados nas fêmeas pode ser resultado de estratificação espermática, formada pelas secreções produzidas pela glândula acessória do vaso deferente dos machos. Além disso, o papel dos gonopódios dos machos nos mecanismos de competição espermática deve ser analisado, com maior detalhe, em outros estudos.

Entre as características que favoreceram a realização do presente estudo, podemos citar: a facilidade com que *S. seticornis* acasalou em condições laboratoriais, independente da estação do ano, com todos os indivíduos em período de intermuda; a capacidade do macho em copular mais de uma fêmea e com fêmeas diferentes; as fêmeas ovígeras, oriundas de ambiente natural, exteriorizarem até quatro desovas sem interferência de cópula; além da obtenção constante de larvas viáveis. Estas características constatadas aqui podem contribuir na ampliação dos esforços para o desenvolvimento do cultivo de *S. seticornis*, em cativeiro.

No entanto, algumas questões necessitam, ainda, de ensaios mais aprofundados para serem esclarecidas, tais como: a poliandria e promiscuidade das fêmeas; o padrão de comportamento agonístico exibido pelos machos; a capacidade de cópula de machos,

que ainda não sofreram a muda da puberdade; e a razão do canibalismo exibido em alguns eventos de cópula.

O conhecimento sobre todos esses parâmetros reprodutivos de espécies exploradas é essencial para o desenvolvimento de planos de manejo, seja em ambiente natural ou cativeiro. Neste contexto, os resultados obtidos nesta tese conferem melhor compreensão sobre a estratégia reprodutiva de *S. seticornis*, inclusive do ponto de vista taxonômico, tendo em vista, controvérsias sobre sua posição devido a certas características larvais distintas quando comparadas com outras espécies da mesma subfamília. Ainda, as informações resultantes deste estudo proverão subsídios para o cultivo em escala comercial, contribuindo na redução do impacto sobre a diversidade nativa, seja pelo fornecimento de espécimes produzidos para o mercado da aquariorfilia ou sua utilização como fonte para projetos de reintrodução da espécie, em locais no qual possa ocorrer declínio da população, devido à ocorrência de impacto de origem antrópica (resíduos urbanos e/ou industriais).