



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências do Litoral Paulista**



**Espermiotaxonomia e análise comparativa do sistema reprodutor
de caranguejos aranha (Mithracidae)**

Camila de Oliveira Assugeni

São Vicente - SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências do Litoral Paulista



Espermiotaxonomia e análise comparativa do sistema reprodutor
de caranguejos aranha (Mithracidae)

CAMILA DE OLIVEIRA ASSUGENI

FERNANDO JOSÉ ZARA

Dissertação apresentada ao Campus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Aquática.

São Vicente - SP

2017

Assugeni, Camila de Oliveira
A851e Espermiotaxonomia e análise comparativa do sistema reprodutor
de caranguejos aranha (Mithracidae) / Camila de Oliveira Assugeni. –
– São Vicente, 2017
xii, 99 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Biociências, Campus Litoral Paulista, 2017
Orientador: Fernando José Zara
Banca examinadora: Natália Rossi, Thiago Maia Davanso
Bibliografia

1. Mithracidae. 2. Histologia. 3. Espermiotaxonomia. I. Título. II.
São Vicente-Instituto de Biociências-Campus Litoral Paulista.

CDU 591.16:595.384.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

AGRADECIMENTOS

Á Deus por tudo, por todas as oportunidades, por ter me dado forças para alcançar meus objetivos e por sempre me proteger...

Aos meus pais Eliana e Edilson por terem me possibilitado de realizar sonhos os quais vocês não tiveram a oportunidade de realizar na época de vocês e que agora se tornaram nossos sonhos! Obrigado por me ensinar respeitar as pessoas, os animais, ter me ensinado a amar, por sempre estar ao meu lado e não me deixar desistir nos momentos de fraqueza. Obrigada por todo apoio afetivo e financeiro. Amo vocês!

A minha irmã Leticia por ser minha melhor amiga, aguentar meus desesperos, grosserias e por estar me acompanhando em todos os momentos nessa jornada.

Aos meus avós Nilton, Dolores, Jair e Cida por estarem sempre cuidando de mim, rezando por mim, me recebendo com coisas maravilhosas nos finais de semana e por sempre torcerem por minha vitória.

As minhas tias, tios e primos que sempre estão ao meu lado torcendo por mim.

A Maria Eduarda Tozato por ser minha segunda família durante esses anos, compartilhar medos, angustias, alegrias, aguentar meu stress e torcer por mim.

As meninas da Rep. Arapuca (São Vicente) que me receberam com tanto carinho, me acolhendo como um membro da família e que me ensinaram ver o mundo de uma maneira diferente, por estarem ao meu lado em um dos momentos mais difíceis da minha vida. Vocês fazem parte da minha vida, sempre vou me lembrar de cada uma de vocês... Tamara, Priscila, Carol, Camila.

Ao meu orientador Fernando J. Zara pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, por toda paciência, por sempre ensinar novas coisas sobre crustáceos, por me fazer pensar sobre tudo que aprendo de diferentes maneiras, por me ajudar a amadurecer como futura pesquisadora, por me incentivar na superação de limites e acima de tudo pela amizade.

Ao IML (Laboratório de morfologia de Invertebrados): Fernanda, Maria Alice, Guilherme, Lucas, Léo, Timotéo e Marcia. Aos que passaram pelo IML, Tavani e Jean, vocês foram muito importante nesta caminhada e fazem muita falta! Marcia obrigada por todo acolhimento, pelos ensinamentos, pela paciência, por cuidar de mim, por me ouvir

e por todo apoio técnico, sem você eu não teria chegado até aqui. Maria e Fernanda obrigada pela companhia, pelos ensinamentos compartilhados, por crescerem comigo, por me ouvir, pelos perrengues que passamos juntas, por ficarem bravas junto comigo e por todas as vezes que já aprontamos e rimos muito. Vocês fizeram toda diferença nesta caminhada.

A minha orientadora de iniciação científica, Kátia Hiroki por ter me apresentado o mundo dos crustáceos, por sempre acreditar em mim, pelas inúmeras oportunidades e principalmente pela amizade e preocupação que sempre teve comigo.

A Tati Magalhães, companheira de pesquisa, sempre gentil, alegre e presente. Obrigada pelos ensinamentos durante o estágio no Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC), pela dedicação em nosso trabalho e por sua amizade.

Ao Fernando L. Mantelatto pelas oportunidades durante o estágio no Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC), pelos ensinamentos e todo suporte.

A professora Laura López – Greco pelos claros ensinamentos, cumplicidade e amizade durante a disciplina no Brasil.

Ao Professor Christopher Tudge por sua simpatia, pela paciência ao conversar em inglês comigo, pelos ensinamentos e pela colaboração em meu trabalho que foram imprescindíveis.

Aos amigos Isa, Chuck, Dino, Zara por estar comigo em meu primeiro mergulho na Laje de Santos que foi maravilhoso e inesquecível, obrigada pela parceria.

Ao William Santana e Raquel Buranelli pelas sugestões durante a banca de qualificação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento de minha bolsa de mestrado através do projeto Ciências do Mar II (#1989/2014 - 23038.004309/2014-51).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo Projeto Universal que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Biota Fapesp (#2010/50188-8) pelo apoio financeiro para materiais, aparelhos, reagentes, coletas e tudo mais.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP/FCAV e aos técnicos por todo suporte, infraestrutura, ajuda e atenção.

Por fim, a UNESP por todo espaço físico e material.

**“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve...
E a vida é muito para ser insignificante”.**

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
CAPÍTULO 1.....	7
DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA CAP. 1.....	28
CAPÍTULO 2.....	52
DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA CAP. 2.....	67
CAPÍTULO 3.....	72
DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA CAP. 3.....	86
CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS.....	94

Resumo

Os caranguejos aranha pertencentes à superfamília Majoidea possuem grande diversidade de cor, morfologia corpórea e de habitat. A família Mithracidae recentemente foi revisada com base em dados morfológicos e moleculares, sendo assim novos gêneros foram propostos e algumas espécies redistribuídas. O objetivo deste estudo foi descrever a biologia reprodutiva de alguns membros de Mithracidae por meio da ultraestrutura dos espermatozoides e espermatóforos utilizando a microscopia eletrônica de transmissão e varredura, a fim de corroborar hipóteses baseadas em DNA e morfologia existentes para Mithracidae. Assim, os resultados encontrados na espermiotaxonomia mostram que esta é uma ferramenta eficiente para o estabelecimento de relações filogenéticas uma vez que, a morfologia dos espermatozoides, com base no padrão encontrado em Brachyura, permitiu a divisão das espécies entre os gêneros e, desta maneira, corroborou a filogenia molecular mais recente para a família. A histologia do sistema reprodutor masculino e dos receptáculos seminais (RS) de algumas espécies dos gêneros *Mithrax*, *Mithraculus*, *Damithrax* e *Omalacantha* foi realizada para verificar mecanismos de transferência espermática. A histologia dos receptáculos seminais mostrou que as fêmeas não são formadoras de pacotes espermáticos, já que todo material genético encontra-se misturado no interior do RS, sendo assim impossível identificar se a fêmea copula com mais de um macho. Caso isto ocorra, o esperma é utilizado de maneira aleatória durante o processo de fertilização, quando o órgão de estocagem torna-se uma ampla câmara de fertilização. As secreções produzidas pelo epitélio dorsal do receptáculo seminal são reativas para proteínas e polissacarídeos neutros, entretanto, ao redor das massas espermáticas foi encontrada uma secreção reativa para polissacarídeos ácidos. Assim, propõe-se que a secreção ao redor dos espermatozoides no RS com reação positiva para polissacarídeos ácidos é proveniente do fluido seminal dos machos com provável função antibacteriana. A histologia do sistema reprodutor masculino mostrou uma morfologia simplificada com ausência de glândulas acessórias. Sendo assim, em espécies com esta característica pode-se prever que este padrão reflita na ausência de pacotes espermáticos ao menos em Majoidea.

Abstract

Spider crabs belonging to the superfamily Majoidea possess great diversity of color, body morphology and habitat. The family Mithracidae has recently been revised based on morphological and molecular data, thus new genera have been proposed and some species redistributed. The objective of this study was to describe the reproductive biology of some members of Mithracidae by means of the ultrastructure of spermatozoa and spermatophores using transmission and scanning electron microscopy in order to corroborate the hypotheses based on DNA and morphology existing for Mithracidae. Thus, the results found in spermiotaxonomy show that this is an efficient tool for the establishment of phylogenetic relationships based on the morphology of the spermatozoa, following the pattern found in Brachyura, allowed the division of the species between the genera and, in this way, corroborated the most recent molecular phylogeny for the family. The histology of the male reproductive system and the seminal receptacles (RS) of some species of the genera *Mithrax*, *Mithraculus*, *Damithrax* and *Omalacantha* were performed to verify mechanisms of sperm transfer. The histology of the seminal receptacles showed that females are not spermpacket forming, since all genetic material is mixed within the RS, thus it is impossible to identify if the female copulates with more than one male. If this occurs, the sperm is used at random during the fertilization process, when the storage organ becomes a large fertilization chamber. The secretions produced by the dorsal epithelium of the seminal receptacle are reactive for proteins and neutral polysaccharides, however, around the sperm masses a reactive secretion was found for acidic polysaccharides. Thus, it is proposed that the secretion around the spermatozoa in RS with positive reaction for acid polysaccharides comes from the seminal fluid of males with probable antibacterial function. The histology of the male reproductive system showed a simplified morphology with absence of accessory glands. Thus, in species with this characteristic it can be foreseen that this pattern reflects in the absence of spermatic packages at least in Majoidea.

Introdução

Os caranguejos aranha pertencentes à superfamília Majoidea Samouelle, 1819, ocorrem em diferentes sistemas marinhos e de transição, representando assim parcela significativa dos braquiúros (Hendrickx, 1999). Estes caranguejos estão classificados em cinco famílias, sendo Mithracidae MacLeay, 1838 bastante estudada devido à morfologia e ornamentação dos seus representantes, os quais são de interesse na crescente aquarioria marinha (Baeza *et al.*, 2010). Os membros desta família são encontrados em habitats tropicais e subtropicais, recifes de coral, substratos de entulho e partículas grossas, em profundidades que variam do intertidal até 450 m (Melo, 1996; Baeza *et al.*, 2010; Windsor & Felder, 2014). Os Mithracidae são caracterizados por conter uma carapaça mais larga do que longa em formato oval, três ou quatro espinhos nas margens antero-lateral ou na órbita frontal (Rathbun, 1925). O gênero *Mithrax* foi apresentado em 1825 por Desmarest e, posteriormente separado em dois subgêneros *Mithrax* e *Mithraculus* (White, 1847). Wagner (1990) propôs que ambos sejam categorizados como gêneros separados baseando-se exclusivamente na morfologia adulta, o que foi mantido na última revisão mundial de Brachyura (Ng *et al.*, 2008). Em contraposição, alguns estudos baseados em semelhanças da morfologia larval colocam em discussão a separação de *Mithrax* e *Mithraculus* (Bolaños & Scelzo, 1981; Fransozo & Hebling, 1982; Bolaños *et al.*, 1990, 2000; Pohle & Marques, 2000; Santana *et al.*, 2003; Rhyne *et al.*, 2004). Além disso, Baeza *et al.* (2010) não encontrou suporte para a separação de algumas espécies entre os gêneros *Mithrax* e *Mithraculus* por meio de análises moleculares.

Uma última revisão taxonômica foi proposta para a família Mithracidae pelos autores Windsor & Felder (2014). Estes autores realizaram um estudo filogenético, baseado em características morfológicas e moleculares, sendo o mais completo até o momento. Os autores utilizaram para o estudo dois genes nucleares (18S, H3) e três mitocondriais (12S, 16S, COI), propondo o desdobramento do gênero *Mithrax*. Desta maneira, criou-se um novo gênero, *Damithrax*, no qual figuram as espécies *Damithrax tortugae* (Rathbun, 1920) e *Damithrax hispidus* (Herbst, 1790), ambos com ocorrência na costa brasileira. O gênero *Omalacantha* foi revalidado e separado de *Microphrys*, onde se figura a espécie *Omalacantha bicornuta* (Latreille, 1825) (Atlântico). A validade do gênero *Mithraculus* se manteve, no qual a espécie *Mithraculus ruber* Stimpson, 1871 estava inserida e foi relocada então para o gênero *Teleophrys*, como

Teleophrys ruber (Stimpson, 1871) (Windsor & Felder, 2014). Estes mesmos autores elevaram Mithracinae ao status de família como previamente sugerido por Garth (1958).

De maneira geral, o sistema reprodutor masculino é visto como um órgão bilateral em forma de letra “H”, constituído pelo par de testículos, localizado em ambas às margens superiores do cefalotórax, os quais são contínuos aos vasa deferentia, estendendo-se longitudinalmente sobre o hepatopâncreas, abaixo do coração, terminando na região posterior do corpo (Krol *et al.*, 1992). Este é o padrão descrito para Brachyura (Krol *et al.*, 1992).

O testículo pode ser classificado como lobular ou tubular, segundo a proposta de Nagao & Munehara (2003). O tipo lobular exhibe vários lóbulos, cistos ou ácinos seminíferos, conectados por um ducto seminífero central, sendo o padrão mais comumente encontrado em Brachyura (Hinsch & Walker, 1974; Johnson, 1980; Batoy *et al.*, 1989; Diesel, 1989; Moriyasu & Benhalima, 1998; Nagao & Munehara, 2003; Castilho *et al.*, 2008; Erkan *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Simeó *et al.*, 2009). Por sua vez, o tipo tubular é constituído por um túbulo único e convoluto, preenchido em seu interior por células germinativas em diferentes estágios de maturação, como observado em *Maja brachydactyla* Balss, 1922 em Simeó *et al.*, (2009). Em geral, a região periférica do túbulo seminífero é constituída por espermatogônias, nas quais formam os centros germinativos. Os espermatócitos e espermátides ocupam amplo espaço da região intermédia dos túbulos seminíferos, formando a zona de maturação (Nagao & Munehara, 2003). A zona de evacuação é formada pelo túbulo coletor, as quais armazenam e carregam espermatozoides maduros através dos ductos seminíferos em direção ao vaso deferente (Nagao & Munehara, 2003; Simeó *et al.*, 2009). Desta maneira, o testículo tubular é atribuído principalmente aos Majoidea, Xanthoidea e Grapsoidea (Simeó *et al.*, 2009).

O vaso deferente é comumente dividido em três regiões: anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD) (Krol *et al.*, 1992). A AVD tem a função de produzir as secreções que levarão a formação dos espermatóforos (Castilho *et al.*, 2008; Nicolau *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2009; Simeó *et al.*, 2009; Zara *et al.*, 2012; Klaus *et al.*, 2013; Nascimento & Zara, 2013). Por sua vez, a MVD e PVD são responsáveis por armazenar os espermatóforos e produzir a maior parte do fluido seminal (Krol *et al.*, 1992; Simeó *et al.*, 2009; Zara *et al.*, 2012). Em algumas espécies, a MVD e PVD podem exhibir projeções laterais, denominadas bolsas laterais, nos Portunidae (Johnson, 1980; Jivoff *et*

al., 2007; Zara *et al.*, 2012), glândulas acessórias, expansões laterais, divertículos ou cecos em Majoidea e Grapsoidea (Simeó *et al.*, 2009; Tiseo *et al.*, 2014). Tais estruturas produzem secreções que são adicionadas ao fluido seminal, simplesmente para aumentar o volume de fluido produzido, como ocorre nos siris azuis (Zara *et al.*, 2012; Nascimento & Zara, 2013). O fluido seminal pode auxiliar na manutenção e transferência dos espermátóforos, ou formar o “plug” espermático durante a cópula (Hartnoll, 1968, Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998; Guinot & Quenette, 2005; Wolcott *et al.*, 2005; Jivoff *et al.*, 2007; Simeó *et al.*, 2009; Zara *et al.*, 2012; Guinot *et al.*, 2013; Tiseo *et al.*, 2014; Nascimento & Zara, 2013).

Os espermatozoides em Brachyura são células imóveis e aflageladas, com acrossomo ou vesícula acrossomal, camadas concêntricas, revestido por uma membrana moderadamente eletrondensa, sendo centralmente penetrado pelo *perforatorium* ou tubo perfurador (Tudge, 2009). Sobre o ápice do *perforatorium* observa-se o opérculo eletrondenso, o qual pode ser perfurado ou contínuo, sendo algumas vezes adornado (Jamieson, 1994; Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009). O núcleo demonstra cromatina condensada e braços radiais que podem formar projeções, além de conter elementos de citoesqueleto, como microtúbulos (para revisão ver, Jamieson, 1994; Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009, Tudge *et al.*, 2014). Algumas características têm sido descritas como sinapomorfias em Eubrachyura, como a presença de anel espessado, opérculo perfurado, presença de braços radiais e processo mediano posterior que são características típicas de Majoidea (Tudge *et al.*, 2014). A ultraestrutura dos espermátóforos e espermatozoides tem sido utilizada como ferramenta para relacionar grupos taxonômicos e estabelecer relações de parentesco (Jamieson, 1994; Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009). Recentemente, diferentes trabalhos vêm correlacionando os dados da ultraestrutura dos espermatozoides com a filogenia molecular, buscando encontrar padrões mais robustos para estudos filogenéticos e evolução dos caracteres espermáticos (Klaus & Brandis, 2010, Tudge *et al.*, 2014, Camargo *et al.*, 2015).

Os Podotremata Guinot, 1977, agrupa espécies em que as fêmeas mostram duas aberturas: uma do oviduto, por onde os ovócitos são externalizados, localizada na coxa do terceiro pereópodo e a vulva, cujo canal estende-se até a espermateca, a qual abre-se em diferentes esternitos, dependendo das famílias e subfamílias (Guinot & Tavares, 2001; Guinot & Quenette, 2005; Guinot *et al.*, 2013). Enquanto, as Fêmeas de Eubrachyura possuem um par receptáculos seminais que são ligados ao oviduto e a vagina (McLay & López-Greco, 2011). O receptáculo seminal é de origem ecto-

mesodérmica e armazena os espermatóforos após a cópula (Hartnoll, 1968; McLay & López-Greco, 2011). A região dorsal de origem mesodérmica está ligada ao ovário através do oviduto, enquanto a região ventral é ectodérmica, recoberta por cutícula, contínua à vagina que se abre na abertura genital ou vulva (Hartnoll, 1968; McLay & López-Greco, 2011; Zara, *et al.*, 2014). Diesel (1991) classificou o receptáculo seminal em dois tipos: dorsal e ventral. No tipo dorsal a abertura do oviduto encontra-se numa posição relativamente dorsal, sobre o receptáculo seminal, estando assim à vagina oposta ventralmente ao oviduto. No tipo ventral o oviduto e a vagina encontram-se próximos e posicionados ventralmente. Recentemente, um tipo intermediário foi proposto, demonstrando que a abertura do oviduto no receptáculo seminal encontra-se entre os extremos dorso-ventral (McLay & López-Greco, 2011; Gonzáles-Pisani *et al.*, 2012; Guinot *et al.*, 2013).

No presente estudo foi realizado a ultraestrutura do espermatóforo e espermatozoide de diferentes espécies do gênero *Mithraculus*, *Damithrax*, *Mithrax*, *Omalacantha* e *Teleophrys* provenientes do mar do Caribe e da costa do estado de São Paulo, a fim de corroborar ou não as filogenias moleculares proposta por Baeza *et al.* (2010) e Windsor & Felder (2014). Foram observadas características similares e distintas dos espermatóforos e espermatozoides de cada espécie considerando o padrão encontrado em Brachyura. Adicionalmente, foi analisado se os espermatozoides apresentam características exclusivas para cada gênero. Dentro deste objetivo, também foi comparado a ultraestrutura dos espermatozoides de animais da mesma espécie, provenientes de regiões zoogeográficas distintas (Venezuela e Brasil). Adicionalmente, foi realizada por meio da histologia e histoquímica a descrição comparativa das espécies *Mithraculus forceps*, *Damithrax hispidus*, *Mithrax aculeatus* e *Omalacantha bicornuta* no tocante à espermatogênese, produção de fluido seminal e receptáculo seminal, em busca de compreender os mecanismos de transferência espermática e ocorrência ou não de competição espermática, sendo um estudo pioneiro para estes Mithracidae.

Capítulo I

**Ultrastructure of spermatozoa of spider crabs, family Mithracidae (MacLeay,
1838): Integrative analyses based on morphological and molecular data
(Crustacea: Decapoda: Brachyura)**

Camila de Oliveira Assugeni, Tatiana Magalhães, Juan A. Bolãnos, Christopher C.
Tudge, Fernando L. Mantelatto, Fernando J. Zara

Este manuscrito se encontra nas normas da revista *Journal of Morphology*, a qual será
submetido.

Ultrastructure of spermatozoa of spider crabs, family Mithracidae (MacLeay, 1838): Integrative analyses based on morphological and molecular data (Crustacea: Decapoda: Brachyura)

Assugeni, C.^{1,*}; Magalhães, T.²; Bolãnos, J.A.^{3Ψ}; Tudge, C.C.⁴; Mantelatto, F.L.²; Zara, F.J.¹

¹Departamento de Biologia Aplicada, Laboratório de Morfologia do Invertebrados (IML), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Prof. Donato Castellane, S/N, Jaboticabal, 14884-900, SP, Brazil;

²Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC), Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14040-901, SP, Brazil;

^{3Ψ} (*In Memoriam*) Grupo de Investigación em Carcinología (Gicudone), Escola de Ciências Aplicadas do Mar, Núcleo Nueva Esparta, Universidad de Oriente, Isla Margarita, Venezuela;

⁴Biology Department, American University, 4400 Massachusetts Ave, NW, Washington, D.C. 20016-8007, USA.

Abstract

Recent studies based on morphological and molecular data provide a new perspective concerning taxonomic aspects of the brachyuran family Mithracidae. These studies proposed a series of nominal changes and indicated that the family is actually represented by a different number and representatives of genera than previously thought. Here we provide, for the first time, a comparative description of the ultrastructure of spermatozoa and spermatophores of some Mithracidae species in a phylogenetic context, and this data is useful to a revision and establishment of taxonomic groups within this family. As a framework, we used a topology obtained by a phylogenetic analysis using molecular data. Our results indicate that closely related species share a series of morphological characteristics of the spermatozoa. A thick operculum, for example, is a feature shared by species of the genera *Mithrax*, *Teleophrys* and *Omalacantha* in contrast to the slender operculum observed in *Mithraculus* and *Damithrax*. *Mithrax* and *Teleophrys* also have a rhomboid perforatorial chamber, while *Mithraculus*, *Damithrax* and *Omalacantha* show a wider, deltoid morphology. Furthermore, our results are in agreement with recently proposed taxonomic changes, such as the separation of the genera *Mithrax* and *Mithraculus*, the

separation of species of *Damithrax* from the genus *Mithrax*, and the synonymy of *Mithrax caribbaeus* with *Damithrax hispidus*. Overall, the spermiotaxonomy of these species of Mithracidae represent a novel set of data that corroborates the most recent taxonomic revision of the family and can be used in future taxonomic and phylogenetic studies.

Keywords: Sperm, Majoidea, Phylogeny, Mitochondrial genes, Spermatophore.

Introduction

The brachyuran family Mithracidae belongs to the superfamily Majoidea Samouelle, 1819, which includes the animals usually referred as spider crabs. These are found mostly in tropical and subtropical habitats, on coral reefs, debris substrates, and in coarse particled sediment, from the intertidal to depths of 450m (Melo, 1996; Baeza et al., 2009). According to Windsor & Felder (2014), Mithracidae encompasses a total of 36 species divided into 13 genera. Among these genera within the family, the following represent the focus of the present study: *Mithrax* Latreille, 1816, *Mithraculus* White, 1847, *Microphrys* H. Milne Edwards, 1851, *Teleophrys* Stimpson, 1860, *Omalacantha* Streets, 1871 and *Damithrax* Windsor & Felder, 2014.

Windsor & Felder (2014) conducted a phylogenetic study of the family Mithracidae *sensu* Windsor & Felder (2014) (this definition of Mithracidae will be used though all text). Their results were largely discordant from the previous studies, and the authors proposed substantial changes to the taxonomy of the family Mithracidae. They erected a new genus, *Damithrax* which includes four species, and among these some that were previously in the genus *Mithrax*, *Damithrax tortugae* (Rathbun, 1920), *Damithrax hispidus* (Herbst, 1790), *Damithrax pleuracanthus* (Stimpson, 1871), and *Damithrax spinosissimus* (Lamarck, 1818). Also, they indicated that *Omalacantha* is a valid genus, and that it includes *Omalacantha bicornuta*, previously assigned as *Microphrys bicornutus* (Latreille, 1825). Finally, the genus *Mithraculus* was considered as valid but it does not include *Mithraculus ruber* Stimpson, 1871, which was proposed as *Teleophrys ruber*.

The genus *Mithrax* was first divided into two sub-genera, *Mithrax* and *Mithraculus*, by White (1847), and later also supported by Wagner (1990), although both studies dealt solely with morphological aspects of adult individuals. Later, works based on larval morphology contested the validity of *Mithrax* and *Mithraculus* as two different genera (Bolaños & Scelzo, 1981; Fransozo & Hebling, 1982; Bolaños et al., 1990, 2000; Pohle & Marques, 2000; Santana et al., 2003; Rhyne et al., 2004). More recently, Baeza et al. (2009) conducted molecular analyses and presented data showing a lack of support for the separation of most of the species included in both genera. This was later contested by Windsor & Felder (2014). In addition, considering these changes in the genus *Mithrax*, Windsor & Felder (2009) also synonymized the species *Mithrax caribbaeus* (Rathbun, 1920) and *Damithrax hispidus* (*Mithrax hispidus*) based on molecular and morphological data.

Spermatozoal and spermatophoral ultrastructure has been demonstrated to be an important source of information for both taxonomic and phylogenetic works in marine crabs (Jamieson, 1994; Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009, Klaus & Brandis, 2010; Tudge et al., 2014, Camargo et al., 2015). Although, the structure and fine structure of the spermatozoa in majid brachyurans were extensively studied by Hinsch (1969, 1971, 1973), among others, no ultrastructural studies have been made on the spermatozoa of *Mithrax hemphilli* Rathbun, 1892, *Mithrax aculeatus* (Herbst, 1790), *Mithraculus forceps* A. Milne-Edwards, 1875, *Mithraculus sculptus* (Lamarck, 1818), *Mithraculus coryphe* (Herbst, 1801), *O. bicornuta*, *D. hispidus*, *D. tortugae* and *T. ruber*.

Different species of crustaceans with wide distributions have been reported to have genetic or morphological variability among populations from different regions or provinces (Staton & Felder, 1995; Negri et al., 2012). This may indicate problems in the distribution patterns or may represent population structure of some species. For example, among the species of Mithracidae, many of them have a large and continuous distribution from the southeastern United States, Gulf of Mexico, through the entire Caribbean and south to Brazil (Melo, 1996), which represents a very interesting pattern of distribution to be investigated.

In this context, this work provides the first comparative description of the ultrastructure of spermatozoa and spermatophores of these members of the family Mithracidae. Furthermore, we performed a molecular phylogenetic analysis using partial sequences of the same mitochondrial genes 12S, 16S and COI and sequences used by Windsor & Felder (2014), also we included specimens from South America, from many of the same localities as morphological analysis specimens. The resulting topology was used to analyze patterns of distribution of the morphological characters from the spermatozoal analyses. In addition, we also compared the spermatozoal ultrastructure and molecular data among specimens of the same species from Brazil and Venezuela, also only molecular data of specimens belonging to different zoogeographic provinces (Brazilian, Caribbean and Carolinian) (Briggs & Bowne, 2012).

Material and Methods

Sampling

Adult male specimens of the genera *Damithrax*, *Mithrax*, *Mithraculus*, *Teleophrys* and *Omalacantha* were collected by scuba diving at Ubatuba and Santos, São Paulo State, Brazil, between June 2010 and April 2015, and at Isla Tortuga, Venezuela in 2011 (see Table 1). At least three specimens of each species were obtained, and they were identified based on descriptions in Melo (1996) and Windsor & Felder (2014).

Transmission Electronic Microscopy (TEM)

Samples (1mm³) of posterior vas deferens (PVD) were removed from male crabs and fixed for four hours in Karnovsky's solution (2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde) in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.3) prepared with filtered seawater and then post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 2 hours. "En bloc" staining was performed with 2% aqueous uranyl acetate. After this step, the samples were dehydrated in an acetone series (50% to 100%) and embedded in Epon-Araldite resin. The resin blocks were cut on a Leica UC7 ultramicrotome and the ultrathin sections (50nm) were collected on copper grids and contrasted with 2% uranyl acetate and 2% lead citrate (Zana et al., 2001). The samples were photographed with a transmission electron microscope JEOL J1010 using an 80KV electron beam. For the description of the spermatozoa we used the nomenclature proposed by Jamieson (1994) and Tudge et al. (2014). The morphology of the perforatorial chamber follows the Standard Nomenclature based Metrics and Shapes of Plane for Use in Gregarine Taxonomy by Clopton (2004). The measurements of the operculum, considered slender to be up to 0.215µm and thick up to 0.310µm. For the inner layer of the acrosome measurements were considered slender up to 0.170µm and thick up to 0.500µm. We proposed a diagram with a general model of spermatozoa based on the morphological characteristics of the group (Fig. 1)

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Fragments of the posterior vas deferens (PVD) of *D. hispidus*, *D. tortugae*, *Mithrax aculeatus* and *Mi. coryphe* were fixed in the same solution used in TEM for at least 24hours. Then they were submitted to the post-fixation protocol in 1% osmium tetroxide in cacodylate sodium buffer and dehydrated in an ascending series of ethyl

alcohol solutions (15-100%). To complete the dehydration, the samples were further submitted to critical point drying in an EMS CPD 030. After being completely dry, the fragments of PVD were fractured with tweezers and sputter coated with a layer of 10nm of gold (SC 070 from Balzer Union). Micrographs were in a JEOL JSM 5210 Scanning Electron Microscope, with voltages ranging from 10-20kV.

Molecular data

In order to include the specimens from South America, from the same localities, we conducted a new molecular analysis of the family Mithracidae. The analysis was based on partial DNA fragments of three mitochondrial genes: 12S, 16S and COI. These genes has previously been widely used in phylogenetic studies of crustacean decapods (Harrison, 2004; Thoma et al., 2013; Bracken-Grissom et al., 2014).

The process of DNA extraction, amplification and sequencing followed the protocols of Schubart et al. (2000) with modifications according to Mantelatto et al. (2006). Genomic DNA was extracted from muscle tissue in the chelipeds. The tissue was incubated for 48hrs in 600 μ L Lysis buffer at 55°C, with 200 μ l of proteinase K (500 μ g/mL); the proteins were separated by adding 200 μ l of ammonium acetate (7.5M), followed by centrifugation. The DNA was precipitated by the addition of 600 μ L of cold isopropanol in the supernatant, followed by centrifugation; the resulting pellet was washed with 70% ethanol, centrifuged, dried and re-suspended in 20-40 μ L of TE buffer. The 16S and COI region were amplified by PCR technique (Polymerase Chain Reaction) with the primers universal for invertebrates HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') and LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3') (Folmer et al., 1994) for the COI gene, the primers 1472 (5'-AGATAGAAACCAACCTGG-3') (Crandall & Fitzpatrick, 1996), and 16L2 (5'-TGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') (Schubart et al., 2002), and the internal and specific to majids, forward (5'-TATTTTGACCGTGCAAAGGTAG-3') and reverse (5'-ATTTAAAGGTTCGAACAGACCCT-3') (Hultgren & Stachowicz, 2008) for the 16S gene. The PCR products were purified using SureClean Plus kit (following the manufacturer's protocol) and sequenced using the ABI Big Dye® Terminator Mix on an automatic sequencer (ABI PRISM 3100 Genetic Analyser®) following Applied Biosystems protocols.

The obtained sequences were confirmed by the consensus of both strands; and the consensus sequences were obtained using the program BioEdit version 7.0.5 (Hall,

2005) from two complementary sequences. The consensus sequences of 12S, 16S and COI were aligned using the MAFFT program and the progressive method FFT-NS-I (Kato et al., 2005). The COI sequences were checked for the presence of stop codons and all sequences obtained were submitted to GenBank. Sequences available in GenBank for other species of Mithracidae were included in the analysis, covering also all the 12S sequences analyzed. The choice of outgroup was based on the work of Windsor & Felder (2014) and all used sequences in the molecular analysis are shown in Table 2.

Phylogenetic analysis

The JModelTest 2.1.4 (Posada, 2008) was used to evaluate the best-fit model for each marker based on the corrected Akaike's Information Criterion (AICc). Phylogenetic trees were constructed using Bayesian inference (BI) in MrBayes v. 3.2.2 (Ronquist et al., 2012) on the CIPRES portal (http://www.phylo.org/sub_sections/portal/) (Miller et al., 2010). The search was run with four chains for 20,000,000 generations with trees being sampled every 5,000 generations. Trace plots were visually inspected to assess convergence, mixing, and stationarity in Tracer v1.4. (Rambaut & Drummond, 2007). As conservative approaches, the first 25% of the trees were discarded as 'burnin' and it was obtained a maximum clade credibility tree from the remaining 1501 saved trees, in TreeAnnotator v. 1.5.3 (Rambaut & Drummond, 2007). The internal consistency of the branches was evaluated by Bayesian posterior probabilities (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) and values > 50% are shown on the resulting tree edited on FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

Mapping of morphological characters

We conceived of two characters, based on our observations of the spermatozoa morphology of the members of the family Mithracidae. Character 1 is proposed as "Thickness of the operculum: slender (state 0), thick (state 1)". Character 2 is proposed as "Shape of the perforatorial chamber: deltoid (state 0), rhomboid (state 1)". These two characters were then mapped onto the tree topology obtained in the phylogenetic analysis conducted for this study (see previous item), using Mesquite v.3.04 (Maddison & Maddison, 2015) inferred by Parsimony Ancestral States.

Genetic distance analyses

In order to compare the partial sequences of specimens of the same species from Brazil (Brazilian Province), Venezuela and Belize (Caribbean Province), Gulf of Mexico and USA (southeastern of United States, excluding the Gulf of Mexico – this definition will be used though all text) (Carolinian Province), genetic distance calculations were performed using MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Distance matrixes were calculated using uncorrected distances (*p*-distance) based on the partial sequences of COI and 16S for Mithracidae. The distance matrixes were constructed not using a model of evolution since it has been shown that using *p*-distance avoid over-parametrizing and there is no need to use complex distances measures when studying closely related sequences (Nei & Kumar, 2000; Collins et al., 2012). To help assess intraspecific and interspecific genetic distances, two frequency histograms were constructed with pairs of COI and 16S sequences. We focused on the comparison of the specimens *D. hispidus*, *Mi. forceps*, *Mi. sculptus* and *O. bicornuta* from Brazil vs. Caribbean, Gulf of Mexico and USA.

Results

Spermatophores

In all species of Mithracidae studied the spermatozoa were stored in spherical to elongate-elliptical spermatophores (Figs. 2 and 3), immersed in seminal fluid (Fig. 2). The spermatophore of these crab species were always in coenospermy showing variable sizes of spermatophore and variable number of spermatozoa per spermatophore (Fig. 3). They are delimited by a smooth wall under SEM (Fig. 2A), which appears thick and granular under TEM (Fig. 3). The spermatophore structure does not provide any consistent or reliable character to be compared among the genera.

Spermatozoa

Mithrax aculeatus (Herbst, 1790)

The sperm of *M. aculeatus* (Fig. 4A) shows a perforated operculum in the acrosome. The operculum is thick, bent posteriorly around the perforatorial chamber apex (Fig. 4B), which does not quite reach the opercular opening. The subopercular region is large, envelopes the perforatorial chamber apex, and is less electron-dense than the inner acrosome layer. This latter region has a larger diameter than the subopercular region, which it exteriorly envelopes (Fig. 4B). The perforatorial chamber is rhomboid

in shape with a narrow, but rounded, apex (Fig. 4B), and a narrow base surrounded by a thickened ring (Fig. 4C). In cross section the three concentric acrosome vesicle layers are clear (Fig. 4D), as well as the perforatorial chamber and subopercular region.

Mithrax hemphilli Rathbun, 1892

In the spermatozoa of *M. hemphilli* (Fig. 5A) the thick operculum, perforated and posteriorly elongated, and anteriorly forming a rounded ring (Fig. 5B) can be observed. One end of the operculum opens deeply into the acrosome vesicle, with a wide aperture and laterally has a small thickened swelling (Fig. 5B). This opercular shape is a specific characteristic of this species. The perforatorial chamber apex reaches the open edge of the posteriorly directed operculum. The anterior half of the perforatorial chamber is surrounded by a thin, electron-pale, subopercular region. This latter structure is smaller in diameter than the surrounding inner acrosome layer which is rounded, more electron-dense and has an anterior projection at the point of the small, lateral opercular swelling (Fig. 5B). The perforatorial chamber is rhomboid in shape, with a narrow and slightly rounded apex (Fig. 4B) and the base is wide, and long, in the region of the equally elongate thickened ring (Fig. 5C). Anterior to the thickened ring (Fig. 5C), the perforatorial chamber becomes wider with rounded angular edges. In cross section the inner acrosome layer is not completely covered by the electron-dense operculum, and the three concentric layers of the acrosome vesicle are clearly visible (Fig. 5D).

Mithraculus sculptus (Lamarck, 1818)

In longitudinal section the spermatozoa of *Mi. sculptus* (Fig. 6A) shows the perforated operculum as a shallow protruding ring. The perforated operculum is thin, has a wide opening, and the end protruding posteriorly inside the acrosome is straight (Fig. 6B). The subopercular region is less electron-dense than the adjacent inner layer of the acrosome, which is narrow and straight, and has a similar width to the subopercular region (Fig. 6B). The perforatorial chamber has a deltoid morphology with a very sharp apex, reaching, and even surpassing, the posterior most edge of the operculum (Fig. 6B). The perforatorial chamber margins anterior to the thickened ring are rounded, to almost straight (Fig. 6C). The inner acrosome layer is narrow posteriorly and completely covered by the operculum anteriorly, but in some transverse sections the clear visualization of three acrosomal layers is possible (Fig. 6D).

Mithraculus coryphe (Herbst, 1801)

The spermatozoa of *Mi. coryphe* have a large nucleus, in longitudinal view, with highly granular chromatin (Fig. 7A). The acrosome vesicle shows a relatively thick perforated operculum, with a wide opening, and the inner acrosome layer is narrow, straight and tapers posteriorly (Fig. 7B). The subopercular region is very wide, with a similar width to the inner acrosome layer which has a slightly greater electron-density (Fig. 7B). The morphology of the perforatorial chamber is deltoid in shape, anteriorly surpassing the posterior edge of the operculum, and with a narrow and rounded apex (Figs. 7A, B). The margins of the perforatorial chamber, anterior to the thickened ring, is markedly rounded (Figs. 7A, C). The inner acrosome layer is anteriorly covered by the operculum (Figs. 7A, B) and in transverse sections all three concentric acrosome layers are visible (Fig. 7D).

Mithraculus forceps A. Milne-Edwards, 1875

In *Mi. forceps* the spermatozoa (Fig. 8A) have a thin, perforated operculum (Fig. 8B). The subopercular region is narrow and surrounds the anterior portion of the perforatorial chamber (Fig. 8B). The inner acrosome layer is thin and straight, with a thickness similar to that of the subopercular region (Fig. 8B). The perforatorial chamber is deltoid in shape with a slightly tapered, rounded apex (Figs. 8A, B) with a long and straight-sided base (Figs. 8A, C). The nucleus has finely granular chromatin, and radial arms (Fig. 8A). The thickened ring is thin, electron-dense, and extends from the base of the acrosome vesicle to just posterior to the tapered end of the inner acrosome layer, and at this point the perforatorial chamber inner wall has a slight, internally directed swelling (Fig. 8C). Transverse sections of the acrosome vesicle demonstrate the three principal layers in the acrosome vesicle (Fig. 8D).

Damithrax hispidus (Herbst, 1790)

The mature spermatozoon of *D. hispidus* (Fig. 9A) has the acrosome vesicle with its dorsal surface, not surrounded by the nuclear cup, occupied by a thin and perforated operculum (Figs. 9A, B). One end of the operculum opens posteriorly into the acrosome vesicle and the pointed apex of the perforatorial chamber reaches anteriorly into this opercular opening (Fig. 9B). The subopercular region is slender and surrounds the anterior portion of the perforatorial chamber, and is less electron-dense than the inner acrosome layer, which is wider and more rounded (Fig. 9B). The perforatorial chamber

is deltoid in shape, with a narrow and slightly rounded apex (Figs. 9A, B). The base of the perforatorial chamber, adjacent to the thickened ring, is wide and straight-walled (Figs. 9A, C). Anterior to the thickened ring, the perforatorial chamber briefly increases in width to form a rounded central region (Figs. 9A-C). In cross-section the complex concentric zonation of the acrosome vesicle, at the level of the anterior perforatorial chamber, is seen (Fig. 9D).

Damithrax tortugae (Rathbun, 1920)

In *D. tortugae* the acrosome vesicle shows a large perforated operculum, with the inner edges directed posteriorly around the apex of the perforatorial chamber (Figs. 10A, B). The operculum has a wide opening and the posteriorly directed portion meets the inner acrosome layer (Fig. 10B). The subopercular space is narrow, surrounds the anterior portion of the perforatorial chamber, and exteriorly abutts the inner acrosome layer; which is thicker and more rounded in profile (Fig. 10B). The perforatorial chamber is the deltoid type with a narrow and slightly rounded apex, which extends beyond the posterior edge of the operculum and into the perforatorial opening (Figs. 10A, B). The walls of the perforatorial chamber, anterior to the thickened ring, are markedly rounded (Figs. 10A, C). The concentric acrosome layers can be clearly viewed in cross section (Fig. 10D).

Omalacantha bicornuta (Latreille, 1825)

In the spermatozoa of *O. bicornuta* (Fig. 11A), the perforated operculum is fairly thick and the posteriorly directed part, inside the acrosome vesicle, is short and forms a distinct curved structure (Figs. 11A, B). Below this, the subopercular region is dilated posteriorly, and then progressively narrows towards the posterior region of the perforatorial chamber (Fig. 11B). The inner acrosome layer is large and rounded, possessing larger width and more electron-density than the subopercular region (Fig. 11B). The perforatorial chamber is deltoid with a rounded apex (Fig. 11B) and a wide and elongated basal portion (Fig. 11C). The thin thickened ring lies adjacent to the straight-walled basal portion of the perforatorial chamber (Fig. 11C). In cross-section it is possible to see the three concentric acrosome vesicle layers, exterior to the central perforatorial chamber, the subopercular region and the electron-dense operculum (Fig. 11D).

Teleophrys ruber (Stimpson, 1871)

In *T. ruber* the spermatozoon (Fig. 12A) has a thick and perforated operculum, with a wide, apical opening (Figs. 12A, B). The subopercular region is quite narrow and surrounds the anterior portion of the perforatorial chamber (Fig. 12B). The inner acrosome layer is wider than the subopercular region, which is envelopes, and extends anteriorly to lie adjacent to the part of the operculum that projects posteriorly into the acrosome vesicle (Fig 12B). The perforatorial chamber is rhomboid with a slightly tapered, but rounded, apex and a uniquely curved posterior chamber wall (adjacent to the thickened ring) seen for the first time in this genus (Figs. 12A, C). The concentric nature of the three acrosome vesicle layers is obvious in cross section (Fig. 12D).

Brazil (Brazilian Province) vs. Venezuela (Caribbean province)

Based on spermatozoal morphology we could not find any differences between specimens of four species collected in both Venezuela and Brazil: *D.hispidus* (collected and identified in Venezuela under the old name *M. caribbaeus*) (Figs. 13A and B), *Mi. forceps* (Figs. 13C and D), *Mi. sculptus* (Figs. 13E and F), and *O. bicornuta* (Figs. 13G and H). The characters of spermatozoal ultrastructural comparison in this work are listed in Table 3.

Phylogenetic analysis

The resulting topology of a Bayesian analysis (Fig. 14) recovers Mithracidae as a monophyletic group (support = 100%), with the genus *Libinia* Leach, 1815 as its sistergroup. Two major clades are recovered within Mithracidae, one composed of species in the genera *Ala* Lockington, 1877, *Nonala* Windsor & Felder, 2014, *Nemausa* A. Milne-Edwards, 1875, *Damithrax*, and *Microphrys* (support = 87%), and the other composed of species in the genera *Omalacantha*, *Mithrax*, *Teleophrys*, *Hemus* A. Milne-Edwards, 1875, *Thoe* Bell, 1835, *Petramithrax* Windsor & Felder, 2014 and *Mithraculus*, and *Pitho* Bell, 1836 as sister clade of the two major clades aforementioned (support < 50%). In the latter major clade, *Mithrax* appears more closely related to *Teleophrys* than it is to *Omalacantha* or to *Mithraculus*. Also, *Mithax* and *Mithraculus* are positioned in two different clades. This result totally agrees with the hypothesis of Windsor & Felder (2014).

Mapping morphological characters

The presence of a thick operculum (Character 1 – state 1) is present in *O. bicornuta*, *T. ruber*, and both species of the genus *Mithrax*. On the other hand, all other taxa for which information is available have a slender operculum (Character 1 – state 0) (Fig. 14A). The presence of a rhomboid shaped perforatorial chamber (Character 2 – state 1) is observed in species of the genus *Mithrax* and in *T. ruber*. All the other taxa for which we obtained data on the perforatorial chamber morphology have a deltoid shape (Character 2 – state 0) (Fig. 14B)

Genetic distance analyses

Genetic pairwise distance values based on the COI and 16S gene show high values among morphologically well-defined species of Mithracidae (interspecific values), ranging from 7 to 15% for COI (table 4; fig. 15) and from 4 to 16% for 16S (table 5; fig. 16). The values among specimens of the morphologically well-defines species (intraspecific values) ranged from 0 to 1.1 and from 0 to 1.6% for COI and 16S, respectively (Figs. 15 and 16).

The pairwise genetic distance values from the same species between specimens from Brazil (Brazilian Province) where compared with specimens from Venezuela and Belize (Caribbean Province), and Gulf of Mexico and USA (Carolinian Province). The values among these specimens followed onto the gap of interspecific and intraspecific values for the family Mithracidae for this study (Figs. 15 and 16). For COI the values observed between *Mi forceps* from Brazil and USA where 2.5%; for *D. hispidus* from Brazil and Gulf of Mexico where 3.8%; and for *Mi. coryphe* from Brazil and Belize where 6.1%. For 16S the values observed where 1.9 and 2.1% for *Mi. forceps* from Brazil and Venezuela; 2.1 and 3.2% for *D. hispidus* from Brazil and USA; and 3.4% for *O. bicornuta* from Brazil and Venezuela, and Belize.

Discussion

In general, the spermatophores of Mithracidae have a packing pattern of spermatozoa known as coenospermia, in which several to many spermatozoa are grouped together and delimited by one wall of the spermatophore; as can be seen in some species of Majoidea, *Pyromaia tuberculata* (Lockington, 1877), *Schizophrys rufescens* Griffin & Tranter, 1986 and others (Tudge et al., 2014). We observed that all

analysed species share the same characteristics in the morphology of the spermatophore and seminal fluid indicating no variation in sperm transfer mechanisms as observed for the crabs *Pachygrapsus* by Tiseo et al. (2014). Thus, the spermatophores of the species of Mithracidae in this study did not provide adequate support for taxonomic or relationship analyses.

The spermatozoa of Mithracidae have the typical ultrastructural morphology of the Majoidea, whose characteristics are considered plesiomorphic in the context of the Eubrachyura (Tudge et al., 2014). These characteristics include the perforated operculum, the median posterior process and the presence of the well-developed thickened ring, as seen in *Mithrax* spp. (Hinsch, 1973). The spherical, and slightly flattened, shape of the acrosome vesicle seen in the species studied is typical of Eubrachyura, along with the presence of a strongly electron-dense operculum. The spermatozoa have marginal projections called radial arms that may contain chromatin and/or microtubules, and in the case of the Mithracidae species studied in this work, all have 3 arms (tri-radial), as seen in *Camposcia retusa* (Latreille, 1829), *Huenia heraldica* (De Haan, 1837), and *Menaethius monoceros* (Latreille, 1825) (Tudge et al., 2014). Several of the characteristics observed in the species analysed here correspond to plesiomorphies in the context of Mithracidae (e.g. nucleus with granular chromatin, tri-radial arms, and median posterior process with central portion filled with DNA and arranged microtubules) and so do not serve to taxonomically delimit the group. However, a number of characteristics proved variable in the context of our group of study and are discussed in more detail here (e.g. thickness of the operculum, and the shape of the perforatorial chamber).

In relation to the shape of the operculum, the presence of a thick operculum only in *Omalacantha*, *Teleophrys* and *Mithrax* is in accordance with the results of the molecular phylogenetic analysis, which indicates that these species are more closely related to each other than to any other species of Mithracidae, also that this might be the result of one single acquisition in Mithracidae where the plesiomorphic character, slender operculum are shared among *Damithrax* and *Mithraculus*. In character 2, the shape of the perforatorial chamber, the rhomboid shape is observed only in members of the genera *Teleophrys* and *Mithrax* which would be synapomorphic for the clade formed by the two genera, providing additional support for this relationship. It is also worth mentioning that *Teleophrys* and *Mithrax* have the same morphology for all the characters proposed in our study (e.g. thickness of the operculum, thickness and

morphology of inner acrosomal zone, and shape of the perforatorial chamber) and so are distinct from *Omalacantha*. This, along with our mapping of two characters (1 and 2), could indicate a closer relationship of these first two genera, as proposed by in this work and corroborated by Windsor and Felder (2014). In the context of our analysis, this also might be the result of one single acquisition, with the plesiomorphic character, deltoid morphology in *Omalacantha* and all other Mithracidae analysed.

Our analysis of the sperm ultrastructure indicates a number of differences between specimens of *Mithrax* and *Mithraculus*. Species in the genus *Mithrax* in this study have spermatozoa with a thick operculum, dense and rounded inner acrosomal zone, and a rhomboid shape to the perforatorial chamber, while spermatozoa of the *Mithraculus* have a slender operculum, thin and relatively straight inner acrosomal zone, and a deltoid perforatorial chamber. The operculum and perforatorial chamber are structures intimately involved in fertilization and their distinct morphologies could indicate differences in this process. These obvious differences in spermatozoal morphology are further evidence for the separation of both species and genera. Thus, contrary to what was stated in Baeza et al. (2009), based on molecular data (16S rDNA), there are now morphological characters to support the separation of both genera. Yet, these morphological differences are congruent with the separation of both genera in our molecular analysis. In this context, our results support that *Mithrax* and *Mithraculus* represent two different genera within Mithracidae, as previously advocated (White, 1847; Wagner, 1990; Windsor & Felder, 2014).

The morphology of spermatozoa also supports the separation of the species of *Damithrax* from the genus *Mithrax* as proposed by Windsor & Felder (2014). We observed that although both genera share the same characteristics of the inner acrosomal zone, *Damithrax* has a slender operculum and a deltoid shape to the perforatorial chamber. The genus *Mithrax*, however, has a thick operculum and a rhomboid perforatorial chamber. Windsor & Felder (2009) also suggested the synonymy of *M. caribbaeus* with *D. hispidus* (*M. hispidus*). This is corroborated here by the identical ultrastructural morphology of the spermatozoa of the specimens of *M. caribbaeus* from Venezuela and *D. hispidus* from Brazil.

Finally, our morphological analysis indicates that there is no difference in the spermatozoal morphology of specimens from Brazil (Brazilian Province) and from Venezuela (Caribbean Province) for the species *D. hispidus*, *Mi. forceps*, *Mi. sculptus* and *O. bicornuta*. However, we observed some genetic variability between paired

specimens of *D. hispidus* from Brazil and Gulf of Mexico, and from Brazil and USA; between *Mi. forceps* from Brazil and USA; between *Mi. coryphe* from Brazil and Belize, and from Brazil and Venezuela; between *O. bicornuta* from Brazil and Venezuela, and from Brazil and Belize. These variabilities were inserted onto the gap of intraspecific and interspecific values of genetic distance as observed in other studies among some populations of crustaceans from the Caribbean and South America and from Gulf of Mexico and southeastern USA (Neigel, 2009; Terossi & Mantelatto, 2012, Magalhães et al. 2016). Thus, although there is genetic divergence between some species, the external morphology of the specimens and the morphology of the spermatozoon are the same, which could indicate some structure population among these species. It is known that the Amazon River can act as a physical barrier to many marine species. Low salinity in river drainage could be a limiting abiotic factor for some species of the family Mithracidae, just as the salinity factor is limiting for some species of hermit crabs (Sant'anna et al., 2006). This could explain the observed variability between the specimens of Brazil (Brazilian Province) and Venezuela and/or Belize (Caribbean Province). Furthermore, some dynamics could contribute to the diversification in the western Atlantic after emergence of the Isthmus. This process may have changed the direction of the North Equatorial Current in the northern hemisphere, this propelling the Gulf Stream through the Yucatan Strait, with this current becoming more intense than before the closure of the Isthmus (Neigel, 2009) which could acted as a barriers to dispersal among populations of some species of Mithracidae from the Gulf of Mexico (Carolinian Province) and the rest of the western Atlantic. However, more studies as population genetic should be provide to better understand the pattern of genetic variation observed for these specimens without any morphological variation.

Thus, we provide, for the first time, a comparative description of the ultrastructure of the spermatozoa and spermatophores of some members of the brachyuran family Mithracidae, revealing that some morphological characters of the spermatozoa as the thickness of the operculum and the shape of the perforatorial chamber are informative characters that could be used in the taxonomic and phylogenetic studies of the family Mithracidae. Our study also support recent taxonomic changes including the validity of *Mithrax* and *Mithraculus* as different genera; the separation of the species in *Damithrax* from the genus *Mithrax*; and the synonymy of *M. caribbaeus* to *D. hispidus*.

Acknowledgements

The present study is part of the multidisciplinary research project BIOTA supported by the São Paulo Research Foundation FAPESP (#2010/50188-8) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior CAPES-Ciências do Mar II (#1989/2014-23038.004309/2014-51, #2005/2014-23038.004308/2014-14 and #23038.004310/2014-85) granted to FJZ and FLM. CA was supported by a Masterdegree fellowship from CAPES Ciências do Mar II (#1989/2014) and TM also express his appreciation for the PhD fellowship support from CAPES. FJZ and FLM acknowledge the receipt of research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Universal #486337/2013-8 to FJZ and PQ 304968/2014-5 to FLM). Additional thanks are due to Márcia F. Mataqueiro for the technical support and to the Electron Microscopy Laboratory of UNESP – FCAV. We also to thank MSc. João Alberto Farinelli Pantaleão for the diagrammatic drawing of sperms. This study was conducted in accordance with Brazilian laws (FJZ-MMA SisBio permanent license #34587-1; permanent license to FLM for the collection of Zoological Material No. 11777-1 MMA/IBAMA/SISBIO).

References

- Baeza JA, Bolaños JA, Fuentes S, Hernandez JE, Lira C, Lopez R. (2009). Molecular phylogeny of enigmatic Caribbean spider crabs from the *Mithrax–Mithraculus* species complex (Brachyura: Majidae: Mithracinae): ecological diversity and a formal test of genera monophyly. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90, 851–858.
- Bolaños JA, Scelzo, MA. (1981). Larval development of the spider crab *Mithrax verrucosus* Milne-Edwards, reared in the laboratory (Decapoda: Brachyura: Majidae). *The American Zoologist*, 21, 989.
- Bolaños JA, Lares LB, Hernández JE. (1990). Desarrollo larval de *Mithrax caribbaeus* Rathbun, 1920 (Crustacea: Decapoda: Majidae) realizado en condiciones de laboratorio. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 29, 67–89.
- Bolaños JA, Hernández G, Lira C. (2000). *Mithraculus cinctimanus* Stimpson, 1860 y *Spelaeophorus pontifer* (Stimpson, 1871) (Crustacea: Decapoda: Brachyura), dos nuevas adiciones a la carcinofauna venezolana. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 39, 25–31.
- Bracken-Grissom HD, Ah Yong ST, Wilkinson RD, Feldmann RM, Schweitzer CE, Breinholt JW, Bendall M, Palero F, Chan T, Felder DL, Robles R, Chu K, Tsang L, Kim D, Martin JW, Crandal KA. (2014). The emergence of lobsters: Phylogenetic relationships, morphological evolution and divergence time comparisons of an ancient group (Decapoda: Achelata, Astacidea, Glypheidea, Polychelida). *Systematic Biology*, 63, 4, 457 – 479.
- Briggs JC, Bowen BW. (2012). A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. *Journal of Biogeography*, 39, 12–30.

- Camargo TR, Rossi N, Castilho AL, Costa RC, Mantelatto FL, Zara FJ. (2015). Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology*.
- Clopton, RE. (2004). Standard Nomenclature and Metrics of Plane Shapes for Use in Gregarine Taxonomy. *Comparative Parasitology*, 71, 2, 130–140.
- Collins RA, Boykin LM, Cruickshank RH, Armstrong KF. (2012). Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 3: 457–465.
- Crandall AC, Fitzpatrick JF. (1996). Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Systematic Biology*, 45, 1, 1–26.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Fransozo A, Hebling NJ. (1982). Desenvolvimento pós -embrionário de *Mithrax hispidus* (herbst, 1790) (Decapoda, Majidae) em laboratório. *Ciência e Cultura*, 34, 385–395.
- Hall T. (2005). BioEdit v.7.0.5. Biological sequence alignment editor for windows. Ibis Therapeutics a division of Isis pharmaceuticals. Available from: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html/>.
- Harrison JS. (2004). Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinixa*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, 743–754.
- Hinsch, G. W. (1969). Microtubules in the sperm of the spider crab, *Libinia emerginata* L. – *Journal of Ultrastructure Research*, 29: 525 – 534.
- Hinsch, G. W. (1971). Penetration of the oocyte by spermatozoa in the spider crab. – *Journal of Ultrastructure Research*, 35: 86–97.
- Hinsch, G. W. (1973). Sperm structure of Oxyrhyncha. – *Canadian Journal of Zoology*, 1: 421–426.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755.
- Hultgren K, Stachowicz JJ. (2008). Molecular phylogeny of the brachyuran crab superfamily Majoidea indicates close congruence with larval morphology-based trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 986–996.
- Jamieson BGM. (1994). Phylogeny of the Brachyura with particular reference to the Podotremata: evidence from a review of sperm ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philosophical transactions: Biological Sciences*, 345, 373–393.
- Jamieson BGM, Tudge CC. (2000). Crustacea-Decapoda. 1–95pp. In: Jamieson, BGM. (ed.), *Reproductive Biology of Invertebrates*. Vol. IX, part C: *Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny*: John Wiley & Sons, Chichester.
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res*, 20; 33 (2):511-8.
- Klaus S, Brandis D. (2010). Evolution of sperm morphology in potamid freshwater crabs (Crustacea: Brachyura: Potamoidea). *Zoological Journal of the Linnean Society* 161: 5.
- Maddison, WP, Maddison DR. (2015). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. <http://mesquiteproject.org>.

- Magalhães T, Robles R, Felder DL, Mantelatto FL. (2016). Integrative taxonomic study of the purse crab genus *Persephona* Leach, 1817 (Brachyura: Leucosiidae): Combining morphology and molecular data. *Plos One*, 11, 4, e0152627.
- Mantelatto FL, Robles R, Biagi R, Felder DL. (2006). Molecular analysis of the taxonomic and distributional status based for the hermit crab genera *Loxopagurus* Forest, 1964, and *Isocheles* Stimpson, 1858 (Decapoda, Anomura, Diogenidae). *Zoosystema*, 28, 2, 495–506.
- Melo GAS. (1996). Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. São Paulo, Plêiade/Fapesp.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" In : Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA, USA, 1-8pp.
- Negri M, Pileggi LG, Mantelatto FL. (2012). Molecular barcode and morphological analyses reveal the taxonomic and biogeographical status of the striped-legged hermit crab species *Clibanarius sclopetarius* (Herbst, 1796) and *Clibanarius vittatus* (Bosc, 1802) (Decapoda : Diogenidae). *Invertebrate Systematics*, 26, 561–571.
- Nei M, Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Neigel JE. (2009). Populations genetics and biogeographic of the Gulf of Mexico. In: Felder DL, Camp DK, editors. *Gulf of Mexico Origin, Waters and Biota*. Vol. 1. Biodiversity. Corpus Christi: Texas A and M University Press.
- Pohle GW, Marques FPL. (2000). Larval stages of *Paradasygius depressus* (Bell, 1835) (Brachyura: Majidae) and a phylogenetic hypothesis for 21 genera of Majidae. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 2000, 113, 739–760.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. (2007). Tracer v1.4. Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 12 December 2013).
- Rambaut, A. (2009). FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Scotland. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk> (accessed 25 January 2014).
- Rhyne AL, Fujita Y, Calado. (2004). Larval development and 1st crab of *Mithraculus sculptus* (Decapoda: Brachyura: Majoidea: Mithracidae) described from laboratory-reared material. *Journal of the Marine biological association of the United Kingdom*, 86, 1133–1147.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling. A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61 (3), 539–542.
- Santana W, Pohle G, Marques F. (2003). Zoeal stages and melagopa of *Mithrax hispidus* (Herbst, 1790). (Decapoda: Brachyura: Majoidea: Mithracidae): a reappraisal of larval characters from laboratory cultured material and review of larval of the *Mithrax–Mithraculus* species complex. *Invertebrate Reproduction & Development*, 44, 1, 17–32.
- Sant’anna BS, Zangrande CM, Reigada ALD & Severino-Rodrigues. (2006). Spatial distribution and shell utilization in three sympatric hermit crabs at non-consolidated sublittoral of estuarine-bay complex in São Vicente, São Paulo, Brazil. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 41(2): 141-146.

- Schubart CD, Neigel JE, Felder DL. (2000). Molecular Phylogeny of mud crabs (Brachyura: Panopeidae) from the northwestern Atlantic and the role of morphological stasis and convergence. *Marine Biology*, 137, 1, 11–18.
- Schubart CD, Cuesta JA, Felder DL. (2002). Glyptograpsidae, a new brachyuran family from Central America: larval and adult morphology, and a molecular phylogeny of the Grapsoidea. *Journal Crustacean Biology*, 22, 1, 28–44.
- Staton JL, Felder DL. (1995). Genetic variation in populations of the ghost shrimp genus *Callichirus* (Crustacea: Decapoda: Thalassinoidea) in the Western Atlantic and Gulf of Mexico. *Bulletin of Marina Science*, 56(2): 523-536.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739
- Terossi M, Mantelatto FL. (2012). Morphological and genetic variability in *Hippolyte obliquimanus* Dana, 1852 (Decapoda, Caridea, Hippolytidae) from Brazil and the Caribbean Sea. *Crustaceana*, 85, 6, 685–712.
- Thoma BP, Guinot D, Felder DL. (2013). Evolutionary relationships among American mud crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Xanthoidea) inferred from nuclear and mitochondrial markers, with comments on adult morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 170, 1, 86–109.
- Tiseo GR, Mantelatto FL, Zara FJ. (2014). Is cleistosperry and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*, 34(6), 704-716.
- Tudge CC. (2009). Sperm morphology and its bearing on decapod phylogeny. In: Martin JW, Crandall KA, Felder DL (Eds) *Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean issues 18*. Taylor and Francis/CRC Press, Boca Raton.
- Tudge CC, Scheltinga DM, Jamieson BGM, Guinot D, Forges BR. (2014). Comparative ultrastructure of the sperm of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. *Acta Zoologica (Stockholm)*, 95, 1–20.
- Wagner HP. (1990). The genera *Mithrax* Latreille, 1818 and *Mithraculus* White, 1847 (Crustacea: Brachyura: Majidae) in the Western Atlantic Ocean. *Zoologische Verhandelingen*, 264, 1–65.
- White A. (1847). List of the specimens of Crustacea in the collection of the British Museum. London: British Museum.
- Windsor AM, Felder DL. (2009). Re-evaluation of species allied to *Mithrax hispidus* (Decapoda: Brachyura: Majoidea: Mithracidae) based on three mitochondrial genes. *Zootaxa*, 2302, 61–68.
- Windsor AM, Felder DL. (2014). Molecular phylogenetics and taxonomic reanalysis of the family Mithracidae Macleay (Decapoda: Brachyura: Majoidea). *Invertebrate Systematics*, 28, 145–173.
- Zana U, Lino-Neto J, Dolder H. (2001). Ultrastructure of sperm in *Plebeia* (*Plebeia*) *Droryana friese* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *Journal of Hymenoptera Research*, 10, 261–270.

List of figures and legends

Table 1. Species used for transmission electron microscopy and collection site. Species with “*” were also used for scanning electron microscopy

Species	Locality
<i>Mithrax hemphilli</i>	Isla La Tortuga, Venezuela
<i>Mithrax aculeatus</i>	Isla La Tortuga, Venezuela
<i>Mithraculus forceps</i>	Isla La Tortuga, Venezuela/Ubatuba and Santos – SP, Brazil
<i>Mithraculus coryphe</i>	Isla La Tortuga, Venezuela/Ubatuba and Santos – SP, Brazil
<i>Mithraculus sculptus</i>	Isla La Tortuga, Venezuela and Ubatuba – SP, Brazil
<i>Omalacantha bicornuta</i>	Isla La Tortuga, Venezuela and Ubatuba – SP, Brazil
<i>Teleophrys ruber</i>	Isla La Tortuga, Venezuela
<i>Damithrax hispidus</i>	Isla La Tortuga, Venezuela and Ubatuba – SP, Brazil
<i>Damithrax tortugae</i>	Ubatuba – SP

Table 2: Specimens used in molecular analyses, collection site, catalog numbers, and GenBank accession numbers. Genbank accession number with “-” represent sequences not obtained and/or not available on the database. Genbank accession number with “*” represent sequences obtained by us.

Collection abbreviations include CCDB: Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia, FFCLRP/USP; MOBR: Museo Oceanológico Hermano Benigno Roman, Estación de Investigaciones Marinas de Margarita, Fundación La Salle de Ciencias Naturales; ULLZ: University of Louisiana at Lafayette Zoological Collection; UMML: University of Miami Marine Laboratories, Rosenstiel School of Marine Science; TCWC: Texas Cooperative Wildlife Collection, College Station. GMx – Gulf of Mexico.

<i>Species</i>	Collection site	Catalog number	GenBank accession No.		
			12S	16S	COI
<i>Ala cornuta</i>	Panama (Pacific)	ULLZ 9065	KF453126	KF453018*	KF452937*
<i>Damithrax hispidus</i>	São Paulo, Brazil	CCDB 2950	-	KX398196*	KX398189*
<i>Damithrax hispidus</i>	Florida, USA (GMx)	FLMNH11383	GU144533	GU144549	GU144556
<i>Damithrax hispidus</i>	Texas, USA	TCWC 2-6261	GU144530	GU144551	-
<i>Damithrax hispidus</i>	Texas, USA	TCWC 2-2235	GU144531	GU144552	-
<i>Damithrax hispidus</i>	Florida, USA (GMx)	ULLZ 8619	GU144532	GU14450	GU144557
<i>Damithrax pleuracanthus</i>	Florida, USA (GMx)	ULLZ 7714	GU144536	GU144546	GU144561
<i>Damithrax pleuracanthus</i>	Yucatán, Mexico	ULLZ 6751	GU144534	GU144545	
<i>Damithrax pleuracanthus</i>	Yucatán, Mexico	ULLZ 6995	GU144538	GU144547	GU144559
<i>Damithrax pleuracanthus</i>	Florida, USA (Atlantic)	ULLZ 5694	GU144537	GU144544	GU144560

<i>Damithrax pleuracanthus</i>	Florida, USA (Atlantic)	ULLZ 4572	GU144535	GU144548	GU144558
<i>Damithrax spinosissimus</i>	Belize	ULLZ 6981	KF453112	KF453004	KF452925
<i>Damithrax spinosissimus</i>	Belize	UMML N/A	-	GQ438763	-
<i>Damithrax spinosissimus</i>	Belize	ULLZ 9146	-	KF453021	KF452941
<i>Damithrax tortugae</i>	São Paulo, Brazil	CCDB 5024	-	KX398190*	KX398197*
<i>Damithrax tortugae</i>	Yucatán, Mexico	ULLZ 9290	-	-	KF452953
<i>Damithrax tortugae</i>	Yucatán, Mexico	ULLZ 9286	-	-	KF452952
<i>Damithrax tortugae</i>	Yucatán, Mexico	ULLZ 6792	GU144529	GU144543	GU144564
<i>Damithrax tortugae</i>	Yucatán, Mexico	ULLZ 7353	GU144528	-	GU144528
<i>Damithrax tortugae</i>	Panama (Caribbean)	ULLZ 6980	GU144527	GU144542	GU144562
<i>Hemus cristulipes</i>	Florida, USA (GMx)	ULLZ 5783	KF453100	KF452995	KF452915
<i>Hemus magalae</i>	Panama (Pacific)	ULLZ 1149374	KF453144	KF453034	KF452958
<i>Microphrys branchialis</i>	Panama (Pacific)	ULLZ 10002	KF453074	KF452970	KF452894
<i>Microphrys branchialis</i>	Panama (Pacific)	ULLZ 10004	KF453075	KF452971	-
<i>Mithraculus cinctimanus</i>	Panama (Caribbean)	ULLZ 12248	KF453091	KF452988	KF452906
<i>Mithraculus cinctimanus</i>	Panama (Caribbean)	ULLZ 12012	KF453089	KF452986	KF452905
<i>Mithraculus cinctimanus</i>	Belize	ULLZ 7076	KF453115	KF453007	KF452928
<i>Mithraculus cinctimanus</i>	Belize	UMML 32.9623	-	GQ438762	-
<i>Mithraculus coryphe</i>	São Paulo, Brazil	CCDB 5041	-	KX398192	KX398199
<i>Mithraculus coryphe</i>	Florida, USA	ULLZ 6917	KF453111	-	-

	(Atlantic)				
<i>Mithraculus coryphe</i>	Belize	ULLZ 9223	KF453135	KF453026	KF452946
<i>Mithraculus coryphe</i>	Venezuela	MOBR-C-1535	-	GQ438771	-
<i>Mithraculus denticulatus</i>	Panama (Pacific)	ULLZ 9131	KF453129	-	KF452940
<i>Mithraculus forceps</i>	São Paulo, Brazil	CCDB 2976	-	KX398191	KX398198
<i>Mithraculus forceps</i>	Florida, USA (Atlantic)	ULLZ 6567	KF453102	KF452996	KF452916
<i>Mithraculus forceps</i>	Venezuela	MOBR-C-1533	-	GQ438761	-
<i>Mithraculus forceps</i>	Louisiana, USA	ULLZ 4893	KF453098	-	KF452912
<i>Mithraculus forceps</i>	Florida, USA (Atlantic)	ULLZ 6922	GU144524	GU144541	GU144554
<i>Mithraculus sculptus</i>	Panama (Caribbean)	N/A	-	EU682784	-
<i>Mithraculus sculptus</i>	Panama (Caribbean)	N/A	-	EU682785	-
<i>Mithraculus sculptus</i>	Florida, USA (Atlantic)	ULLZ 6915	GU144525	GU144540	GU144553
<i>Mithraculus sculptus</i>	Florida, United States	ULLZ 8774	GU144526	GU144539	GU144555
<i>Mithrax aculeatus</i>	Puerto Vargas, Costa Rica	CCDB 2934	-	KX398193	KX398200
<i>Mithrax aculeatus</i>	Panama (Caribbean)	ULLZ 10758	-	-	KF452899
<i>Mithrax aculeatus</i>	Florida, USA (Atlantic)	ULLZ 4534	KF453096	KF452993	KF452910
<i>Mithrax aculeatus</i>	Belize	ULLZ 9148	KF453131	KF453022	KF452942
<i>Mithrax aculeatus</i>	Venezuela	MOBR-C-1534	-	GQ438767	-
<i>Mithrax braziliensis</i>	São Paulo, Brazil	CCDB 5060	-	pending	pending
<i>Mithax caboverdianus</i>	Cape Verde Island	ULLZ 11711	KF453086	KF452982	-

<i>Mithax caboverdianus</i>	Cape Verde Island	ULLZ 11710	-	KF452981	-
<i>Mithrax hemphilli</i>	Belize	ULLZ 9150	KF453133	KF453024	KF452944
<i>Nemausa acuticornis</i>	Florida, USA (GMx)	ULLZ 5779	-	-	KF452914
<i>Nemausa acuticornis</i>	Florida, USA (GMx)	ULLZ 6766	KF453105	-	KF452919
<i>Nemausa acuticornis</i>	Florida, USA (GMx)	ULLZ 6674	KF453103	KF452997	KF452917
<i>Nemausa acuticornis</i>	Louisiana, USA	ULLZ 8300	KF453123	KF453015	KF452934
<i>Nemausa cornuta</i>	Honduras	ULLZ 2962	KF453094	KF452991	-
<i>Nemausa sinensis</i>	Costa Rica (Pacific)	ULLZ 8340	KF453124	KF453016	KF452935
<i>Nemausa spinipes</i>	Panama (Pacific)	ULLZ 9066	KF453127	KF453019	KF452938
<i>Nonala holderi</i>	Yucatán, Mexico	ULLZ 6888	KF453109	KF453002	KF452923
<i>Nonala holderi</i>	Belize	ULLZ 9282	KF453137	KF453028	KF452950
<i>Omalacantha antillensis</i>	Florida, USA (Atlantic)	ULLZ 5663	KF453099	KF452994	KF452913
<i>Omalacantha bicornuta</i>	Pernambuco, Brazil	CCDB 5740	-	KX398194	KX398201
<i>Omalacantha bicornuta</i>	Belize	ULL Z 7077	KF453116	KF453008	KF452929
<i>Omalacantha bicornuta</i>	Belize	ULLZ 9304	KF453141	KF453031	-
<i>Omalacantha bicornuta</i>	Florida, USA (Atlantic)	ULLZ 6396	KF453101	-	-
<i>Omalacantha bicornuta</i>	Venezuela	MOBR-C- 1530	-	GQ438760	-
<i>Petramithrax pygmaeus</i>	Panama (Pacific)	ULLZ 10063	KF453076	KF452972	KF452895
<i>Pitho aculeata</i>	Belize	ULLZ 9149	KF453132	KF453023	KF452943
<i>Pitho anisodon</i>	Florida, USA (GMx)	ULLZ 11977	KF453088	KF452985	KF452904
<i>Pitho laevigata</i>	Florida, USA (GMx)	ULLZ 7796	KF453120	KF453012	KF452967
<i>Pitho iherminieri</i>	Yucatán, Mexico	ULLZ 6996	KF453113	KF453005	KF452926
<i>Pitho iherminieri</i>	Belize	ULLZ 9300	KF453139	-	KF452954
<i>Pitho iherminieri</i>	Yucatán, Mexico	ULLZ 6794	KF453106	KF452999	KF452920

<i>Pitho iherminieri</i>	Belize	ULLZ 9302	KF453140	KF453030	KF452955
<i>Pitho mirabilis</i>	Yucatán, Mexico	ULLZ 7058	KF453114	KF453006	KF452927
<i>Pitho quadridentata</i>	Panama (Caribbean)	ULLZ 12315	KF453093	KF452990	KF452908
<i>Teleophrys cristulipes</i>	Panama (Pacific)	ULLZ 9761	KF453143	KF453033	KF452957
<i>Teleophrys ornatus</i>	Belize	ULLZ 7571	KF453118	KF453010	KF452931
<i>Teleophrys pococki</i>	Louisiana, USA	ULLZ 11872	KF453087	KF452984	-
<i>Teleoprhys ruber</i>	Isla Margarita, Venezuela	CCDB 2093	-	KX398195	KX39202
<i>Teleoprhys ruber</i>	Belize	ULLZ 9280	-	-	KF452948
<i>Teleoprhys ruber</i>	Belize	ULLZ 9284	KF453138	KF453029	KF452951
<i>Teleoprhys ruber</i>	Venezuela	MOBR-C- 1532	-	GQ438770	-
<i>Thoe aspera</i>	Colombia (Caribbean)	ULLZ 9227	KF453136	KF453027	KF452947
<i>Thoe erosa</i>	Panama (Pacific)	ULLZ 9073	KF453128	KF453020	KF452939
<i>Thoe puella</i>	Florida, USA (Atlantic)	ULLZ 4533	KF453095	KF452992	KF452909
<i>Outgroups</i>					
<i>Libinia emarginata</i>	Louisiana, USA	ULLZ 10344	KF453078	KF452974	KF452896
<i>Libinia erinacea</i>	Florida, USA (Atlantic)	ULLZ 7747	KF453119	KF453011	KF452932

Table 3. Table with some characteristics of spermatozoa in genera studied for comparison. The perforatorial chamber morphology nomenclature was based on that of Clopton (2004).






Genus	Operculum	Inner acrosomal zone	Perforatorium
<i>Mithrax</i>	Thick	Dense and rounded	Rhomboid 
<i>Teleophrys</i>	Thick	Dense and rounded	Rhomboid 
<i>Omalacantha</i>	Thick	Dense and rounded	Deltoid 
<i>Mithraculus</i>	Slender	Thin and straight	Deltoid 
<i>Damithrax</i>	Slender	Dense and rounded	Deltoid 

Table 4. Pairwise genetic distance matrix of COI sequences among some genus of Mithracidae. Interspecific and intergeneric values are showed.

Values identified with “-” represent only one sequence for the genus.

Genus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1_<i>Ala</i>	-												
2_<i>Nonala</i>	10%	-											
3_<i>Nemausa</i>	8-11%	9-12%	9%										
4_<i>Damithrax</i>	8-12%	9-12%	11-12%	8-13%									
5_<i>Microphrys</i>	11%	10%	12%	13%	-								
6_<i>Omalacantha</i>	15-16%	13-14%	14-15%	14-15%	13%	14-15%							
7_<i>Mithrax</i>	13-16%	13-15%	14-17%	14-17%	12-16%	14-17%	15-18%						
8_<i>Teleophrys</i>	15%	14-16%	15-16%	16%	15-16%	16-18%	15-18%	12-15%					
9_<i>Hemus</i>	14-16%	14-15%	15-16%	14-15%	14-15%	15-17%	15-18%	15-17%	13%				
10_<i>Thoe</i>	14-15%	14-15%	16-17%	14-15%	13-14%	17-18%	15-20%	17-18%	16-18%	12-17%			
11_<i>Petramithrax</i>	15%	15%	15%	16%	14%	15-16%	15-17%	16-18%	15-19%	15-17%	-		
12_<i>Mithaculus</i>	12-15%	13-16%	14-17%	15-17%	12-15%	14-18%	14-19%	15-18%	16-19%	14-19%	15-16%	12-16%	
13_<i>Pitho</i>	14-16%	14-15%	15-17%	15-18%	11-14%	14-19%	15-19%	15-18%	17-19%	14-18%	17-19%	14-19%	11-14%

Table 5. Pairwise genetic distance matrix of 16S sequences among some genus of Mithracidae. Interspecific and intergeneric values are showed. Values identified with “-” represent only one sequence for the genus.

Genus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1_Ala	-												
2_Nonala	8%	-											
3_Nemausa	6-7%	8-12%	6%										
4_Damithrax	6-9%	9-12%	7-11%	5-9%									
5_Microphrys	11%	12-13%	8-12%	11-14%	-								
6_Omalacantha	13-15%	14-16%	11-16%	14-16%	15%	9-11%							
7_Mithrax	11-13%	13-15%	9-15%	11-15%	13-14%	12-14%	7-9%						
8_Teleophrys	12-15%	14-18%	12-18%	12-18%	15-19%	13-18%	12-18%	7-16%					
9_Hemus	16-18%	15-18%	13-19%	14-18%	14-18%	16-18%	14-18%	16-19%	12%				
10_Thoe	14-15%	14-15%	13-17%	14-17%	13-14%	15-16%	12-14%	15-17%	13-16%	9%			
11_Petramithrax	15%	15-16%	14-17%	15-17%	15%	17%	13-15%	15-19%	15-17%	13%	-		
12_Mithaculus	12-14%	13-16%	12-16%	13-17%	13-16%	15-17%	14-17%	13-19%	15-19%	13-18%	16-17%	7-12%	
13_Pitho	16-18%	17-19%	14-19%	14-19%	15-18%	15-19%	14-19%	16-21%	15-19%	16-19%	18-20%	16-19%	6-14%

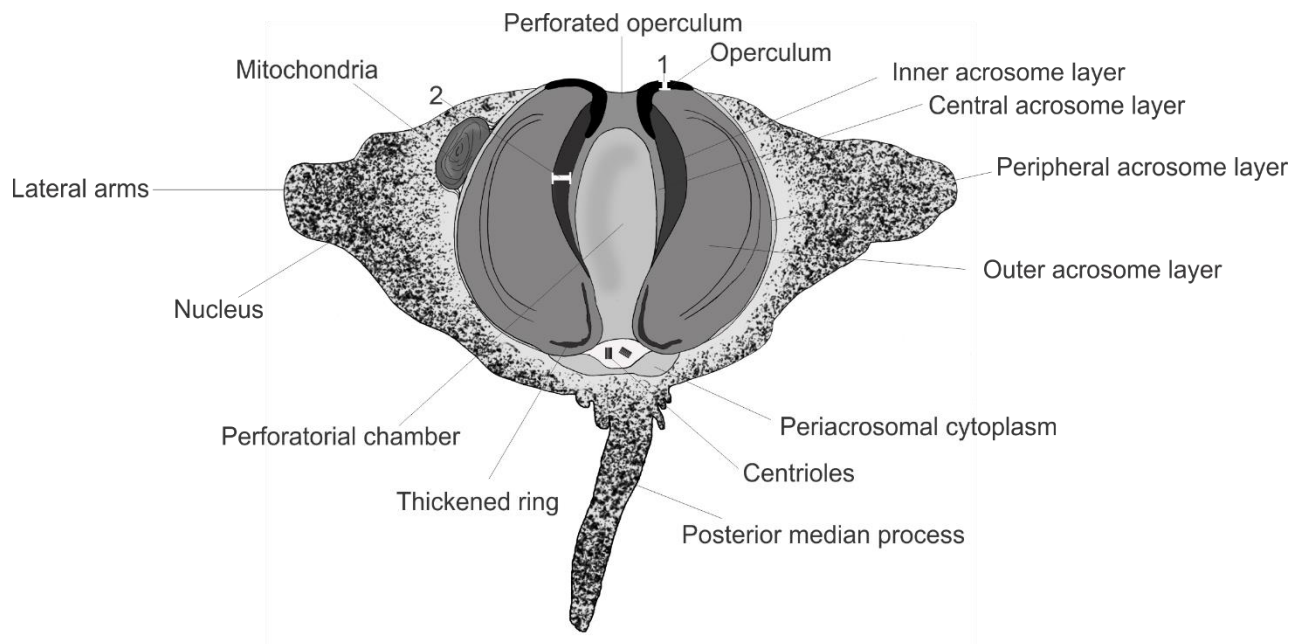


Figure 1. General spermatozoa diagram of Mithracidae. Numbers 1 and 2 represents the exactly point of measurements to the operculum and inner acrosomal layer respectively.

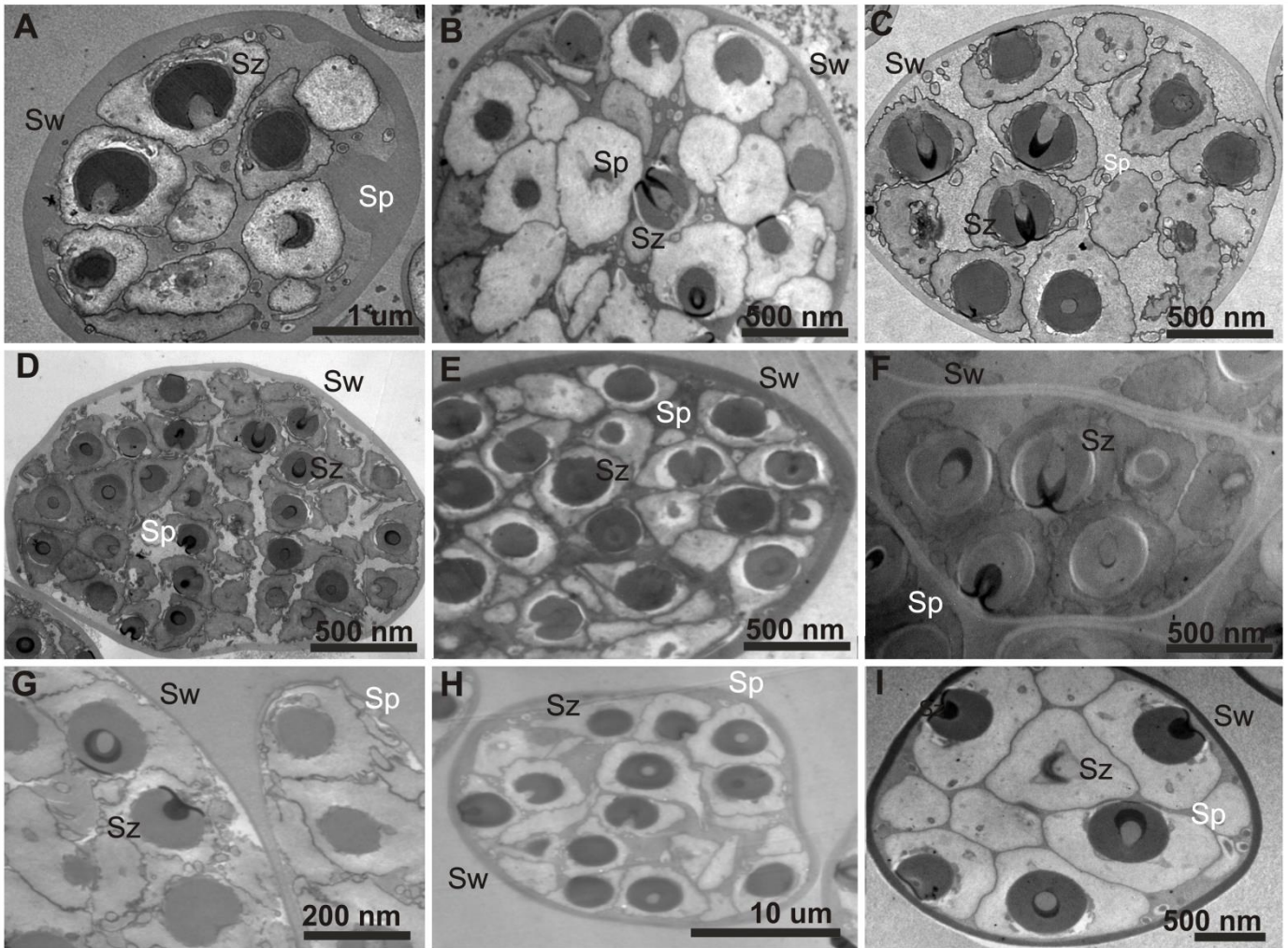


Figure 2. Spermatophore general view which varies from spherical to elongated - elliptical, thick-walled, granular and variable number of sperm. Sp = Spermatophore; Sz = Sperm; Sw = Spermatophore wall. **A:***Mithraculus sculptus*; **B:***Mithraculus coryphe*; **C:***Mithraculus forceps*; **D:***Damithrax tortugae*; **E:***Damithrax hispidus*; **F:***Mithrax hemphilli*; **G:***Mithrax aculeatus*; **H:***Omalacantha bicornuta*; **I:***Teleophrys ruber*.

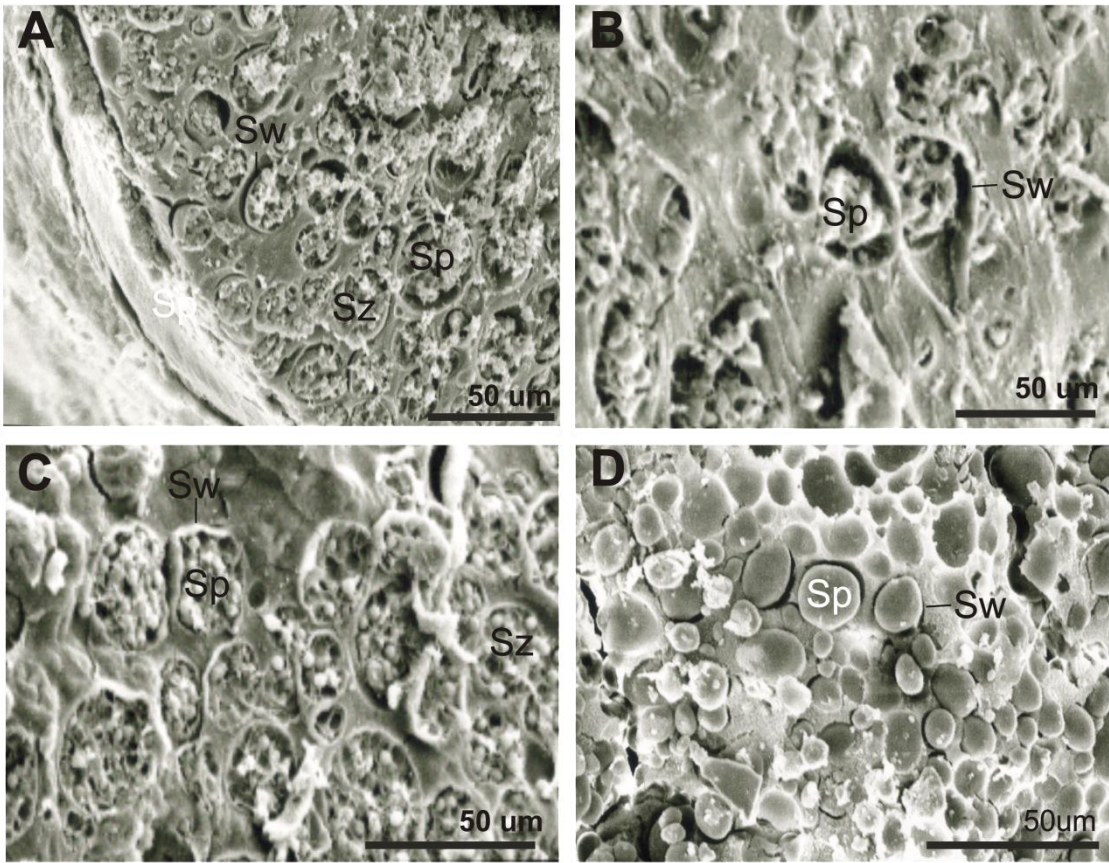


Figure 3. Spermatophores seen under a Scanning Electron Microscope showing that there is no difference in the morphology of the same in different genera. Sp = Spermatophore; Sz = Sperm; Sw = Spermatophore wall. **A:** *Damithrax hispidus*; **B:** *Mithrax aculetatus*; **C:** *Damithrax tortugae*; **D:** *Mithraculus coryphe*.

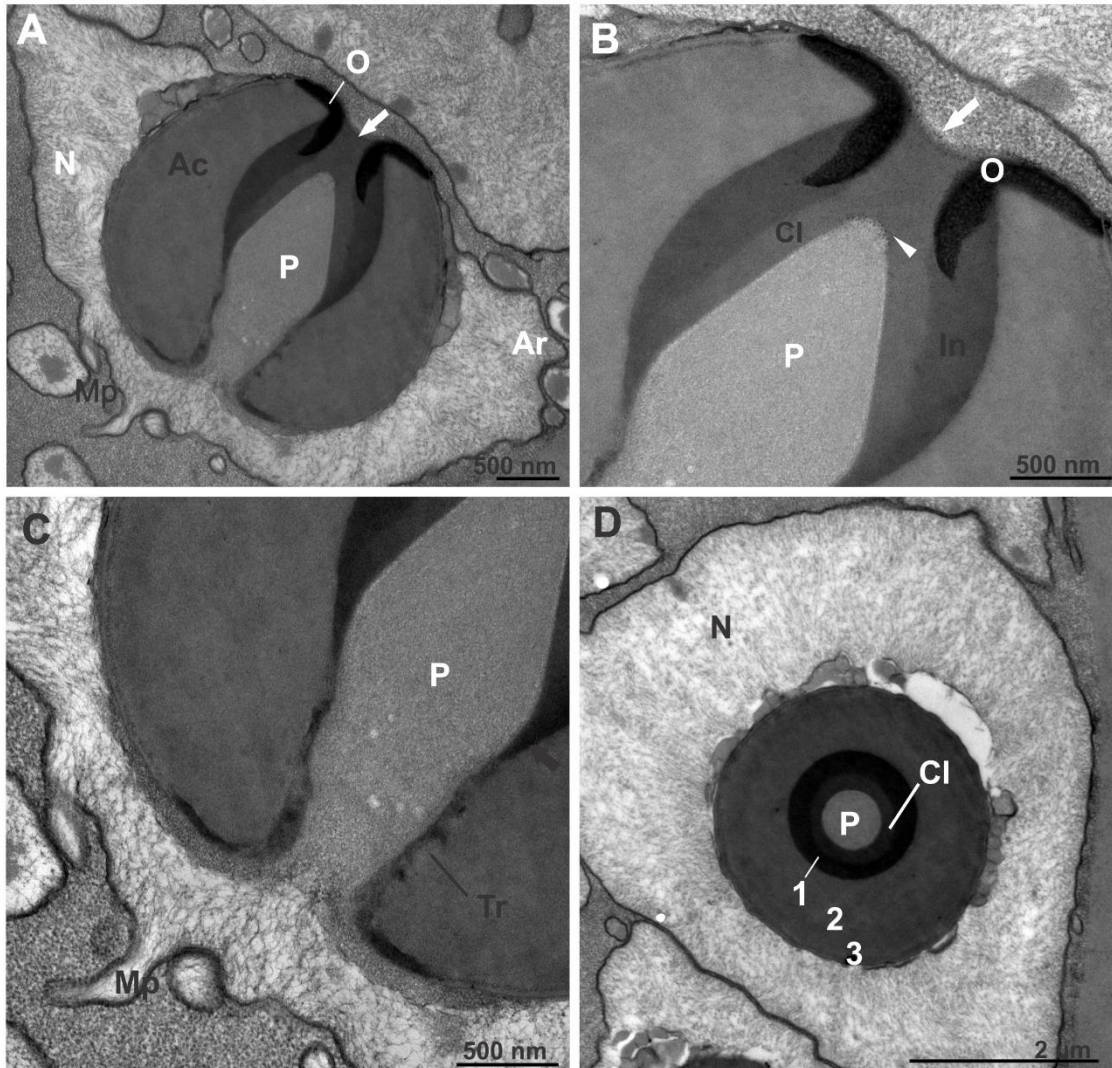


Figure 4. Ultrastructure of the spermatozoa of *Mithrax aculeatus*. **A:** Longitudinal section of the spermatozoon surrounded by the nucleus; showing a rhomboid perforatorial chamber with a rounded apex and the perforated operculum (white arrow). **B:** Thick, electron-dense operculum with a wide opening (white arrow), and with the apex of the perforatorial chamber (white arrowhead) just reaching the posterior edge of the down-turned operculum. The inner acrosomal layer is broad and rounded. **C:** Detail of perforatorial chamber base, which is narrow with a subtle angular expansion of the chamber width anterior to the thickened ring (black arrow). **D:** Transverse section showing the three concentric acrosomal layers (1, 2, and 3) and the central perforatorial chamber. Ac = acrosome, Ar = lateral arms; In = inner acrosomal layer; Mp = median-posterior process filled with microtubules; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Cl = central acrosome layer; Tr = thickened ring. White arrow = perforated operculum with large aperture; Head of white arrow = perforatorial chamber apex; Black arrow = perforatorial chamber widening anterior to the thickened ring.

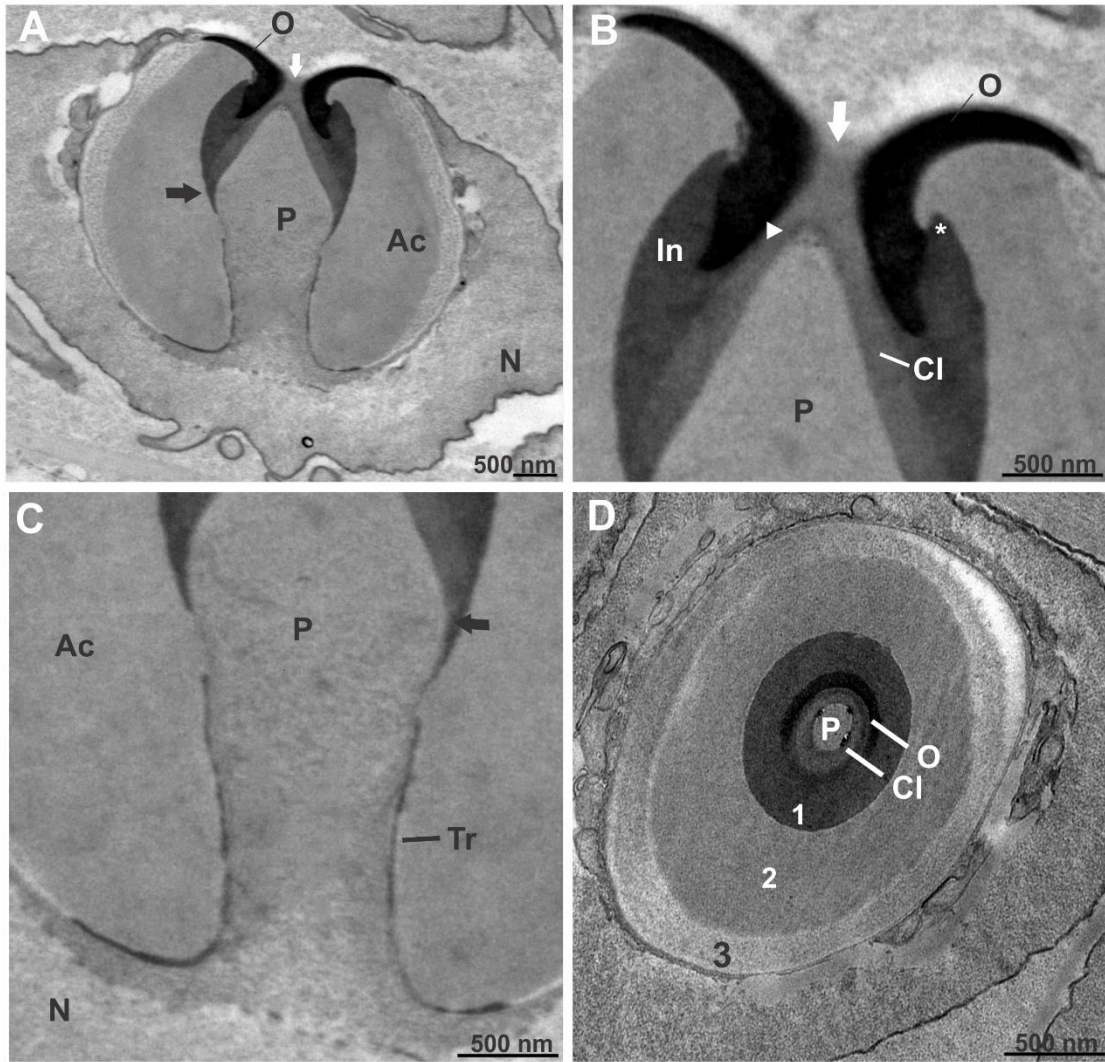


Figure 5. Ultrastructure of the spermatozoa of *Mithrax hemphilli*. **A:** General view of the spermatozoon in longitudinal section showing the acrosome almost completely encased by the cup-shaped nucleus with granular chromatin. The perforatorial chamber is the rhomboid type (black arrow) with a rounded apex and the operculum is perforated (white arrow). **B:** Detail of the electron-dense operculum perforated with a narrow opening (white arrow) with the perforatorial chamber apex protruding inside it (white arrowhead). The inner acrosomal layer is thick and has a rounded anterior projection at the point where it envelops the down-turned end of the operculum (white asterisk). **C:** The perforatorial chamber base is long and narrow, showing the obvious widening anterior to the thickened ring (black arrow). **D:** Spermatozoon in transverse section with three distinct concentric acrosomal layers (1, 2, 3) and the central perforatorial chamber. Ac = acrosome, In = inner acrosomal layer; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Cl = central acrosome layer; Tr = thickened ring. Black arrow = perforatorial chamber widening anterior to the thickened ring; White arrow = perforated operculum; Head of white arrow = perforatorial chamber apex; White asterisk = anterior projection of the inner layer.

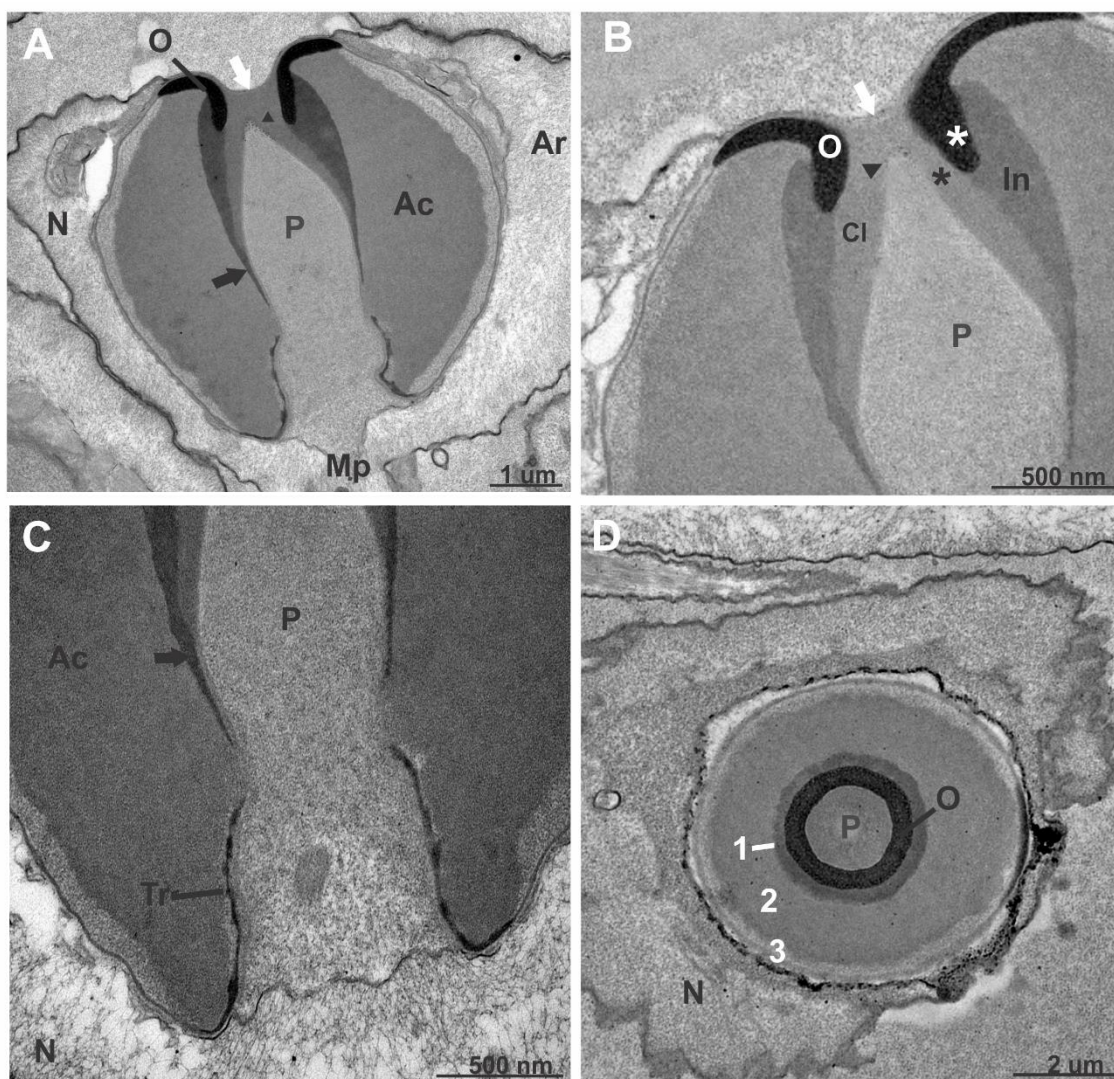


Figure 6. Ultrastructure of the spermatozoon of *Mithraculus sculptus*. **A:** Sagittal section showing the perforatorial chamber of the deltoid type (black arrow) with a tapered apex (black arrowhead) with the operculum perforated by a wide opening (white arrow). **B:** Detail of perforated operculum (white arrow) showing the posterior end of the curved operculum (white asterisk). The central acrosome layer is narrow (black asterisk) as the inner acrosomal layer, which is straight and thin. The apex of the perforatorial chamber (black arrowhead) reaches into the perforated operculum. **C:** Perforatorial chamber detail showing the curved region of the chamber wall anterior to the thickened ring (black arrow). **D:** Cross section of the spermatozoon showing the concentric layers of the acrosome (1, 2 and 3) and the perforatorial chamber. Ac = acrosome, Ar = lateral arms; In = inner acrosomal layer; Cl = central acrosome layer; Mp = median-posterior process filled with microtubules; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Tr = thickened ring. Black arrow = perforatorial chamber anterior to the thickened ring; White arrow = perforated operculum; Head arrow = perforatorial chamber apex.

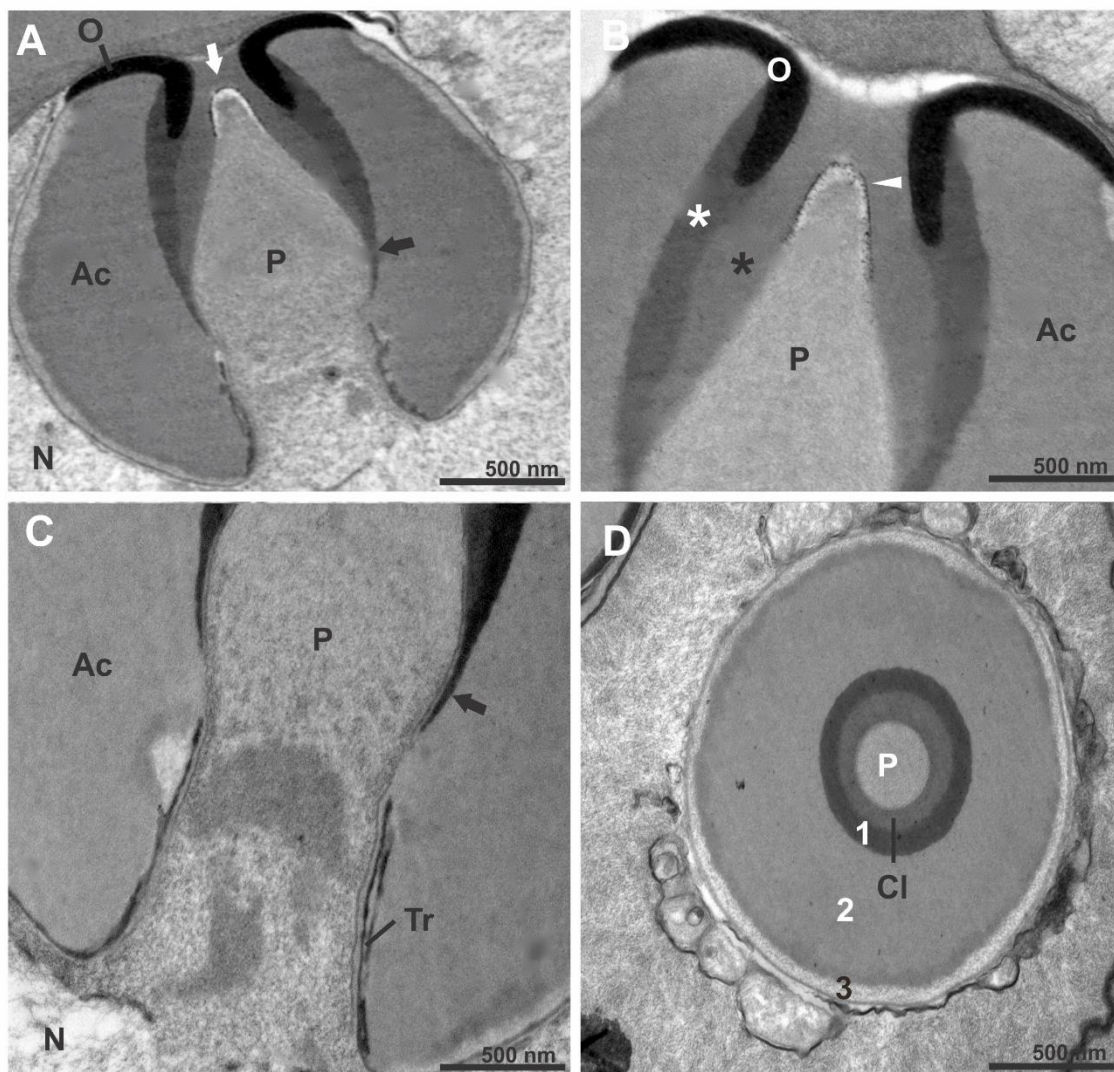


Figure 7. Ultrastructure of the spermatozoon of *Mithraculus coryphe*. **A:** General view of the spermatozoon with a deltoid type of perforatorial chamber (black arrow), with a wide opercular opening (white arrow). **B:** The perforatorial chamber has a rounded apex (arrowhead) surpassing the posterior edge of the down-turned operculum (white asterisk). The central layer (black asterisk) has the same width as the adjacent inner acrosome layer (1) (white asterisk). **C:** Basal region of the perforatorial chamber showing the long thickened ring, and the curving tapered posterior edge of the inner acrosome layer (black arrow). **D:** Acrosome vesicle cross-section with three distinct concentric layers (1, 2 and 3) exterior to the perforatorial chamber and the central acrosome layer. Ac = acrosome, Ar = lateral arms; In = inner acrosomal layer; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Cl = central acrosome layer; Tr = thickened ring. Black arrow = perforatorial chamber anterior to the thickened ring; White arrow = perforated operculum; Head arrow = perforatorial chamber apex, White asterisk = operculum; Black asterisk = central acrosome layer.

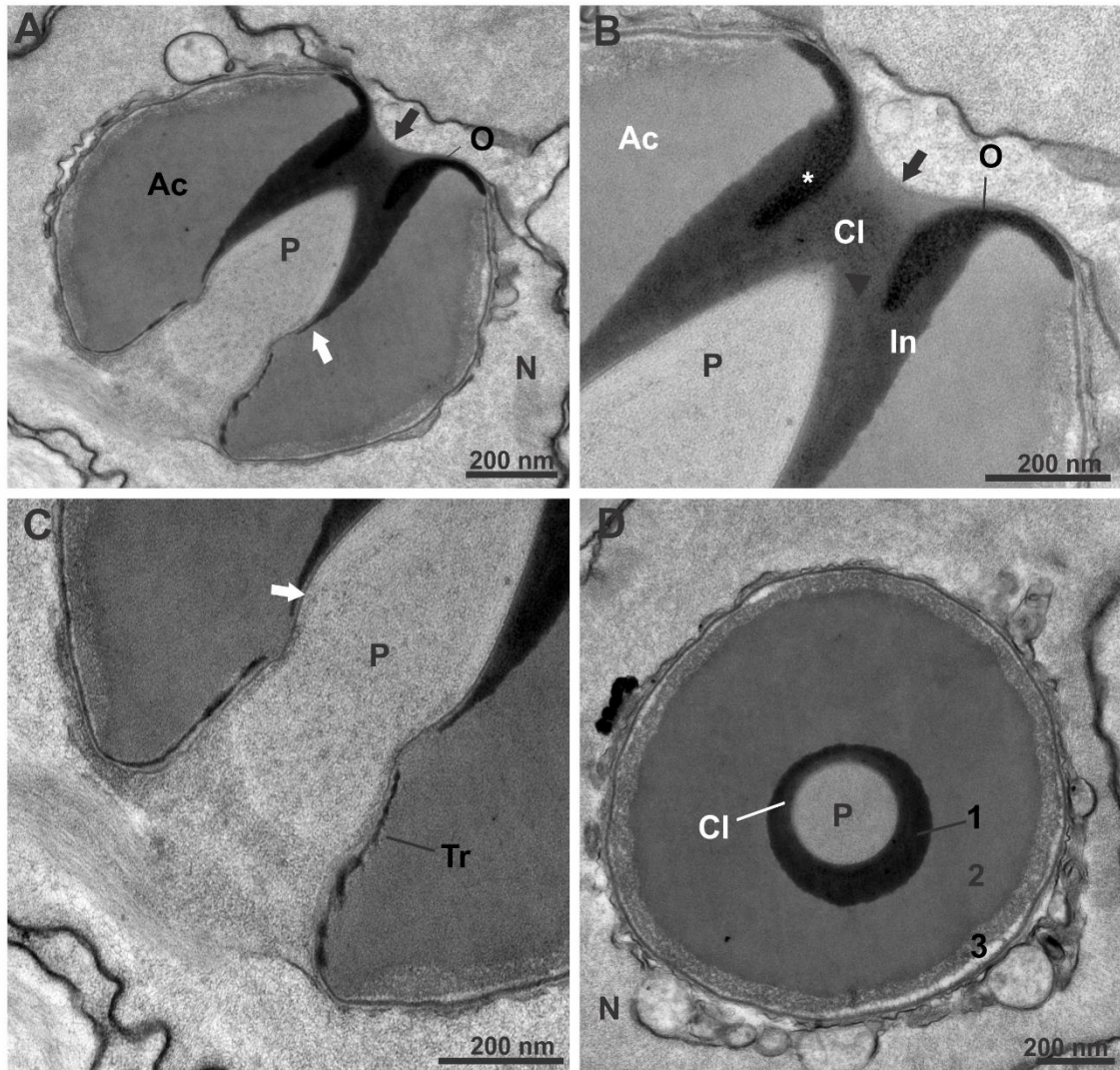


Figure 8. Ultrastructure of the spermatozoon of *Mithraculus forceps*. **A.** Electron micrograph of the spermatozoon showing the nucleus with granular chromatin and the acrosome vesicle. There is also a deltoid type perforatorial chamber (white arrow) and a perforated operculum with a wide opening (black arrow). **B.** Operculum with the down-turned projection into the acrosome vesicle, which is narrow, long and straight (white asterisk), a granular central acrosome layer (black asterisk) which thinly envelopes the perforatorial chamber apex (arrowhead). **C.** The basal region of the perforatorial chamber with a curved chamber wall anterior to the thickened ring (white arrow). **D.** The four concentric layers (Cl, 1, 2 and 3) of the acrosome vesicle are clearly visible. Ac = acrosome, In = inner acrosomal layer; N = Nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Cl = central acrosome layer; Tr = thickened ring. White arrow = perforatorial chamber anterior to the thickened ring; Black arrow = perforated operculum; Head arrow = perforatorial chamber apex, White asterisk = inside of the operculum in the acrosome; Black asterisk = central acrosome layer

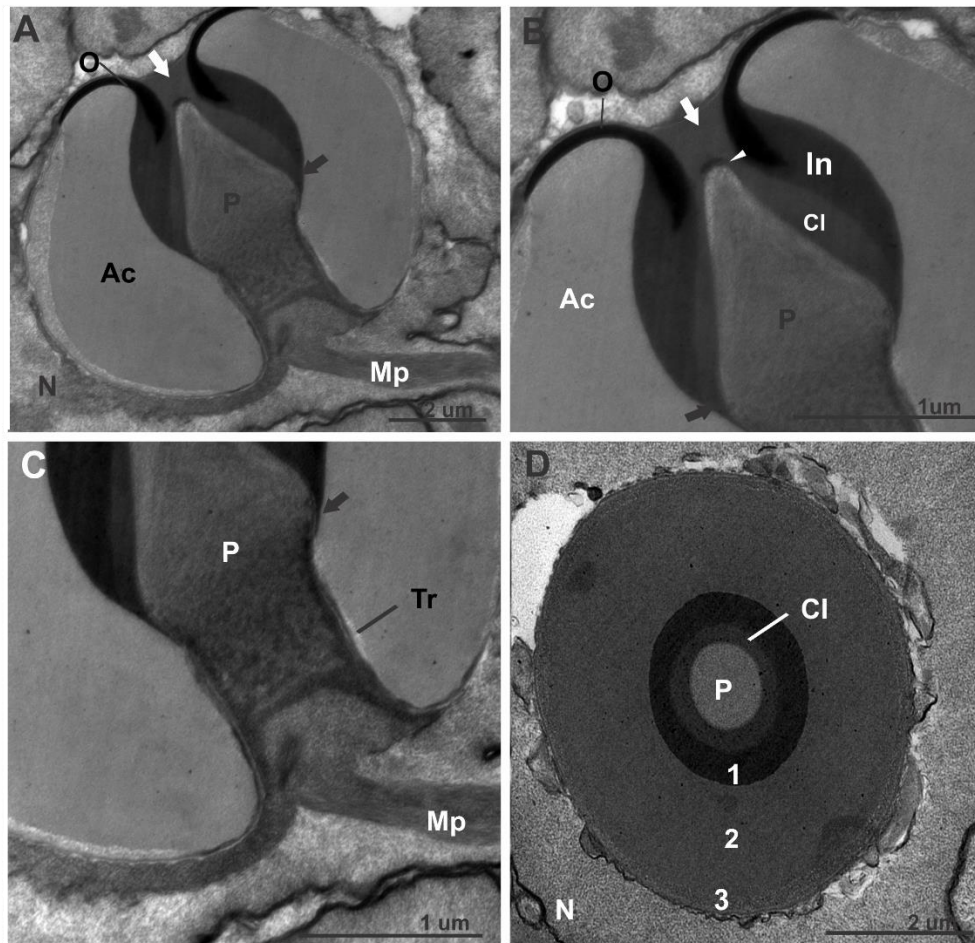


Figure 9. Ultrastructure of the spermatozoon of *Damithrax hispidus*. **A:** General appearance of the spermatozoon in longitudinal section showing the acrosome vesicle surrounded almost completely by the nucleus with granular chromatin, a deltoid type perforatorial chamber (black arrow) with a slightly rounded apex and a perforated operculum (white arrow) and median-posterior process filled with microtubules. **B:** Detail of the electron-dense operculum, with a narrow opening (white arrow) and the perforatorial chamber apex reaching into it (white arrowhead). The inner acrosome layer which is rounded and broad has a larger width than the subjacent subopercular region. **C:** The perforatorial chamber base is wide and short, with a markedly rounded lateral enlargement (black arrow) anterior to the thickened ring. **D:** Sperm cell cross-section with multiple concentric layers (Cl, 1, 2 and 3) and the central perforatorial chamber. Ac = acrosome; In = inner acrosomal layer; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Mp: median-posterior process filled with microtubules; Cl = central acrosome layer; Tr = thickened ring. Black arrow = perforatorial chamber anterior to the thickened ring; White arrow = perforated operculum; Head arrow = perforatorial chamber apex; White asterisk = inner acrosomal layer; Black asterisk = central acrosome layer.

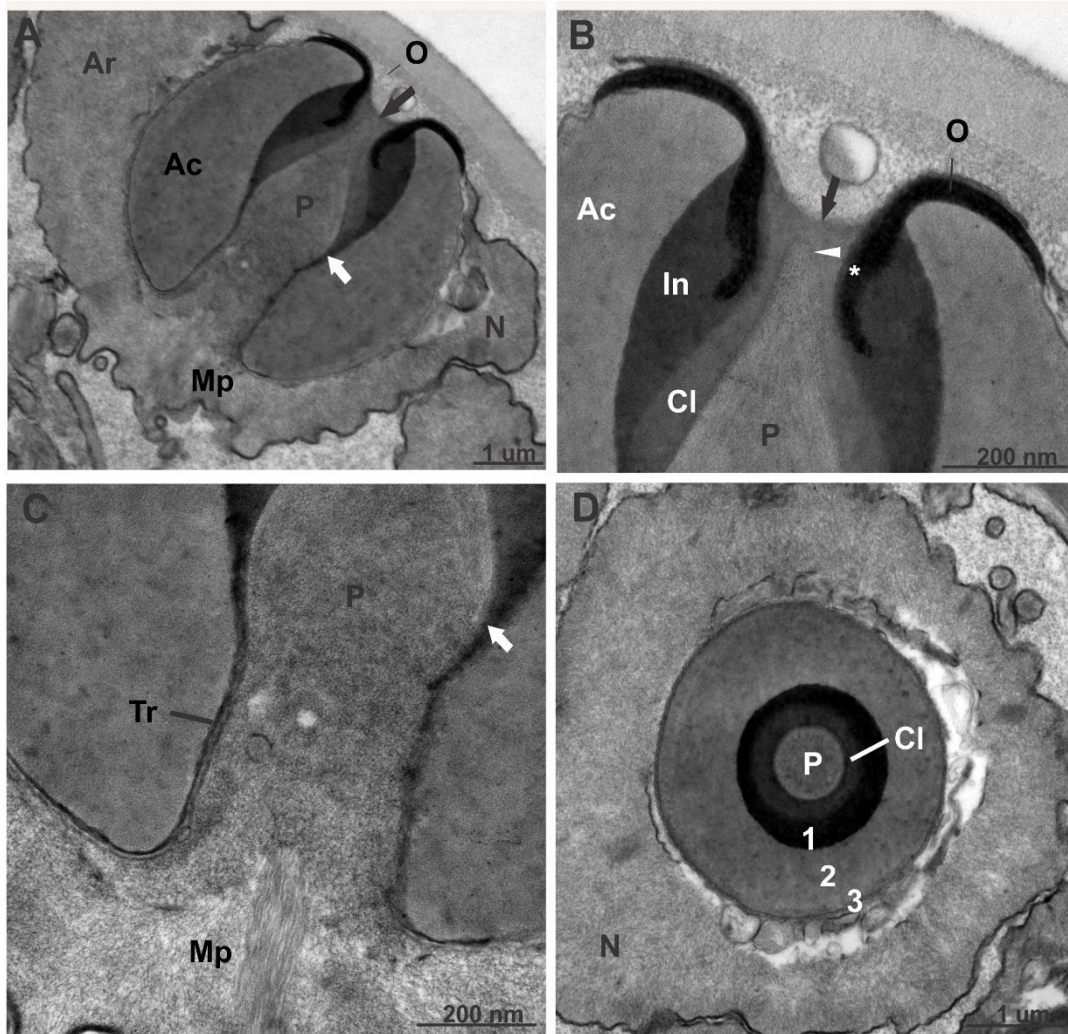


Figure 10. Ultrastructure of the spermatozoon of *Damithrax tortugae*. **A.** Sagittal section showing the spermatozoal acrosome vesicle, surrounded by a large nucleus with granular chromatin. The perforatorial chamber is the deltoid type (white arrow), with a wide and long base and the operculum is perforated with a wide opening (black arrow). **B.** Acrosomal detail showing a thick, down-turned operculum (white asterisk). It is obvious that the central acrosome layer is smaller in width than the inner acrosomal layer which is large and rounded. The slightly rounded apex of the perforatorial chamber (arrowhead) extends into the large aperture of the perforated operculum (black arrow). **C.** Detail of the base of the perforatorial chamber showing the thin thickened ring and the deltoid shape of the chamber wall (white arrow). **D.** Cross section of the acrosome vesicle showing the pattern of concentric layers (Cl, 1, 2, and 3). Ac = acrosome vesicle, Ar = lateral arms; In = inner acrosomal layer; Mp = median-posterior process filled with microtubules; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Cl = central acrosome layer; Tr = thickened ring. white arrow = perforatorial chamber wall anterior to the thickened ring; black arrow = perforated operculum; arrow head= perforatorial chamber apex; White asterisk = inner portion of the down-turned operculum inside the acrosome vesicle.

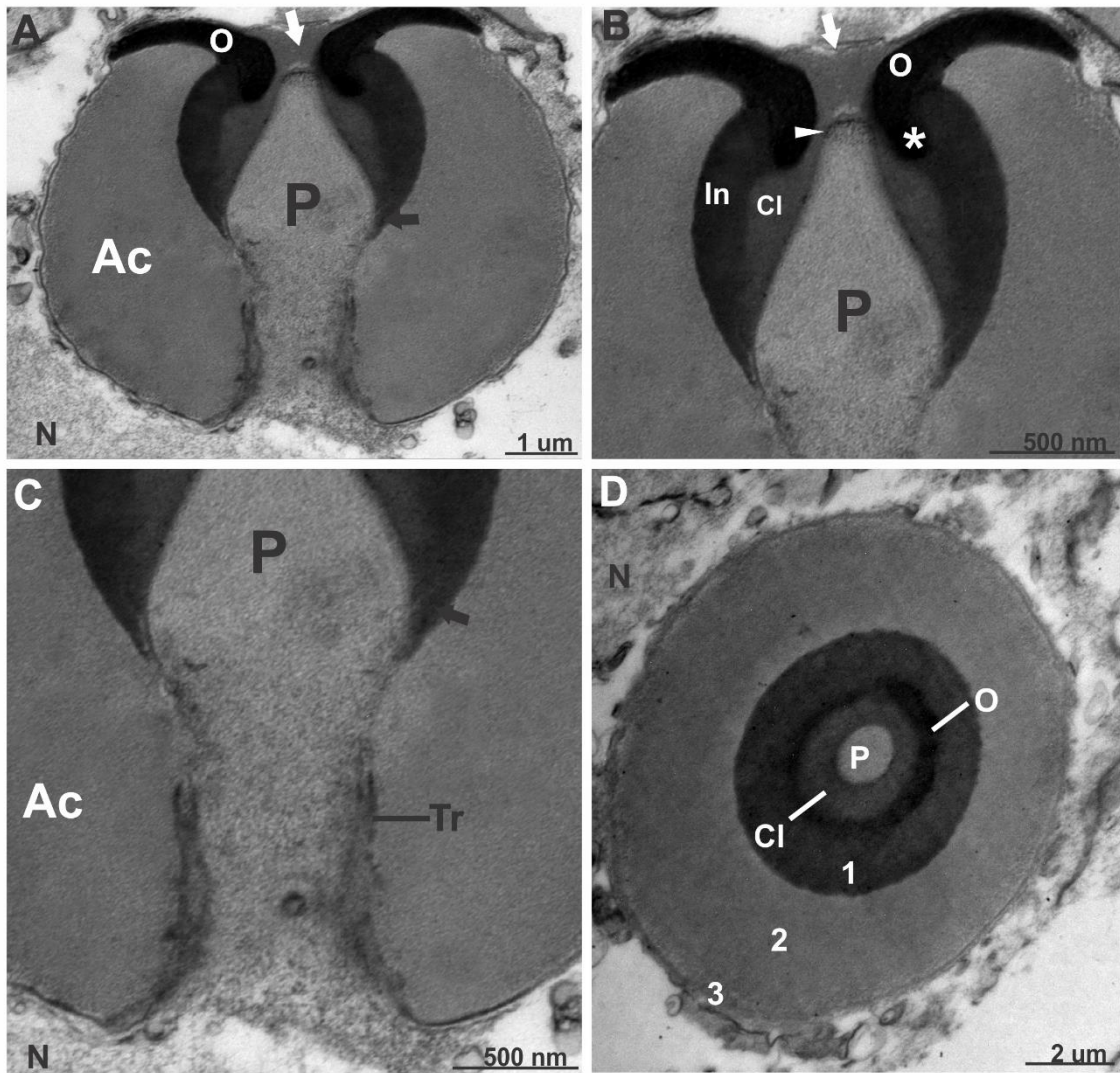


Figure 11. Ultrastructure of the spermatozoon of *Omalacantha bicornuta*. **A:** Electron micrograph of a spermatozoon with a deltoid type of perforatorial chamber (black arrow) and a perforated operculum with a narrow opening (white arrow). **B.** Operculum with the down-turned internal projection into the acrosome vesicle (white asterisk) and a thin central acrosome layer surrounding the thin and tapered apex of the perforatorial chamber (arrowhead). The inner acrosomal layer vesicle is large and rounded and lies exterior to the central acrosome layer. **C.** The basal region of the perforatorial chamber is narrow and long and has a sharp bend in the chamber wall anterior to the thickened ring (black arrow). **D.** The three concentric acrosome layers (1, 2 and 3) are clearly visible external to the operculum, central acrosome layer and the central perforatorial chamber. Ac = acrosome, In = inner acrosomal layer; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Cl = central acrosome layer; Tr = thickened ring. Black arrow = perforatorial chamber wall anterior to the thickened ring; White arrow = perforated operculum; Head arrow = perforatorial chamber apex.

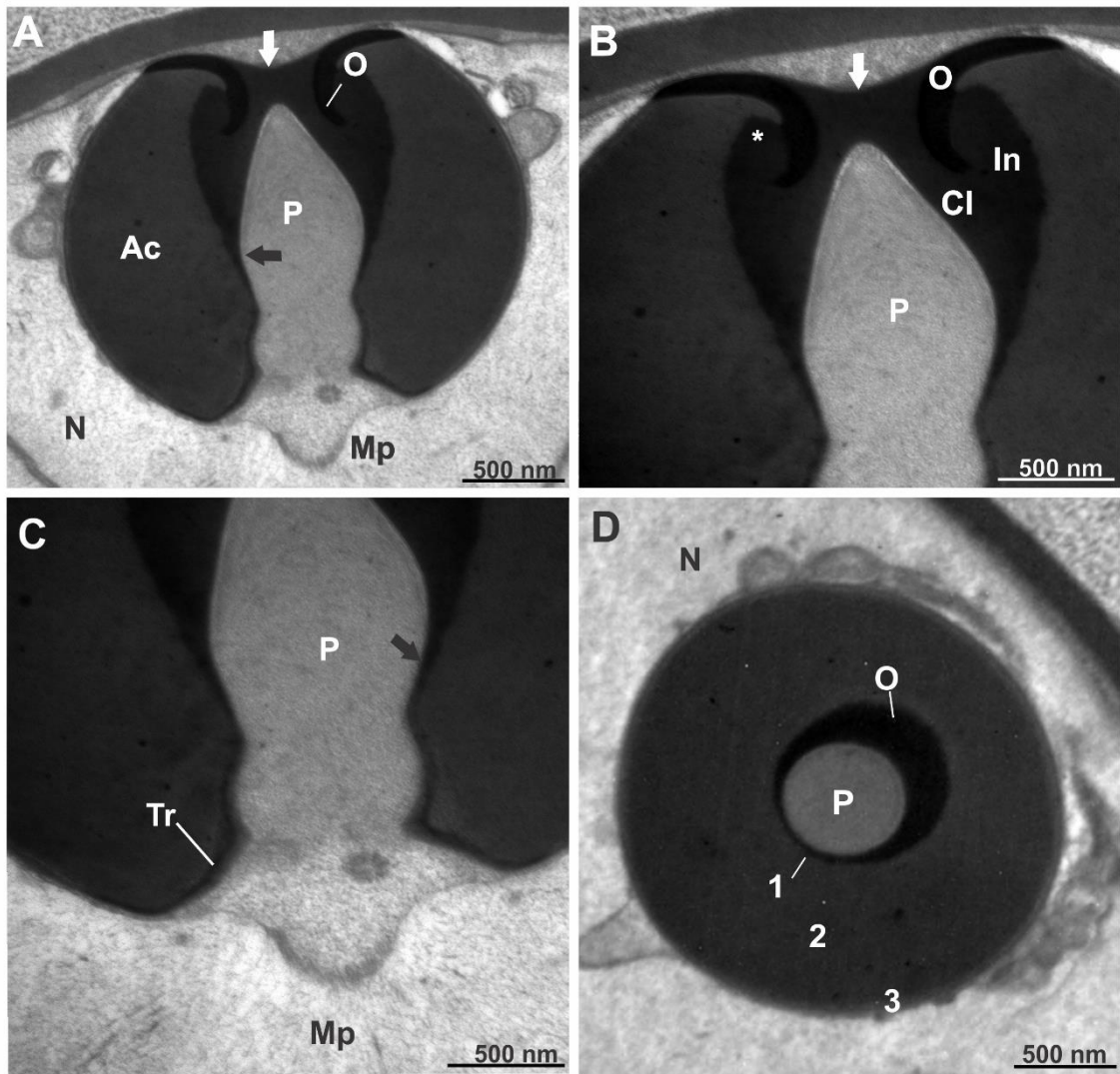


Figure 12. Ultrastructure of the spermatozoon of *Teleophrys ruber*. **A.** Longitudinal section of the acrosome vesicle surrounded by nucleus, showing a rhomboid perforatorial chamber with a rounded apex and a perforated operculum (white arrow). **B.** An electron-dense operculum with a wide opening (white arrow), with the apex of the perforatorial chamber (white arrowhead) surpassing the posterior edge of the down-turned operculum. The inner layer of acrosome is large and rounded and envelopes the posterior edge of the operculum (white asterisk). **C.** Detail of the base of the perforatorial chamber, which is wide, short and shallowly undulating, with a slightly angular expansion anterior to the thickened ring (black arrow). **D:** Cross section showing concentric layers (1, 2, and 3) and central perforatorial chamber. Ac = acrosome, In = inner acrosomal layer; Mp = median-posterior process filled with microtubules; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Cl = central acrosome layer; Tr = thickened ring. Black arrow = perforatorial chamber anterior to thickened ring; White arrow = perforated operculum with wide aperture; Head of white arrow = perforatorial chamber apex.

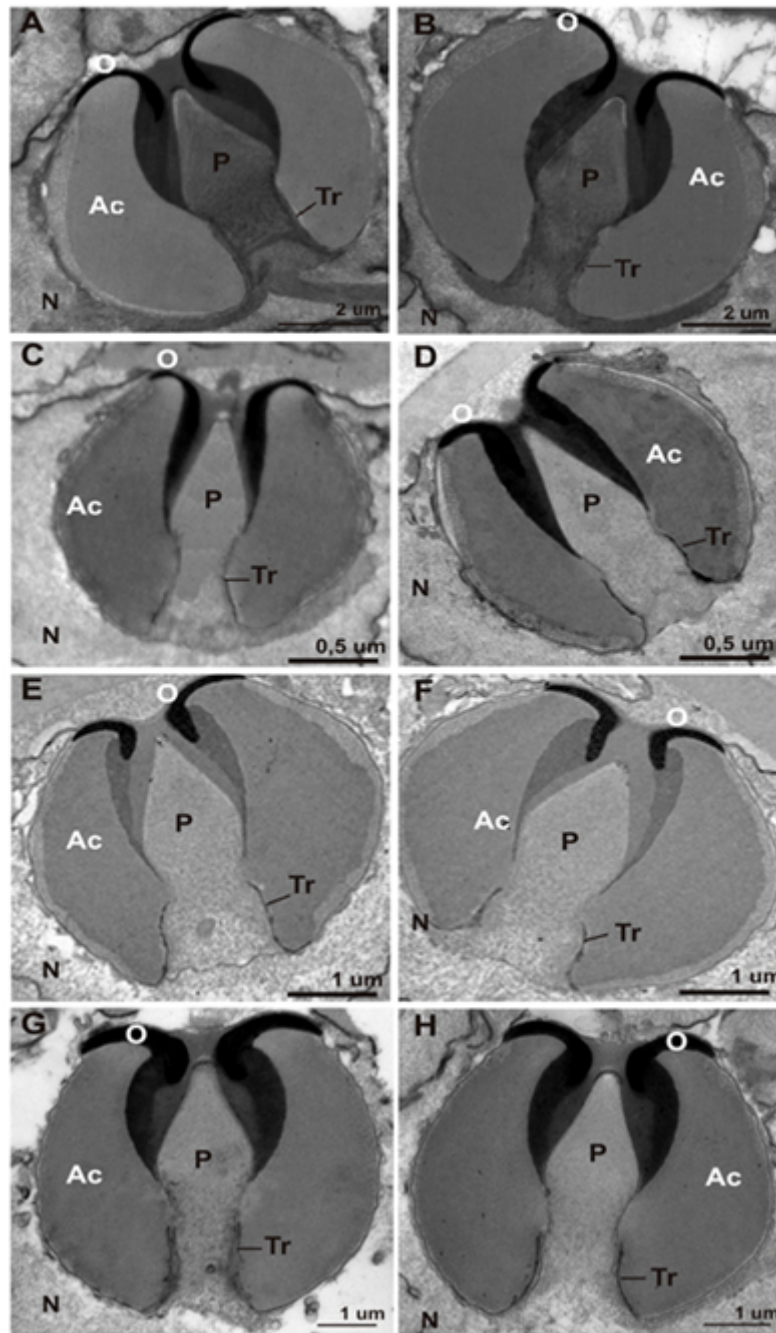


Figure 13. Ultrastructure of the sperm of specimens from Venezuela and Brazil showing that there are no differences in sperm morphology despite being in different locations. Ac = acrosome; N = nucleus; O = operculum; P = *perforatorium*; Tr = thickened ring. **A:** *Damithrax hispidus* (Venezuela); **B:** *Damithrax hispidus* (Brazil); **C:** *Mithraculus forceps* (Venezuela); **D:** *Mithraculus forceps* (Brazil); **E:** *Mithraculus sculptus* (Venezuela); **F:** *Mithraculus sculptus* (Brazil); **G:** *Omalacantha bicornuta* (Venezuela); **H:** *Omalacantha bicornuta* (Brazil).

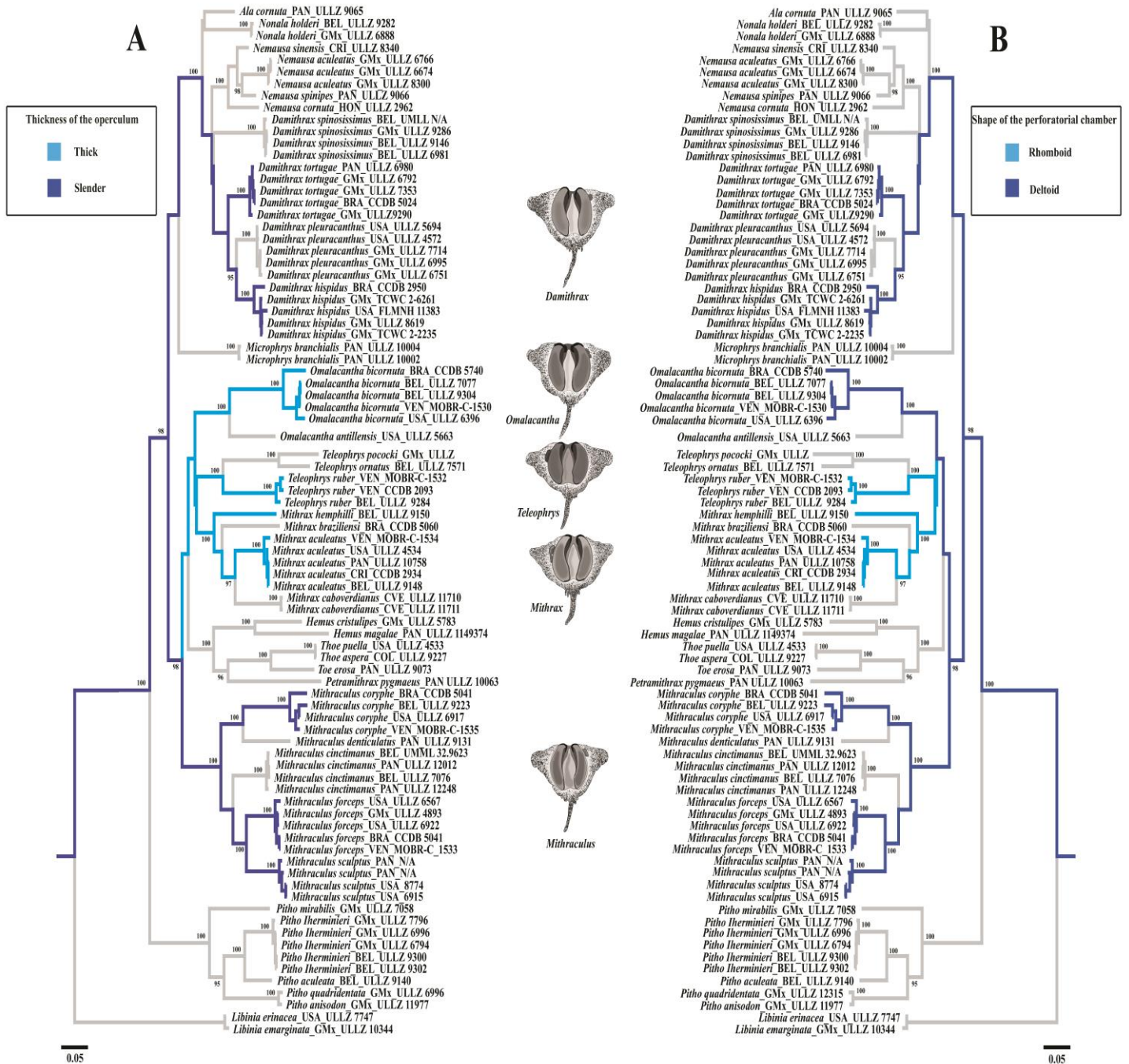


Figure 14. Mapping of the morphological character 1 (thickness of operculum – A) and of the morphological character 2 (shape of the perforatorial chamber – B) traced onto the topology obtained by Bayesian inference analyses of the combined molecular data (12S, 16S and COI). Values represent Bayesian (BAY) posterior probabilities, expressed as percentages. BAY values $\leq 95\%$ are not shown. Gray branches = no morphological information. Draws of the sperms by J. Pantaleão, modified from Tudge et al., (2014). Collection abbreviations include CCDB: Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia, FFCLRP/USP; MOBR: Museo Oceanológico Hermano

Benigno Roman, Estación de Investigaciones Marinas de Margarita, Fundación La Salle de Ciencias Naturales; ULLZ: University of Louisiana at Lafayette Zoological Collection; UMML: University of Miami Marine Laboratories, Rosenstiel School of Marine Science; TCWC: Texas Cooperative Wildlife Collection, College Station. BEL-Belize; BRA-Brazil; CRI-Costa Rica; CVE-Cabo Verde; HON-Honduras; PAN-Panama; VEN-Venezuela. GMx-Gulf of Mexico;

Capítulo II

Receptáculo seminal em Mithracidae: Caracterização morfológica e histoquímica de *Damithrax hispidus*, *Omalacantha bicornuta* e *Mithraculus forceps* (Brachyura).

Camila Assugeni & Fernando José Zara

**Receptáculo seminal em Mithracidae: caracterização morfológica e
histoquímica de *Damithrax hispidus*, *Omalacantha bicornuta* e *Mithraculus
forceps* (Brachyura)**

Camila Assugeni¹ & Fernando José Zara¹

¹ Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML), Departamento de Biologia Aplicada, Univ. Estadual Paulista (UNESP), FCAV, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Via de acesso “Prof. Paulo Donato Castellane”, S/N – Zona Rural. 14881-900 - Jaboticabal, SP, Brasil.

*Correspondence to: camila.assugeni@gmail.com

Tel: +55(16) 3209-7195

Resumo

Majoidea é um dos grupos de caranguejo com maior registro de competição espermática pela formação de estratos espermáticos no interior do receptáculo seminal (RS). Neste trabalho examinamos a anatomia e a histoquímica do receptáculo seminal de fêmeas com ovário em vitelogênese de *Damithrax hispidus*, *Omalacantha bicornuta* e *Mithraculus forceps* com intuito de verificar ou não a ocorrência de competição espermática. Os espécimes foram coletados por meio de mergulho autônomo, posteriormente foram dissecadas e as amostras processadas conforme rotina histológica para histoquímica. Para as três espécies de Mithracidae, o RS é dividido em duas regiões: a região de origem mesodérmica (dorsal) que consiste de um epitélio estratificado com células em descamação que caracteriza secreção do tipo holócrina. A região ectodérmica (ventral) é composta por um epitélio cúbico simples recoberto por uma cutícula. O oviduto abre-se na mesoderme em posição ventral, próximo à região de transição, formada por epitélio prismático, com cutícula. Esta região de transição mostra dobras mais acentuadas na face oposta ao oviduto, que podem auxiliar na fertilização devido à presença de musculatura externa. A vagina, contínua com a região ventral possui as mesmas características epiteliais cúbicas e simples. No lúmen do RS das espécies estudadas foram observadas massas espermáticas em formato circular lembrando espermatóforos coenospérmicos. O RS do tipo ventral seguiu o padrão mais comum encontrado em

Majoidea, sendo a secreção produzida no receptáculo composta de glicoproteínas, com polissacarídeos neutros. Os polissacarídeos ácidos, com provável função contra microorganismos, é proveniente do fluido seminal masculino. No RS das três espécies, não foram encontrados estratos espermáticos em fêmeas com ovários vitelogênicos. Desta maneira, não pode-se inferir se estas fêmeas recebem material de mais de um macho e, caso aconteça, no momento da fertilização não ocorre a preferência de uso dos espermatozoides de um macho em relação a outro.

Palavras-Chave: Majoidea, competição espermática, histologia, Caranguejo-aranha.

Introdução

Entre os Brachyura se encontra a superfamília Majoidea a qual é considerada um dos clados mais ricos em diversidade de espécies, principalmente no tocante a família Mithracidae, pois seus representantes são caracterizados por apresentar grande diversidade de cor, morfologia corpórea, habitats e história de vida (Baeza *et al.*, 2010; Windsor & Felder, 2014). Estes caranguejos aranha possuem carapaça mais larga do que longa em formato oval com quatro ou três espinhos nas margens antero-lateral ou na órbita frontal (Rathbun, 1925; Windsor & Felder, 2014). Os membros desta família ocorrem em ambientes tropicais e subtropicais, em recifes de coral e partículas grossas que variam desde o intertidal até maiores profundidades (Melo, 1996; Baeza *et al.*, 2010; Windsor & Felder, 2014). Com base em uma ampla revisão molecular e taxonômica Windsor & Felder (2014) elevaram a subfamília Mithracinae ao status de família, como previamente já havia sido proposto por Garth (1858). Ainda com base nesta última revisão a espécie *Mithrax hispidus* (Herbst, 1790) passou para o gênero *Damithrax* Windsor & Felder, 2014, ficando então como *Damithrax hispidus* (Herbst, 1790) e a espécie *Microphrys bicornutus* (Latreille, 1825) foi realocada no ressuscitado gênero *Omalacantha* Streets, 1871. As espécies que ocorrem no Pacífico permaneceram como *M. bicornutus* e as espécies do Atlântico passaram a *Omalacantha bicornuta* (Latreille, 1825).

Nas fêmeas de Brachyura, o esperma proveniente do macho pode ser estocado em uma porção modificada do ducto genital, o receptáculo seminal (RS) ou em uma invaginação do exoesqueleto, sem ligação com o ducto genital, a espermateca (Hartnoll, 1968; Krol *et al.*, 1992; Guinot & Quenette, 2005; McLay & López-Greco, 2011). Os Podotrematas possuem espermateca, estrutura de origem ectodérmica e que não possui ligação com o oviduto, o que é considerado uma sinapomorfia que distingue estes caranguejos dos Eubrachyura que possuem receptáculo seminal, o qual se conecta diretamente ao oviduto (Guinot & Tavares, 2001; McLay & López-Greco, 2011). Nos Eubrachyura, o RS tem a função de armazenar os espermatozoides e espermatóforos após a cópula, sendo esta estrutura de origem ecto-mesodérmica. A porção mesodérmica do RS constitui a região dorsal ligada ao ovário através do oviduto. A região ventral é ectodérmica, por tanto recoberta por cutícula e esta é contínua à vagina, a qual se abre na abertura genital ou vulva (Hartnoll, 1968; McLay & López-Greco, 2011; Zara, *et al.*, 2014). Diesel (1991) classificou o RS em dois tipos: dorsal e ventral. No tipo dorsal a abertura do oviduto encontra-se numa posição relativamente dorsal ao

RS estando assim oposta à abertura da vagina. O tipo ventral tem como característica apresentar o oviduto e a vagina próximos um ao outro, sendo portanto, o oviduto posicionado ventralmente. Recentemente, um outro tipo, o intermediário foi proposto, demonstrando que a abertura do oviduto no receptáculo seminal encontra-se entre os extremos dorso-ventral (McLay & López-Greco, 2011; Gonzáles - Pisani *et al.*, 2012; Guinot *et al.*, 2013). Uma estrutura acessório de armazenamento de esperma chamada bursa foi descrita para alguns Brachyura (Jensen *et al.*, 1996; Jensen & Bentzen, 2012). Tal estrutura se localiza entre a abertura genital e o receptáculo seminal e se abre para a vagina (Jensen *et al.*, 1996; Jensen & Bentzen, 2012). Uma variação na morfologia do RS foi descrita para a espécie *Dorippe sinica* Chen, 1980 na qual o oviduto não se conecta diretamente ao RS, mas possui uma abertura direta próxima a vagina. (Hayer *et al.*, 2016).

Em Majoidea o tipo ventral de RS é o mais comum, porém o tipo intermediário de receptáculo seminal foi observado, em algumas espécies, tais como *Macrocoeloma trispinosum* (Latreille, 1825), *O. bicornuta* (como *Microphrys bicornutus* em McLay & López-Greco, 20011), *Mithraculus fórceps* A. Milne-Edwards, 1875, *Libinia spinosa* Guérin, 1832 e *Leurocyclus tuberculatus* (H. Milne Edwards & Lucas, 1842) (McLay & López-Greco, 2011; Gonzalez-Pisani *et al.*, 2012). O receptáculo seminal é uma estrutura chave para entendimento dos mecanismos reprodutivos, uma vez que o ejaculado de diferentes machos é armazenado em seu interior. Assim, a organização deste órgão com relação à abertura do oviduto e a vagina têm diferentes implicações sobre qual espermatozoide será utilizado na fertilização dos ovócitos, principalmente para Majoidea. Em espécies com a presença de estratos ou pacotes espermáticos, a posição do oviduto pode ser crucial para a competição espermática (Diesel, 1989; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998). Porém, para as espécies que apresentam “plug” espermático, esta condição de competição espermática, como previsto por Parker (1970), pode ser reduzida ou ausente, como ocorre para os caranguejos formadores de plug Portunidae e Cancridae (Hartnoll, 1969; Jensen & Bentzen, 2012; Zara *et al.*, 2014).

Neste trabalho descrevemos a anatomia e histologia do RS para três diferentes gêneros de Mithracidae buscando verificar evidências de competição espermática para estes Majoidea e, adicionalmente caracterizar as secreções luminiais quanto à presença de polissacarídeos e proteínas.

Material e métodos

Fêmeas adultas de *D. hispidus*, *Mi. forceps* e *O. bicornuta* foram coletados por meio de mergulho autônomo e livre em Ubatuba, São Paulo Brasil (Latitude:-23.433671 e Longitude:-45.083853). A identificação dos animais foi realizada com base nas descrições de Wagner (1990), Melo (1996) e Windsor & Felder (2014). Foram obtidos pelo menos três exemplares de cada espécie, os quais foram mensurados quanto ao tamanho da carapaça (CC), utilizando-se um paquímetro digital (0,01 mm). As fêmeas foram classificadas macroscopicamente com relação ao estágio ovariano e neste trabalho só foram tomadas amostras de fêmeas com ovários em vitelogênese secundária, entre os estagios em desenvolvimento e maduro.

Os caranguejos foram anestesiados por resfriamento, e seus órgãos foram dissecados e fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 7,4), por no mínimo 24hs.

Para a análise macroscópica, durante a fixação os RS foram fotografados sob estereomicroscópio Leica M205C imersos em solução fixadora.

Para análise histológica após a fixação, os RS foram lavados no mesmo tampão, desidratados em série alcoólica (50-95%), embebidas e incluídas em resina glico-metacrilato Leica®, segundo rotina indicada pelo fabricante.

Após a polimerização os blocos histológicos foram cortados em micrótomo rotativo, com corte possuindo a espessura de 5 a 7µm, os quais foram recolhidos em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina para descrição morfológica de acordo com Junqueira & Junqueira (1983), seguindo as modificações propostas por Sant'Anna et al. (2010). Para a análise histoquímica, os cortes de RS foram corados com a técnica do xylidine Ponceau (Melo & Vidal, 1980) para proteínas, PAS para polissacarídeos neutros, azul de Alcian para os ácidos e a técnica conjugada PAS/azul de Alcian para determinar a preponderância de um tipo de polissacarídeo em detrimento de outro, segundo protocolo proposto por Junqueira & Junqueira (1983).

Resultados

Anatomia

A anatomia do sistema reprodutor feminino para os três gêneros aqui analisados mostra um mesmo padrão de inserção do ovário ao receptáculo seminal. A conexão do

oviduto ao RS é do tipo ventral excêntrica ao tubo que corresponde à vagina (Fig. 1A - C). O oviduto é branco leitoso e aparentemente preenchido por células (Fig. 1E e F). A vagina mostra externamente forte musculatura longitudinal em apenas umas das margens sendo esta inserida na região ventral do RS na margem oposta da abertura do oviduto (Fig. 1G). A outra extremidade desta musculatura esta aderida ao exoesqueleto do externo. A vagina abre-se na vulva a qual tem a abertura em formato elíptico recoberto por uma fina camada cuticular, o opérculo (Fig. 1D).

Histologia

Ao microscópio de luz nota-se que o receptáculo seminal para os três gêneros aqui estudados é piriforme apresentando duas regiões distintas: a dorsal e a ventral contínua com a vagina (Fig. 2A-C). A região dorsal é caracterizada pela presença de um epitélio estratificado que delimita o lúmen do RS, formando a camada densa (Fig. 2D-F). Esta camada encontra-se recoberta por tecido conjuntivo, o qual é delgado e apresenta espaços hemais, com hemócitos (Fig. 2D-F). A região basal da camada densa, junto ao tecido conjuntivo apresenta células em divisão e nos estratos mais superiores células com núcleo variando de arredondado a elíptico (Fig. 2D-F). As células mais apicais da camada densa encontram-se em processo de descamação. Tais células possuem núcleos extremamente compactos e citoplasma basófilo (Fig. 2D-F).

A inserção do oviduto ocorre na margem posterior ventral da região dorsal, sendo este o ponto de contato com o RS, caracterizado pela presença de um tampão de células com núcleos arredondados e o citoplasma marcado pela presença de vesículas lícidas, devido à presença de uma grande gota lipídica (Fig. 2G-H). Este região de inserção ocorre exatamente antes da transição do epitélio dorsal e o epitélio ventral, o qual é recoberto por cutícula (Fig. 2I). Neste local de transição nota-se várias dobras, as quais são mais acentuadas no lado oposto a abertura do oviduto, e não formam pregas que progridem para o interior do lúmen (Fig. 2A). Em maiores aumentos percebe-se que a transição é abrupta sendo a região ventral caracterizada pelo epitélio colunar com núcleos elípticos e basais recobertos por espessa camada de cutícula (Fig. 3A-C). Semelhante ao epitélio dorsal, o epitélio ventral também encontra-se recoberto por camada de tecido conjuntivo (Fig. 3A e B) Este epitélio é cubico simples, recoberto por cutícula e, conectado ao conjuntivo adjacente, notam-se feixes de fibras musculares em uma das margens, exatamente em oposição às dobras da região de transição (Fig. 3C). A vagina, também composta por epitélio cúbico simples, é recoberto por espessa camada

de cutícula (Fig. 3C e D). Abaixo do epitélio cúbico encontra-se camada de tecido conjuntivo ligada a ela, em uma só face e nota-se a inserção das fibras musculares que também alcançam a região ventral do RS (Fig. 3C e D). O lúmen do receptáculo seminal mostra espermatozoides em massas circulares relembrando espermatóforos, com ausência de parede (Fig. 3E e F) e sem a presença de estratos ou pacotes espermáticos (Fig. 2A-C). A secreção luminal em todas as espécies apresentou a mesma composição química, sendo intensamente reativa para polissacarídeos neutros (Fig. 3G) e ácidos (Fig. 3H) e que quando da aplicação desta técnica conjugada notou-se a predominância de polissacarídeos ácidos junto aos espermatozoides e espermatóforos (Fig. 3J). Porém ao analisarmos o epitélio dorsal, este somente apresentou reação intensamente positiva para polissacarídeos neutros (Fig. 3G) e proteínas (Fig. 3K) nos estratos apicais da camada densa, exatamente onde se encontram as células em descamação, sendo que tais células não apresentam reação para polissacarídeos ácidos (Fig. 3I). Por sua vez, as regiões mais basais da camada densa mostraram reação positiva ao PAS no córtex celular ou no espaço intercelular em *Mi. forceps* (Fig. 3G).

Discussão

O RS nas espécies *D. hispidus*, *Mi. forceps* e *O. bicornuta* segue o padrão observado em Majoidea, classificado como tipo ventral (Hartnoll, 1969; Beninger *et al.*, 1988; Diesel, 1991; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998; Sal Moyano *et al.*, 2009; McLay & López-Greco 2011; González-Pisani *et al.*, 2012; Antunes *et al.*, 2016). Este tipo de RS é o mais comum em espécies que copulam com o exoesqueleto rígido, o que já foi descrito para a espécie *O. bicornuta* (como *M. bicornutus* em Hartnoll, 1965) (Willians, 1984). Em observações de campo, *D. hispidus* e *M. forceps* foram observados em cópula, sendo a fêmea t em condição de intermuda (Zara, dados de campo). Segundo Diesel (1989, 1991) e Antunes *et al.* (2016), em espécies com a presença de pacotes espermáticos e RS ventral, o último macho a copular com a fêmea será provavelmente o que terá maior sucesso em fertilizar ovócitos. Apesar de ambos autores terem trabalho com majoideos, tal proposição não pode ser aqui aplicada, uma vez que, em nenhuma das espécies aqui estudadas, foi encontrada a presença de pacotes ou estratos espermáticos. Tendo em vista que neste estudo foram somente utilizadas fêmeas em vitelogênese, com ovários em estágio macroscópicos classificados como em desenvolvimento e maduro, se tais estratos ocorreram pela cópula com mais de um macho, as secreções do RS acabaram por misturar o material genético transformando-o

em uma só massa. Por outro lado, não foi possível excluir a probabilidade de que tais fêmeas tenham copulado com um só macho, porém em nenhum momento foi detectado qualquer sinal de plug espermático semelhante ao observado em Portunidae e Cancridae (Jensen *et al.*, 2012; Zara *et al.*, 2014).

Neste trabalho foi observado por meio da histologia que a inserção do oviduto no RS ocorre próximo a transição entre a região dorsal e ventral, em todas as espécies estudadas. Assim, classificamos como ventral, sendo que a espécie *D. hispidus* corrobora com o que foi descrito por McLay & López Greco (2011). Entretanto, *O. bicornuta* e *M. forceps* foram classificados como RS intermediário pelos últimos autores. Talvez, esta classificação tenha sido proposta com base na anatomia macroscópica. Assim, podemos concluir que a histologia do RS é crucial para a classificação, principalmente em tipos intermediários. A região ventral pode estender-se excentricamente, levando a anatomia refletir em uma abertura intermediária do oviduto, que por meio da histologia, constata-se que esta é na verdade no limite ventral, onde inicia-se a parte ectodérmica do RS. Na conexão do RS, o oviduto está preenchido por células com núcleos ovais e citoplasma apresentando grandes vesículas lícidas que armazenam lipídeos. Estas células formam um tampão na região de abertura do oviduto. Este tipo de tampão celular lipídico foi descrito para *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788), relembrando o tecido tipo válvula observado também em *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853 (Lee & Yamazaki, 1990; Antunes *et al.*, 2016). Este tampão parece funcionar de maneira semelhante ao proposto para os Pinnotheridae onde as secreções seriam liberadas no momento da ovulação (Becker *et al.*, 2011). Desta maneira, a liberação da secreção abriria o canal do oviduto e, ao mesmo tempo funcionaria como uma barreira que previne a entrada dos espermatozoides no oviduto em Mithracidae. Para Pinnotheridae as células desta região liberariam sua secreção de forma holócrina (Becker *et al.*, 2011), porém neste trabalho nos parece ser mais razoável que o mecanismo seja apócrino, sendo o restante das células necessário para a manutenção do contato do oviduto ao receptáculo, o que poderia desaparecer caso a célula como um todo fosse descamada.

Em Brachyura o receptáculo seminal é dividido em região dorsal e ventral (Diesel *et al.*, 1989; Lopez-Greco *et al.*, 2009) e possui formato de “saco piriforme” em *Damithrax hispidus*, *Mi. forceps* e *O. bicornuta* assim como já foi descrito para outros Majoidea (Beninger 1988; González-Pisani *et al.*, 2012). Becker *et al.* (2011) sugere que a região dorsal localizada no ápice do receptáculo seminal é utilizada como área de

armazenamento dos espermatozoides e a área ventral é chamada de área de fertilização, com a vagina adjacente. A parte dorsal do RS em Mithracidae forma um epitélio estratificado e glandular, com células sendo liberadas por mecanismo holócrino. Este é o padrão descrito para várias espécies em diferentes famílias de majoídeos (Hartnoll, 1968; Beninger *et al.*, 1998; González Gurriarán *et al.*, 1998; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998; González-Pisani & López Greco, 2007; Sal Moyano *et al.*, 2009; González-Pisani, 2012), Leucosiidae (Hayer *et al.*, 2015) Portunidae (Spalding, 1942; Ryan, 1967; Zara *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2016), Ucididae (Santana *et al.*, 2007); Eriphidae (Souza *et al.*, 2016). O epitélio dorsal do RS pode ser simples como descrito para Menippidae (Souza *et al.*, 2016); Ocypodidae (Lopez-Greco *et al.*, 2009; Lautenschlager *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2016), Pinnotheridae (Becker *et al.*, 2011), Varunidae (Lee & Yamazaki, 1990), Grapsidae (Souza *et al.*, 2016). Assim, ao que parece, as famílias mais próximas filogeneticamente apresentam o mesmo tipo de epitélio dorsal, parecendo ser o estratificado padrão para Majoidea. A atividade secretora do epitélio dorsal está relacionada à produção de glicoproteínas com polissacarídeos neutros, os quais atuam na manutenção dos espermatozoides (Anilkumar *et al.*, 1996; Diesel, 1989; Anilkumar *et al.*, 1999). Os polissacarídeos ácidos não são produzidos pela fêmea, sendo então transferidos através do fluido seminal masculino, cuja função provável seja antibacteriana, como proposto para *Scylla serrata* (Forskål, 1775) (Jayasankar & Subramoniam, 1999).

Nas espécies estudadas o epitélio da região de transição mostra dobras, mais acentuadas em uma das faces, não existindo a estrutura de velum, descrito para outros Majoidea, como *Inachus phalangius* (Fabricius, 1775) ou *Libinia spinosa* Guérin, 1832 (Diesel 1991; González-Pisani *et al.*, 2012). A presença de dobras parece ser tão comum quanto velum em Majoidea (para revisão ver Antunes *et al.* 2016), sendo que nossos resultados acrescentam mais três espécies com dobras, sendo todos pertencentes a Mithracidae. Tal aspecto parecer ser uma tendência de que cada família apresente um tipo de estrutura (dobra ou velum), como observado na comparação de Antunes *et al.*, (2016). Contudo, tal colocação deve ser considerada com cautela devido aos poucos estudos realizados com RS em Majoidea, comparada a diversidade do grupo (Ng *et al.*, 2008). De acordo com Sainte-Marie & Sainte-Marie (1998) estas dobras na região de transição guiam os ejaculados diretamente para a região da vagina, o que tende a favorecer a fertilização pelo macho mais recente, já que conduzem os ovócitos para o pacote espermático do último macho. Porém, esta função não pode ser considerada para

Mithracidae, os quais não apresentam pacotes espermáticos. A vagina do tipo côncava, a qual também recebe a musculatura na mesma face que as dobras da região de transição, parece favorecer a ampliação do lúmen do RS durante a ovulação. Desta maneira, o RS funcionaria como uma grande câmara de fertilização. Assim, tanto o RS como a vagina são controlados pela fêmea, tanto na cópula quanto na ovulação, o que sugere que as fêmeas não são passivas durante a cópula e desova (Hartnoll 1968; González-Pisani *et al.*, 2012).

No lúmen do receptáculo seminal notam-se espermatozóides livres ou aglomerados em massas circulares, lembrando espermatóforos, porém sem a parede. Este mesmo padrão foi observado nos RS de fêmeas maduras de *Stenorhynchus seticornis* (Antunes *et al.*, 2016). Assim como estes autores últimos propuseram, nos Mithracidae aqui estudados, os espermatóforos sofrem deiscência, logo após o acasalamento, sendo armazenados livres. Desta maneira, estes espermatozóides, somados a características do RS são gastos ou a maior parte em cada desova, o que pode ser um indicativo de que a fêmea tenha vários eventos de acasalamento após cada ovulação, como foi sugerido para *L. spinosa* e *L. tuberculatus* (González-Pisani *et al.*, 2012)

Em conclusão, a anatomia e histoquímica do RS para *D. hispidus*, *Mi. forceps* e *O. bicornuta* indicam ausência de competição espermática, por meio de estratégias já conhecidas para outros Majoidea. Desta maneira, se as fêmeas das espécies estudadas copulam com mais de um macho, o material genético deles encontra-se misturado no RS e provavelmente são usados de maneira aleatória durante o processo de fertilização, quando o órgão de estocagem torna-se uma ampla câmara de fertilização.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior - CAPES - Ciências do Mar II (# 1989 / 2014-23038.004309 / 2014-51, # 2005/2014 - 23038.004308 / 2014-14 e # 23038.004310 / 2014-85) pela bolsa de mestrado de CA. O presente estudo faz parte do projeto CNPq (Universal # 486337 / 2013-8) concedido a FJZ. Ao Laboratório IML pelo suporte em materiais e físico. Agradecimentos adicionais a Márcia F. Mataqueiro pelo suporte técnico. Este estudo foi conduzido de acordo com as leis brasileiras (Licença Permanente FJZ - MMA SisBio # 34587-1).

Referências

- Anilkumar G, Sudha K, Anitha E, Subramoniam T. Aspects of sperm metabolism in the spermatheca of the brachyuran crab *Metopograpsus messor* (Forska °1). *Journal of Crustacean Biology*. 1996, 16,310–314.
- Anilkumar G, Sudha K, Subramoniam T. Spermatophore transfer and sperm structure in the Brachyuran crab *Metopograpsus messor* (Decapoda: grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*. 1999, 19, 361-370 p.
- Antunes M, Zara FJ, Lopéz – Greco LS, Negreiros-Fransozo ML. Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea. *Invertebrate Biology*. 2016, 1-12.
- Baeza JA, Bolaños JA, Fuentes S, Hernandez JE, Lira C, Lopez R. Molecular phylogeny of enigmatic Caribbean spider crabs from the *Mithrax–Mithraculus* species complex (Brachyura: Majidae: Mithracinae): ecological diversity and a formal test of genera monophyly. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2010, 90, 851–858.
- Becker C, Brandis D, Storch V. Morphology of the female reproductive system of European Pea crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae). *Journal of morphology*. 2011, 272, 12–26.
- Beninger PG, Elnor RW, Foyle TP, Odense PH. Functional anatomy of the male reproductive system and female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *Journal of Crustacean Biology*. 1988, 322-332.
- Diesel R. Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *Journal of Crustacean Biology*. 1989, 9,266–277.
- Diesel R. Sperm competition and mating behaviour in Brachyura. In: Bauer RT, Martin JW, editors. *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, New York, NY. 1991, pp. 145–163.
- Garth JS. Brachyura of the Pacific coast of America: Oxyrhyncha. *Allan Hancock Pacific Expeditions*. 1958, 21, 1-499.

- Gonzalez-Gurriaran E, Fernandez L, & Muino R. 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*. 1988, 220 : 269–285.
- González-Pisani X, López Greco LS. Estructura de la espermateca del cangrejo araña *Leurocyclustuberculosis*(Majoidea). In: *Proceedings of the XII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, Florianópolis, Brasil*. 2007. April, pp. 14–17
- González-Pisani X, Barón P, López - Greco LS. 2012. Functional anatomy of the female reproductive systems of two spider crabs (Decapoda, Majoidea). *Invertebrate Biology*. 2011.131:61–74.
- Guinot D, Tavares MS. Une nouvelle famille de crabes du Cretace, et la notion de Podotremata Guinot, 1977 (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Zoosystema*. 2001, 23, 507–546.
- Guinot D, Quenette G. The spermatheca in Podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implications. *Zoosystema*. 2005, 27, 267–342.
- Guinot D, Tavares M, Castro P. Significance of the sexual openings and supplementary structures on the phylogeny of brachyuran crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura), with new nomina for higherranked podotreme taxa. *Zootaxa*. 2013, 3665, 1–414.
- Hartnoll RG. Notes on the marine grapsid crabs of Jamaica. *Proc. Linn. Soc. Lond*. 1965, 176, 113–147.
- Hartnoll RG. Morphology of the genital ducts in female crabs. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 1968, 47,279–300.
- Hartnoll RG. Mating in the Brachyura. *Crustaceana*. 1969, 16, 161–181.
- Hayer S, Köhnka S, Boretiusb S, Dirk B. Ever more complex: a new type of organization of reproductive organs in female *Dorippe sinica* Chen, 1980 (Decapoda: Brachyura: Dorippidae). *Zoology*. 2016.
- Jensen PC, Orensanz JM, Armstrong DA. Structures of the female reproductive tract in the Dungeness Crab (*Cancer magister*) and implications for the mating system. *Biological Bulletin*. 1996, 190, n. 3, p. 336-349.
- Jensen PC, Bentzen P. A molecular dissection of the mating system of the Dungeness crab, *Metacarcinus magister* (Brachyura: Cancridae). *Journal of Crustacean Biology*. 2012, 3: 443–456.

- Jayasankar V, Subramoniam T. Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 1999, 236, 253–259
- Junqueira LCU, Junqueira LMMS. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. Instituto de Ciências Biomédicas e Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. Editora Santos. 1983. 1.ed. 123p.
- Krol RM, Hawkins WE, Overstreet RM. Reproductive components. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. 1992. vol. 10, Humes AG & Harrison FW, eds., pp. 295–343. Wiley-Liss, New York.
- Lautenschlager AD, Brandis D, Storch V. Morphology and function of the reproductive system of representatives of the genus *Uca*. *Journal of Morphology*. 2010. 271, 1281–1299.
- Lee TH, Yamazaki F. Structure and function of a special tissue in the female genital ducts of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis*. *The Biological Bulletin* 1990, 178, 94–100.
- López-Greco LS, Fransozo V, Negreiros-Fransozo ML, Santos D. Morphology of the seminal receptacles of *Ocypode quadrata* (Brachyura, Ocypodoidea) in a comparative approach within Eubrachyura. *Zootaxa*. 2009, 2106, 41–50.
- McLay CL & López-Greco LS. A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: how did a race to be first become a race to be last? *Zoologischer Anzeiger*. 2011, 250, 378–406.
- Melo GAS. *Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro*. São Paulo, Plêiade/Fapesp. 1996. 604p.
- Mello MSL, Vidal BC. *Práticas de Biologia Celular*. Edgar Blucher-FUNCAMP, São Paulo. 1980.
- Ng PKL, Guinot D, Davie PJF. Systema Brachyuros: Part I. an annotated checklist of extant Brachyuran crabs of the world. *Raffles Bulletin of Zoology*. 2008, 17, 1–286.
- Rathbun MJ. The spider crabs of America. *Bulletin of the United States National Museum*. 1925, 129, 1–613.
- Ryan EP. Structure and function of the reproductive system of the *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). II. Female system. *Proceedings*

- of the Symposium on Crustácea at Erkulan, Índia, 1965. Part II. Symposium Series. 1967, 2: 522-544 + III pl.
- Sainte-Marie G, Sainte-Marie B. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). II. Multiple types of sperm cells and of spermatophores in the Spermathecae of mated females. Canadian Journal of Zoology. 1998, 77: 451–462.
- Sal Moyano MP, Gavio MA, Cuartas EI. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. Helgoland Marine Research. 2009, 64,213–221.
- Sant'anna BS, Turra A, Zara FJ. Simultaneous activity of male and female gonads in intersex hermit crabs. Aquatic Biology. 2010, 10, 201-209.
- Souza LP, Ogawa CY, Silva, JRF, Camargo-Mathias MI. Comparative morphology of the female genital ducts of seven eubrachyuran crabs (Saint Laurent, 1980). — Acta Zoologica (Stockholm) 2016.
- Wagner HP. The genera *Mithrax* Latreille, 1818 and *Mithraculus* White, 1847 (Crustacea: Brachyura: Majidae) in the Western Atlantic Ocean. Zoologische Verhandelingen, 1990, 264, 1–65.
- Windsor AM, Felder DL. Molecular phylogenetics and taxonomic reanalysis of the family Mithracidae Macleay (Decapoda: Brachyura: Majoidea). Invertebrate Systematics, 2014, 28, 145–173.
- Willians AB. Shrimps, lobsters, and crabs of the Atlantic Coast of the Eastern United States, Maine to Florida. Smithsonian Institution Press. 1984, 550p.
- Zara FJ, Pereira RR, Sant'anna BS. Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribarius*. The Biological Bulletin. 2014, 227, 19-32.

Lista de figuras e legendas

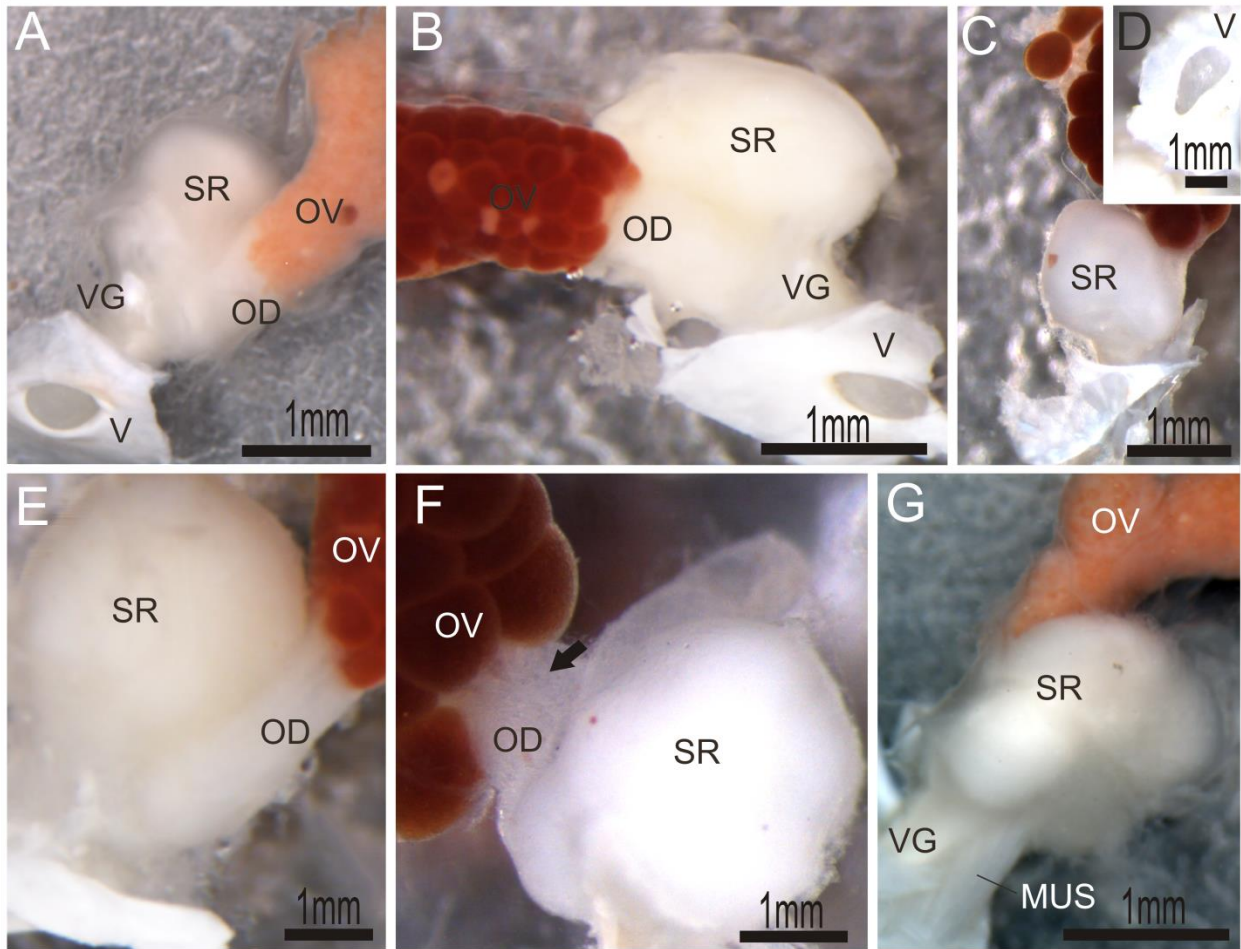


Figura 1. Sistema reprodutor feminino dos caranguejos aranha (Mithracidae). **A:** Vista macroscópica do ovário, oviduto, receptáculo seminal (RS), vagina e abertura genital em formato elíptico de *Damithrax hispidus*. A inserção do oviduto no RS é ventral. Nota-se abertura genital em formato elíptico. **B:** Ovário, RS e abertura genital de *Omalacantha bicornuta*, inserção do oviduto no RS do tipo ventral. **C:** Inserção do oviduto no RS do tipo ventral em *Mithraculus forceps*. **D:** Detalhe da abertura genital de *Mithraculus forceps* em formato elíptico. **E:** Nota-se o oviduto branco e leitoso de *Omalacantha bicornuta*. **F:** Oviduto de *Mithraculus forceps* preenchido por células (seta preta). **G:** A vagina mostra forte musculatura inserida longitudinalmente, na margem oposta à inserção do oviduto no RS. MUS: Tecido muscular. OD: Oviduto; OV: Ovário; RS: Receptáculo seminal; VG: vagina.

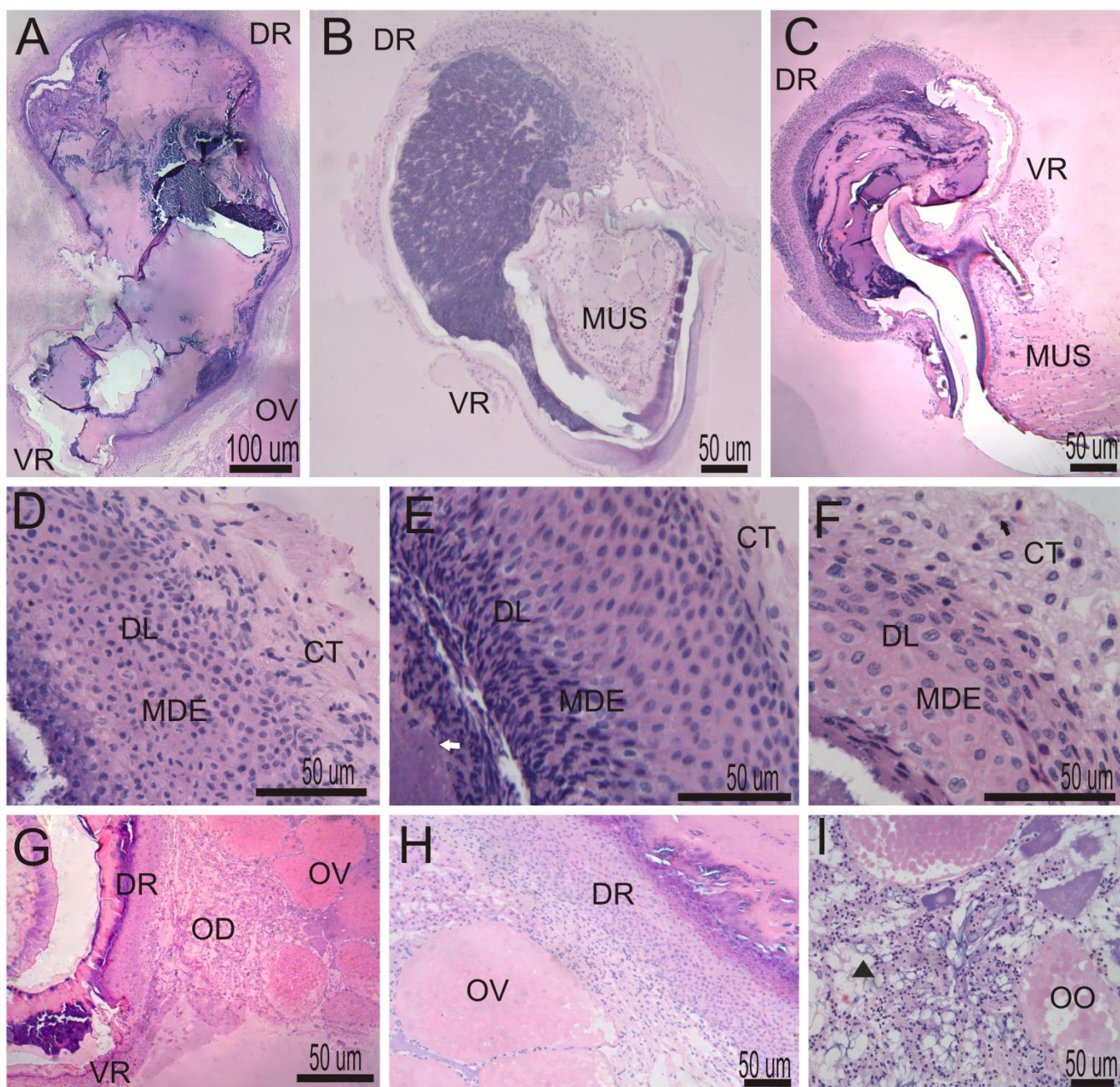


Figura 2. Receptáculo seminal de Mithracidae. **A, B, C:** Receptáculo seminal em formato piriforme. Nota-se a presença de duas regiões: a dorsal e ventral, sendo esta última recoberta por cutícula. **D, E, F:** Detalhe da região mesodérmica do RS caracterizada pela presença de um epitélio estratificado que delimita o lúmen do RS, formando a camada densa, na região basal próxima ao tecido conjuntivo é possível observar células em divisão com núcleos variando de arredondado a elípticos. As células mais apicais da camada densa apresentam núcleo extremamente compacto e com citoplasma basófilo, tais células encontram-se em processo de descamação (seta branca). No tecido conjuntivo observa-se hemócitos e espaços hemais (seta preta). **G:**

Inserção do oviduto no RS, próximo à região de transição do RS, caracterizando-o assim como ventral. **H:** Detalhe da inserção do oviduto no RS. **I:** Tampão de células na região do oviduto com núcleos achatados e o citoplasma marcado pela presença de vesículas lúcidas (cabeça de seta) devido à presença de lipídeos. Figura **A e D:** *Damithrax hispidus*. Figura **B e E:** *Omalacantha bicornuta*. Figura **C e F:** *Mithraculus forceps*. DR: região dorsal; CT: tecido conjuntivo; DL: camada densa; MDE: Epitélio dorsal modificado; MUS: Tecido muscular. OD: Oviduto; OO: oócito; OV: Ovário; VR: região ventral.

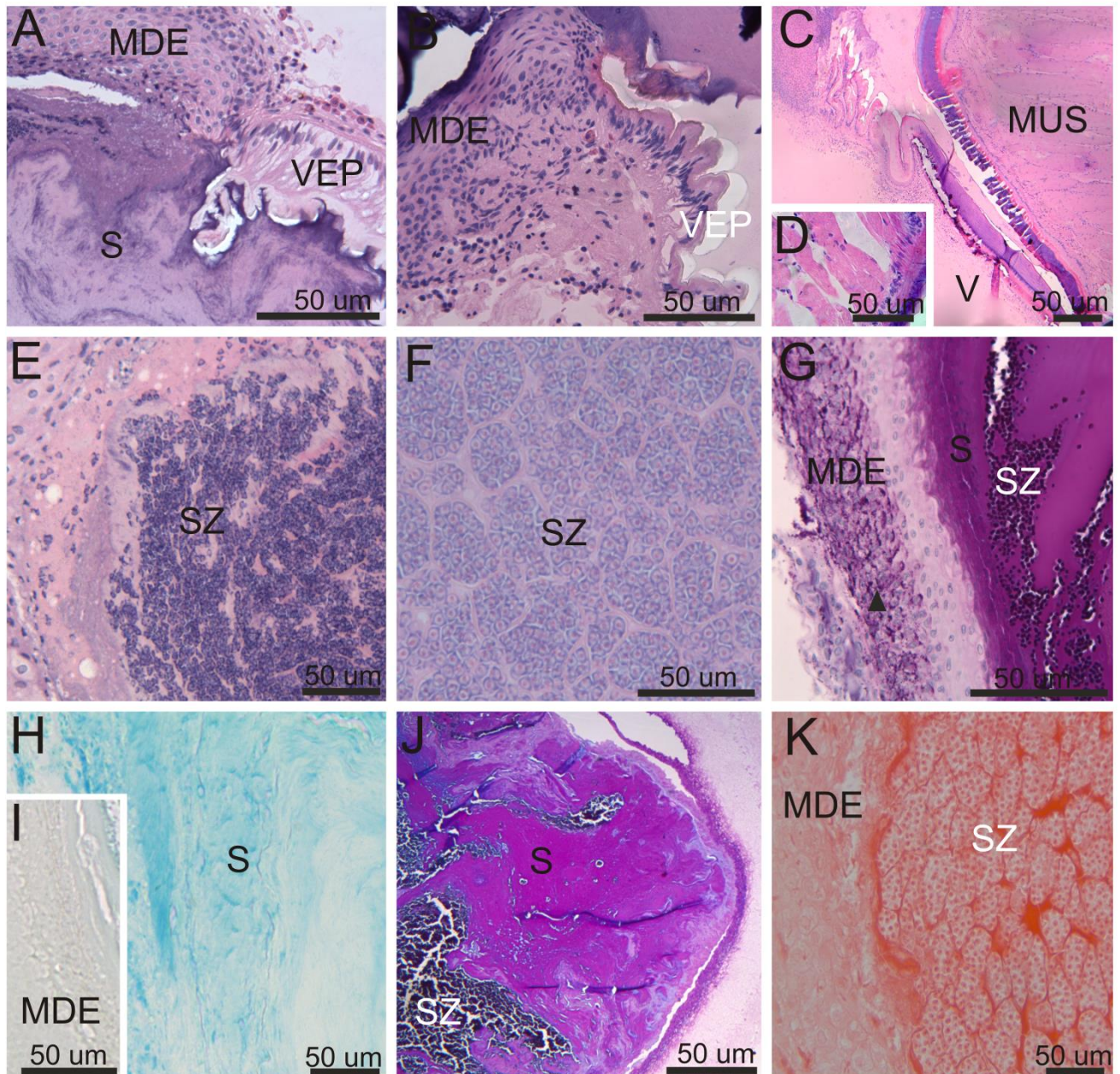


Figura 3. Receptáculo seminal (SR) em Mithracidae. **A:** Detalhe da região de transição entre a região dorsal e ventral marcada pela presença de várias dobras. **B:** Nota-se que esta transição é abrupta e a região ventral é caracteriza pelo epitélio colunar com núcleos elípticos e basais recobertos por espessa camada de cutícula e tecido conjuntivo nas três espécies deste estudo. **C:** Vagina recoberta por espessa camada de cutícula e nota-se a inserção de fibras musculares em só uma das faces. **D:** Detalhe do epitélio cúbico recoberto por tecido conjuntivo na vagina. **E e F:** No lúmen do receptáculo seminal das três espécies nota – se a presença de massas circulares lembrando espermátóforos. **G:** Secreção fortemente positiva para polissacarídeos neutros (PAS), as regiões mais basais da camada densa mostraram reação positiva ao PAS no córtex

celular ou no espaço intercelular (cabeça de seta). **H:** Secreção intensamente reativa para polissacarídeos ácidos. **I:** Detalhe da camada densa com reação negativa para azul de alcian. **J:** Predominância de polissacarídeos neutros no lúmen do RS, enquanto ao redor dos espermatozoides, nota-se a presença de reação positiva para polissacarídeos ácidos. **K:** Secreção e células em descamação com reação fortemente positiva para proteínas. As figuras representam a vista geral dos detalhes do SR nas três espécies estudadas. MDE: Epitélio dorsal modificado; MUS: Tecido muscular; VEP: Epitélio ventral; S: Secreção; SZ: Espermatozóide; V: vagina.

Capítulo III

Sistema reprodutor masculino em caranguejos aranha (Mithracidae): histologia e histoquímica da produção do fluido seminal.

Camila Assugeni, Juan A. Bolaños & Fernando José Zara

**Sistema reprodutor masculino em caranguejos aranha (Mithracidae):
histologia e histoquímica da produção do fluido seminal**

Camila Assugeni¹, Juan A. Bolaños^{2Ψ} & Fernando José Zara¹

¹ Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML), Departamento de Biologia Aplicada, Univ. Estadual Paulista (UNESP), FCAV, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Via de acesso “Prof. Paulo Donato Castellane”, S/N – Zona Rural. 14881-900 - Jaboticabal, SP, Brasil.

^{2 Ψ} (In Memoriam) Grupo de Investigación em Carcinología (Gicudone), Escola de Ciências Aplicadas do Mar, Núcleo Nueva Esparta, Universidad de Oriente, Isla Margarita, Venezuela.

Resumo

Mithracidae passou por extensa revisão taxonômica e molecular o que, conseqüentemente, promoveu alterações taxonômicas com a descrição de novos gêneros. Neste trabalho caracterizamos a sistema reprodutor masculino e a produção do fluido seminal em três espécies de gêneros distintos de Mithracidae com intuito de detectar diferentes padrões morfo-histológicos entre os mesmos. Os espécimes foram coletados por meio de mergulho autônomo e livre no Brasil e Venezuela. As amostras foram fixadas e processadas para rotina em historesina. O sistema reprodutor seguiu o padrão apresentado para Brachyura, entretanto, com algumas peculiaridades em relação ao descrito para Majoidea. As três espécies apresentaram o mesmo padrão de sistema reprodutor. Nelas, o testículo tem maior semelhança com o tipo tubular, sem a presença de lóbulos. Porém numa mesma secção notam-se sempre células germinativas no mesmo estágio de maturação, sem diferentes zonas, característica do testículo tubular. Este padrão de maturação é típico do testículo lobular, fazendo com que estes Mithracidae tenham um tipo de classificação de testículo nunca descrito, aqui chamado de intermediário. O vaso deferente é dividido em três regiões: a anterior, média e posterior. A região anterior é composta por epitélio colunar simples com núcleos irregulares envoltos por tecido muscular e tecido conjuntivo. Esta região apresenta duas porções: a porção proximal e distal. A proximal recebe a massa de espermatozoides

vindos do testículo e na distal nota-se os espermatozoides empacotados em espermatóforos coenospérmicos. A região média do vaso deferente mostra lúmen mais amplo, com espermatóforos mais afastados entre si, imersos no maior volume de secreção. A região posterior do vaso deferente apresenta epitélio pavimentoso simples envolto por tecido muscular. O lúmen torna-se muito dilatado, quando comparado as outras regiões e grande quantidade de secreção acidófila separa os espermatóforos. O fluido seminal mostra-se com a mesma composição química, em todas as regiões, formado por proteínas e polissacarídeos (neutros e ácidos). Em todas as espécies, não foram detectadas glândulas acessórias ou bolsas laterais no vaso deferente. Assim, o vaso deferente é extremamente simplificado nas três espécies estudadas, sendo a ausência de glândulas diferente do padrão encontrado para os outros Majoidea. A ausência de tais glândulas pode explicar a não produção de pacotes espermáticos em fêmeas, indicando que tais glândulas são importantes para espécies com registro de competição espermática.

Palavras-Chave: *Mithrax*; *Damithrax*; *Mithraculus*; testículo; espermatóforo.

Introdução

Dentre os Brachyura encontram-se os caranguejos aranha da família Mithracidae com potencial para aquariofilia, devido grande diversidade de cor e morfologia corpórea (Wagner, 1990; Baeza *et al.*, 2010; Windsor & Felder, 2014). Adicionalmente, estes animais são importantes para a manutenção da limpeza dos aquários, devido ao hábito alimentar, uma vez que utilizam algas na sua dieta. Na última revisão taxonômica, com base morfológica e molecular para Mithracidae, foi proposto o surgimento do novo gênero *Damithrax*, o qual recebeu as antigas espécies *Mithrax hispidus* (Herbst, 1790) e *Mithrax tortugae* Rathbun, 1920 (Windsor & Felder, 2014). Os mesmos autores sinonimizaram a espécie *Mithrax verrucosus* H. Milne Edwards, 1832 como *Mithrax aculeatus* (Herbst, 1790) e confirmaram o status dos gêneros *Mithrax* e *Mithraculus* anteriormente colocado em dúvida por meio de análises moleculares (Baeza *et al.*, 2010)

O sistema reprodutor masculino em Brachyura tem a forma da letra “H” e é composto por um par de testículos, um par de vasa deferentia e os gonópodos, que são os órgãos copulatórios (Krol *et al.*, 1992). Nos testículos ocorre o processo de espermatogênese e espermiogênese, o qual termina na produção dos espermatozoides que são liberados nos ductos seminíferos (Zara *et al.*, 2012; Nascimento & Zara, 2013). O testículo de Brachyura pode ser classificado, morfológicamente, em dois tipos: o lobular e o tubular. O lobular é composto por numerosos lóbulos ou cistos seminíferos, conectados por um ducto seminífero central. Cada lóbulo apresenta células no mesmo estágio da espermatogênese (Nagao & Munehara, 2003). Enquanto o tubular consiste de um túbulo único e convoluto com células germinativas em diferentes estágios sequenciais da espermatogênese, formando zonas de maturação, com os espermatozoides sendo liberados da zona de evacuação para o túbulo seminífero (Nagao & Munehara, 2003; Simeó *et al.*, 2009).

Os espermatozoides são transportados para o vaso deferente, onde são empacotados no interior dos espermatóforos (Zara *et al.*, 2012; Klaus *et al.*, 2013; Tiseo *et al.*, 2014). O vaso deferente é dividido em três regiões: anterior (AVD), na qual ocorre a formação dos espermatóforos, média (MVD) e a posterior (PVD), onde ocorre a produção da maior parte do fluido seminal (Johnson, 1980; Krol *et al.*, 1992; Mclay & Becker, 2015). Associados ao vaso deferente, principalmente na MVD e/ou PVD, podem ocorrer estruturas anexas chamadas de bolsas laterais, glândulas acessórias,

divertículos ou cecos (Johnson 1980; Simeó *et al.*, 2009; Sal Moyano *et al.*, 2009; Zara *et al.*, 2012; Tiseo *et al.*, 2014). Em Portunidae, as bolsas laterais auxiliam na produção de fluido seminal por ampliarem o vaso deferente. Este aumento de superfície tem importante função na transferência dos espermátóforos e, principalmente, na formação do “plug” espermático, garantindo que um só macho transfira seu material genético para a fêmea, durante a muda para a puberdade (Jivoff, *et al.*, 2007; Zara *et al.*, 2012; Nascimento & Zara 2013). No caso de Grapsoidea, Pinnotheridea e Gecarcidae, estas bolsas laterais são chamadas de glândulas acessórias e podem ocorrer somente na PVD (Garcia & Silva, 2006; Tiseo *et al.*, 2014; McLay & Becker; 2015). Tal secreção parece ser complementar ao fluido seminal, tendo outra característica química, auxiliando na transferência espermática em *Pachygrapsus* (Tiseo *et al.*, 2014). Por sua vez em Majoidea, estas expansões do vaso deferente recebem o nome de divertículos, cecos ou glândulas acessórias podendo ocorrer na MVD e PVD como em Inachoididae (Diesel, 1989); Oregoniidae (Beninguer *et al.*, 1988; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998), Majidae (Simeo *et al.*, 2009), sendo aparentemente ausente em Epialtidae (Hinsch & Walker, 1974; Sal Moyano *et al.*, 2009). A função destas glândulas é pouco conhecida, mas parece atuar na transferência espermática e na formação de pacotes espermáticos, participando assim na competição espermática, como proposto para Inachoididae e Oregoniidae (Diesel, 1989, 1991; Sainte-Marie & Sainte-Marie 1998, Moriyasu & Benhalima, 2000). Nestas espécies que apresentam a abertura do oviduto na região ventral do receptáculo seminal, o último macho a copular com a fêmea teria vantagem na fertilização dos ovócitos.

Assim, neste trabalho caracterizamos o sistema reprodutor masculino para três espécies de diferentes gêneros de Mithracidae, cuja família nunca foi estudada do ponto de vista anatômico e histoquímico, em busca de variações anatomo-histológicas entre *Damithrax*, *Mithrax* e *Mithraculus*, as quais possam ser associadas à transferência e/ou competição espermática.

Material e métodos

Machos de *Damithrax hispidus* (Herbst, 1790), *Mithraculus forceps* A. Milne-Edwards, 1875 e *M. aculeatus* foram coletados por meio de mergulho autônomo e livre em Ubatuba-SP (Latitude:-23.433671 e Longitude:-45.083853) no Brasil e Isla la Tortuga (Latitude: 10.933642 e Longitude:-65.309456) na Venezuela. A identificação

dos animais foi realizada com base nas descrições de Wagner (1990), Melo (1996) e Windsor & Felder (2014). Foram obtidos no mínimo três exemplares de cada espécie e todos foram mensurados quanto ao tamanho da carapaça (CC), utilizando-se um paquímetro digital (0,01 mm).

Para a análise histológica do sistema reprodutor masculino, tais animais foram anestesiados por resfriamento, dissecados e fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 7,4), por no mínimo 24hs.

Para análise macroscópica do sistema reprodutor masculino os órgãos foram analisados no estereomicroscópio Leica M205C e fotografados imersos na solução fixadora. Posteriormente, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em série alcoólica (50-95%), embebidas e incluídas em resina glicol-metacrilato Leica®, segundo rotina indicada pelo fabricante. Após a polimerização, os blocos histológicos foram cortados em micrótomo rotativo. Os cortes com espessura de 5 a 7µm foram recolhidos em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina para descrição geral, de acordo com Junqueira & Junqueira (1983), evitando banhos em álcool (Sant'Anna *et al.*, 2010). Para a análise histoquímica foi executada a técnica de xylydine ponceau (Melo & Vidal, 1980) para proteínas, PAS para polissacarídeos neutros, Azul de Alcian, para os ácidos segundo descrito por Junqueira & Junqueira (1983).

Resultados

Anatomia

Nas espécies estudadas o sistema reprodutor masculino é macroscopicamente descrito como um órgão de simetria bilateral com a forma da letra “H” localizado na cavidade cefalotorácica (Fig. 1A e B). Este é composto pelo par de testículos, e os túbulos, que compõem o par de vasa deferentia, os quais desembocam nos órgãos copulatórios (gonópodos) (Fig. 1A-C). Os testículos são órgãos tubulares na região anterior do corpo, ao longo dos lados do estômago e são unidos por uma comissura central entre a extremidade posterior do estômago e a região anterior do coração (Fig. 1A e B). O vaso deferente é dividido em região anterior (AVD), região média (MVD) e posterior (PVD) (Fig. 1A). A AVD é um tubo convoluto, a MVD é um túbulo liso e mais espesso que a AVD. A PVD segue a mesma morfologia da MVD, porém com maior espessura (Fig. 1A-C). Não foram detectadas bolsas laterais, cecos, divertículos ou glândulas acessórias no momento da dissecação e análise macroscópica (Fig. 1A-C).

Em *D. hispidus*, *M. aculeatus* e *Mi. forceps* foi encontrado o mesmo padrão para a morfologia do sistema reprodutor.

Histologia e Histoquímica

Em *D. hispidus*, *M. aculeatus* e *Mi. forceps* o testículo está envolto por delgada camada de tecido conjuntivo e justaposto a esta camada encontram-se as células acessórias que circundam as células germinativas (Fig 2-D). O testículo foi classificado como intermediário, ou seja, um túbulo contendo em uma das extremidades o túbulo seminífero que recebe os espermatozoides (Fig 2A). Em cortes transversais as espermatogônias ocupam um dos polos formando um lóbulo circundado por células acessórias e abaixo deste, encontra-se outro lóbulo com as células germinativas em espermatogênese, sempre no mesmo estágio de maturação (Fig 2A e B). As células acessórias possuem núcleos variando de achatados nos lóbulos contendo espermatogônias e espermátócitos (Fig. 2C e D), passando a arredondados nos lóbulos contendo espermátides. Ao terminarem a espermiogênese, os espermatozoides são evacuados para o túbulo seminífero (Fig 2A-D). Os espermátócitos primários com núcleos grandes mostrando os diferentes estágios da profase meiótica (Fig 2E). Os espermátócitos secundários apresentam núcleo menor com a cromatina homogeneamente corada (Fig 2F). As espermátides foram divididas em três estágios (Fig. 2G-I). No estágio inicial nota-se núcleo arredondado com pequena vesícula pró-acrossomal (Fig 2G). As espermátides intermediárias mostram o núcleo com formato da letra “C” e a vesícula acrossomal é mais volumosa e marcada ao PAS (Fig. 2H). As espermátides tardias são bastante semelhantes ao espermatozoide mostrando um núcleo delgado circundando a vesícula acrossomal (Fig. 2I).

O vaso deferente foi dividido em três regiões distintas: anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD). A AVD foi dividida em duas porções: a proximal e distal. A porção proximal recebe os espermatozoides maduros provenientes do testículo, os quais encontram-se como uma grande massa espermática ocupando todo o lúmen (Fig. 3A-C). Na região distal os espermatozoides encontram-se agrupados em pequenas massas esféricas delimitadas por parede, constituindo assim a estrutura do espermatóforo coenospérmico (Fig. 3D-F). A AVD apresenta epitélio colunar simples com núcleos arredondados a elípticos, envolto por camada muscular e tecido conjuntivo (Fig. 3A-F). A MVD apresenta camada de tecido conjuntivo, camada muscular e epitélio colunar simples, com características secretoras com núcleos irregulares basais e citoplasma

basófilo. A principal diferença entre a AVD e a MVD foi o aumento do diâmetro luminal do vaso, com consequente aumento de secreção espaçando os espermátóforos nesta região (Fig. 3G-I). Nas três espécies pode ser observada uma secreção acidófila junto ao ápice das células nesta região (Fig. 3G -I). A última região do vaso deferente, a PVD mostra epitélio pavimentoso simples envolto por espessa camada de tecido muscular (Fig. 3J-L). No lúmen, o qual tem diâmetro bastante acentuado em relação às outras regiões do vaso deferente, encontra-se preenchido por secreção acidófila e homogênea a qual torna os espermátóforos claramente separados uns dos outros (Fig. 3J-L). Para todas as espécies estudadas não foram observadas bolsas laterais, cecos, divertículos ou glândulas acessórias em nenhuma das regiões do vaso deferente.

Por meio da histoquímica pode-se constatar que a AVDp apresenta secreção reativa para polissacarídeos neutros, sendo esta negativa para proteínas e polissacarídeos ácidos (Fig. 4A-C). Na AVDd nota-se a presença de secreção reativa para proteínas e polissacarídeos neutros, a qual auxilia na separação das massas espermáticas em espermátóforos. Esta mesma secreção é fracamente positiva para polissacarídeos ácidos (Fig. 4D-F). Os espermátóforos na AVDd são caracterizados pela presença de parede glicoproteica, com reação fortemente positiva para proteínas e positiva para polissacarídeos neutros e positiva para os ácidos (Fig. 4D-F). As secreções encontradas na MVD e PVD mostram reação fortemente positiva para proteínas, positiva polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 4G-I).

Discussão

Damithrax hispidus, *M. aculeatus* e *Mi. forceps* apresentam o sistema reprodutor masculino dividido em testículo e vaso deferente, com forma da letra “H” seguindo o que foi observado em *Majoidea* (Beninguer *et al.*, 1988; Simeó *et al.* 2009; Sal Moyano *et al.*, 2009). Esta organização anatômica segue o padrão descrito para *Brachyura* (Krol *et al.*, 1992; López-Greco, 2013; McLay & Becker, 2015).

O testículo das três espécies estudadas foi classificado como intermediário. A morfologia encontrada segue o padrão de testículo do tipo tubular de acordo com o que foi proposto por Nagão & Munehara (2003). Entretanto, as células germinativas possuem um padrão de maturação característico do tipo lobular de testículo uma vez que, apresenta regionalizações aleatórias, contendo células do mesmo estágio de desenvolvimento. Porém, os espermatozoides maduros são liberados para o túbulo seminífero, o qual atua como uma zona de evacuação, típico do testículo tubular (Simeó

et al., 2009; Tiseo *et al.*, 2014). Assim, pode-se dizer que a morfologia de testículo encontrada nas espécies aqui estudadas pode ser a mais basal, por possuir um misto das duas morfologias de testículo descritas. O padrão do tipo lobular é o mais comumente encontrado em Brachyura, sendo o testículo do tipo tubular descrito para Majoidea, Xanthoidea e Grapsoidea (Simeó *et al.*, 2009). Assim, em Majoidea, a classificação tubular deve ser utilizada com cautela, uma vez que este novo padrão de maturação, com grandes zonas de células no mesmo estágio pode ser encontrado em outras espécies já descritas. Alguns trabalhos conduzem a uma interpretação errônea do tipo de testículo por confundir a anatomia com o padrão histológico (Zara *et al.*, 2012) como observado para *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803), *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), *Eriphia verrucosa* (Forskål, 1775), e *Armases rubripes* (Rathbun, 1897) (Garcia & Silva, 2006; Castilho *et al.*, 2008; Erkan *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009). A espermatogênese nas espécies estudadas apresenta as mesmas características histológicas encontradas em outras espécies, na qual mostram ser o modelo geral de Brachyura (Ryan 1967; Garcia & Silva 2006; Castilho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Zara *et al.*, 2012; Tiseo *et al.*, 2014). A classificação das espermátides em inicial, média e tardia, foi baseada no aumento da vesícula acrossomal e seguiu o modelo encontrado para caranguejos derivados (Zara *et al.*, 2012; Nascimento & Zara, 2013; Tiseo *et al.*, 2014).

Neste estudo foi realizada a técnica de coloração de PAS contra corado com Hematoxilina que facilita a visualização da espermiogênese, enquanto em outros trabalhos com Brachyura foi utilizada a técnica de azul de toluidina. Sendo assim, esta técnica pode ser considerada a mais adequada, pois facilita a identificação dos estágios da vesícula acrossomal e ao mesmo tempo permite interpretar as alterações nucleares.

Os vasa deferentia são divididos em região anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD) seguindo o que foi descrito para Majoidea (Diesel, 1989; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998; Benhalima & Moriyasu, 2000; Simeó *et al.*, 2009; Sal Moyano *et al.*, 2009) sendo o mesmo padrão encontrado em Brachyura (Krol *et al.*, 1992). A AVD de *D. hispidus*, *M. aculeatus* e *Mi. forceps* é dividida em duas porções: a proximal (AVDp) e a distal (AVDd). Esta divisão é baseada na formação dos espermatóforos coenospérmicos. A divisão da AVD em duas porções já foi descrita para Grapsoidea e Portunidae (Santos *et al.*, 2009; Nicolau *et al.*, 2012; Zara *et al.*, 2012; Nascimento & Zara, 2013). A AVD apresenta epitélio colunar simples com núcleos irregulares envolto por camada muscular e tecido conjuntivo. Esta mesma organização tecidual foi descrita para Majoidea, Portunidae e Ocypodoidea (Castilho *et al.*, 2008; Simeó *et al.*, 2009; Sal

Moyano *et al.*, 2009; Zara *et al.*, 2012; Nascimento & Zara, 2013). A AVD é a região onde ocorre a formação dos espermátóforos. Este processo se inicia na porção proximal e termina na porção distal assim como descrito para *Libinia spinosa* Guérin, 1832 (Sal Moyano *et al.*, 2009), Grapsoidea (Garcia & Silva, 2006; Tiseo *et al.*, 2014) e Portunidae (Zara *et al.*, 2012; Nascimento & Zara, 2013). Nas três espécies estudadas, a formação do espermátóforo mostra o mesmo padrão. A secreção da AVDp é composta por polissacarídeos neutros, o qual separa os espermatozoides em massas. Na AVDd, onde se inicia a formação da parede dos espermátóforos, a secreção torna-se glicoproteica, fracamente reativa para polissacarídeos ácidos, sendo esta secreção a mesma observada na parede do espermátóforo. Em Portunidae a secreção que envolve a massa de espermatozoides da AVDp é composta por polissacarídeos ácidos, diferente, portanto, de Mithracidae. Na AVDd de *Callinectes*, uma nova secreção, glicoproteica com reação para polissacarídeos neutros, ocorre e forma a parede dos espermátóforos (Zara *et al.*, 2012; Nascimento & Zara, 2013). Contudo, nas espécies deste estudo nota-se a modificação da secreção pela adição de proteínas e polissacarídeos ácidos, os quais são misturados a secreção da AVDp, sendo este novo composto presente também na parede do espermátóforo.

A MVD apresenta epitélio secretor colunar simples com núcleos irregulares e basais, esta mesma morfologia foi descrita os Majoidea *L. spinosa*, *Maja brachydactyla* Balss, 1922 (Sal Moyano *et al.*, 2009; Simeó *et al.*, 2009), Portunidae (Zara *et al.*, 2012; Nascimento & Zara 2013) e Ocypodidae (Castilho *et al.*, 2008). No lúmen da MVD encontram-se espermátóforos prontos e maduros, imersos em fluido seminal homogêneo. A secreção da MVD é intensamente reativa para proteínas e reativa para polissacarídeos neutros e ácidos, similar ao que foi observado nos Portunidae (Zara *et al.*, 2012).

A parede da PVD apresenta epitélio pavimentoso simples com núcleos irregulares, tal epitélio é bastante achatado com relação às outras regiões do vaso deferente possivelmente devido ao aumento da secreção no lúmen, esta mesma organização tecidual foi encontrada em outros Majoidea, (Hinsch & Walker, 1974; Simeó *et al.*, 2009; Sal Moyano *et al.*, 2009), e Eriphiidae (Erkan *et al.*, 2009). As secreções do lúmen apresentam a mesma reação histoquímica da MVD. Não foram encontradas bolsas laterais, cecos, divertículos ou glândulas acessórias em nenhuma região do vaso deferente das espécies estudadas. Tais glândulas são comumente descritas para Majoidea e auxiliam na produção e transferência do fluido seminal (Diesel *et al.*, 1989;

Simeó *et al.*, 2009; Beninger *et al.*, 1988; Simeó *et al.*, 2009). Nos Majoidea as glândulas acessórias foram observadas em *Inachus Phalangium* (Fabricius, 1775), *M. brachydactyla*, *Chionocetes opilio* (O. Fabricius, 1788) (Diesel *et al.*, 1989; Simeó *et al.*, 2009; Beninger *et al.*, 1988, Benhalima & Moriyasu, 2000). Para estas mesmas espécies, foi reportado a formação de pacotes ou estratos espermáticos no receptáculo seminal (Diesel *et al.*, 1989; Sainte-Marie & Sainte-Marie 1998). Entretanto, na descrição do sistema reprodutor masculino de *L. spinosa* não foram encontradas glândulas acessórias (Sal Moyano *et al.*, 2009). Esta mesma espécie também não é formadora de estratos ou pacotes espermáticos (Gonzalez-Pisani *et al.*, 2012). Assim, pode-se dizer que as glândulas acessórias estão associadas à formação de estratos espermáticos, uma vez que, nas espécies de Mithracidae estudadas não foram descritos pacotes espermáticos (Assugeni & Zara, Cap 2). Em espécies formadoras de plug espermático, *Callinectes ornatos* Ordway, 1863 e *Callinectes danae* Smith, 1869 (Zara *et al.*, 2012; Nascimento & Zara, 2013) foram encontraram estruturas com a mesma função, porém denominadas de bolsas laterais, com a função de formação de plug espermático, o que não ocorre em Mithracidae. Desta maneira, os vasa deferentia de Mithracidae funcionam como produtores de fluido seminal, formadores e transportadores de espermátóforos, sem nenhuma especialização morfológica o que corrobora os resultados da ausência de estratos espermáticos no receptáculo seminal destas espécies (Assugeni & Zara, Cap. 2)

Em conclusão, a morfologia do sistema reprodutor dos Mithracidae mostra-se simplificada e com ausência de glândulas acessórias, sendo assim, em espécies com esta característica pode-se prever que este padrão anatomo-histológico reflita a ausência de pacotes espermáticos ao menos para Majoidea.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior - CAPES - Ciências do Mar II (# 1989 / 2014-23038.004309 / 2014-51, # 2005/2014 - 23038.004308 / 2014-14 e # 23038.004310 / 2014-85) pela bolsa de mestrado de CA. O presente estudo faz parte do projeto CNPq (Universal # 486337 / 2013-8) concedido a FJZ. Ao Laboratório IML pelo suporte em materiais e físico. Agradecimentos adicionais a Márcia F. Mataqueiro pelo suporte técnico. Este estudo foi conduzido de acordo com as leis brasileiras (Licença Permanente FJZ - MMA SisBio # 34587-1).

Referências

- Baeza JA, Bolaños JA, Fuentes S, Hernandez JE, Lira C, Lopez R. Molecular phylogeny of enigmatic Caribbean spider crabs from the *Mithrax–Mithraculus* species complex (Brachyura: Majidae: Mithracinae): ecological diversity and a formal test of genera monophyly. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2010. 90, 851–858.
- Benhalima K, Moriyasu M. Structure and function of the posterior vas deferens of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Invertebrate Reproduction and Development*. 2000, 37: 11-23.
- Beninger PG, Elnor RW, Foyle TP, Odense PH. Functional anatomy of the male reproductive system and female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *Journal of Crustacean Biology*. 1988, 322-332.
- Castilho GG, Ostrensky A, Pie M R, Boeger WA. Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*. 2008, 89: 157–161.
- Diesel R. Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *Journal of Crustacean Biology*. 1989, 9,266–277.
- Diesel R. Sperm competition and mating behaviour in Brachyura. In: Bauer RT, Martin JW, editors. *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, New York, NY. 1991, pp. 145–163.
- Erkan M, Tunali Y, Balkis H, Oliveria E. Morphology of Testis and Vas Deferens in the Xanthoid Crab, *Eriphia verrucosa* (ForskÅL, 1775) (Decapoda: Brachyura). *Journal of Crustacean Biology*. 2009, 29: 458-465.
- Garcia TM & Silva JRF. Testis and vas deferens morphology of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803). *Braz. Arch. Biol. Technol*. 2006, 49, 339–345.
- Hinsch GW, Walker MH. The vas deferens of the spider crab, *Libinia emarginata*. *Journal of Morphology*. 1974, 143, 1–20.

- Jivoff P, Hines AH, Quackenbush, LC. Reproductive Biology and Embrionic Development, 255-286 p. In, Cronin, L. E.; Kennedy, V. S. (eds.), *The Blue Crab Callinectes sapidus*. Maryland, Maryland Sea Grant College. 2007.
- Johnson PT. Histology of the Blue Crab *Callinectes sapidus*: A Model for the Decapoda. Praeger, New York. 1980.
- Junqueira LC, Junqueira LM MS. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. 1.ed. Instituto de Ciências Biomédicas e Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. Editora Santos. 1983. 123.
- Klaus S, Münzner S, Modenbach AC, Streit B, Tudge CC. Spermatophore formation and spermultrastructure of *Sundathelphusa philippina* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*. 2013. 94: 267–272.
- Krol RM, Hawkins WE, Overstreet RM. Reproductive components, pp. 295-343. In, Harrison, F. W.; Humes, A. G. (eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 10: Decapod Crustacea, Wiley-Liss Inc., New York. 1992, 474.
- McLay CL, Becker C. Reproduction in Brachyura. In: *Treatrise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea*. 2015.
- Melo GAS. Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do Litoral Brasileiro. São Paulo, 1996.
- Mello MSL, Vidal BC. Práticas de Biologia Celular. São Paulo: Edgar Blucher – FUNCAMP. 1980.
- Nagao J, Munehara H. Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Fisheries Science*. 2003, 69: 1200–1208.
- Nascimento FA, Zara FJ. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius*. 2013, 21(2): 161-177.
- Nicolau CF, Nascimento AA, Machado-Santos C, Sales A, Oshiro LM Y. Gonads of males and females of the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Grapsidae: Brachyura: Decapoda): a histological and histochemical view. *Acta Zoologica (Stockholm)*. 2012, 93: 222–230.
- Ryan EP. Structure and function of the reproductive system of the *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). II. Female system. *Proceedings of the Symposium on Crustácea at Erkulán, Índia, 1965*. Part II. Symposium Series. 1967, 2: 522-544 + III pl.
- Sainte-Marie G, Sainte-Marie B. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). II. Multiple types of sperm cells and of spermatophores in

- the Spermathecae of mated females. *Canadian Journal of Zoology*. 1998, 77: 451–462.
- Sal Moyano MP, Gavio MA, Cuartas EI. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. *Helgoland Marine Research*. 2009, 64: 213-221.
- Sant’anna B S, Turra A, Zara FJ. Simultaneous activity of male and female gonads in intersex hermit crabs. *Aquatic Biology*. 2010, 10: 201–209.
- Santos C M, Lima G V, Nascimento A A, Sales A, Oshiro L M Y. Histological and histochemical analysis of the gonadal development of males and females of *Armases rubripes* (Rathbun 1897) (Crustacea, Brachyura, Sesarmidae). *Brazilian Journal of Biology*. 2009, 69: 161-169.
- Simeó, C.G.; Ribes, E. and Rotllant, G. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Tissue and Cell*. 2009, 41: 345361.
- Tiseo GR, Mantelatto FL, Zara FJ. Is cleistospermy and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*. 2014, 34(6), 704-716.
- Wagner HP. The genera *Mithrax* Latreille, 1818 and *Mithraculus* White, 1847 (Crustacea: Brachyura: Majidae) in the Western Atlantic Ocean. *Zoologische Verhandelingen*. 1990, 264, 1–65.
- Windsor AM, Felder DL. Molecular phylogenetics and taxonomic reanalysis of the family Mithracidae Macleay (Decapoda: Brachyura: Majoidea). *Invertebrate Systematics*. 2014, 28, 145–173.
- Zara FJ, Toyama MH, Caetano FH, López-Greco LS. Spermatogenesis, Spermatophore, and Seminal Fluid Production in the adult Blue Crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*. 2012, 32:249-262.

Lista de figuras e legendas

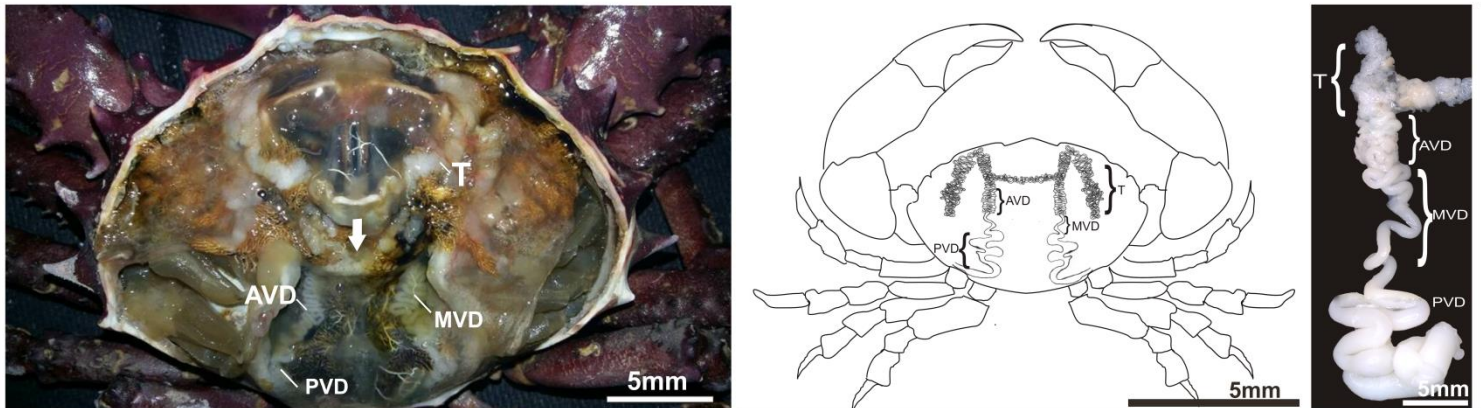


Figura 1. Sistema reprodutor masculino. **A:** Sistema reprodutor masculino visto no momento da dissecação, no qual pode-se observar o padrão encontrado para as espécies analisadas e a comissura central que liga os testículos (seta branca). **B:** Diagrama do sistema reprodutor masculino de *Damithrax hispidus*, *Mithrax aculeatus* e *Mithraculus forceps*. Nota-se o sistema reprodutor masculino em formato de letra H localizado na cavidade cefalotorácica e os vasos deferentes divididos em região anterior, média e posterior. **C:** Vista macroscópica dos testículos e os vasa deferentia no qual observa-se que o testículo é um túbulo bastante convoluto, a AVD é um vaso também convoluto e a MVD e PVD um tubo liso que aumenta de espessura em direção a região posterior do vaso deferente. T: testículo; AVD: região anterior do vaso deferente; MVD: região média do vaso deferente; PVD: região posterior do vaso deferente.

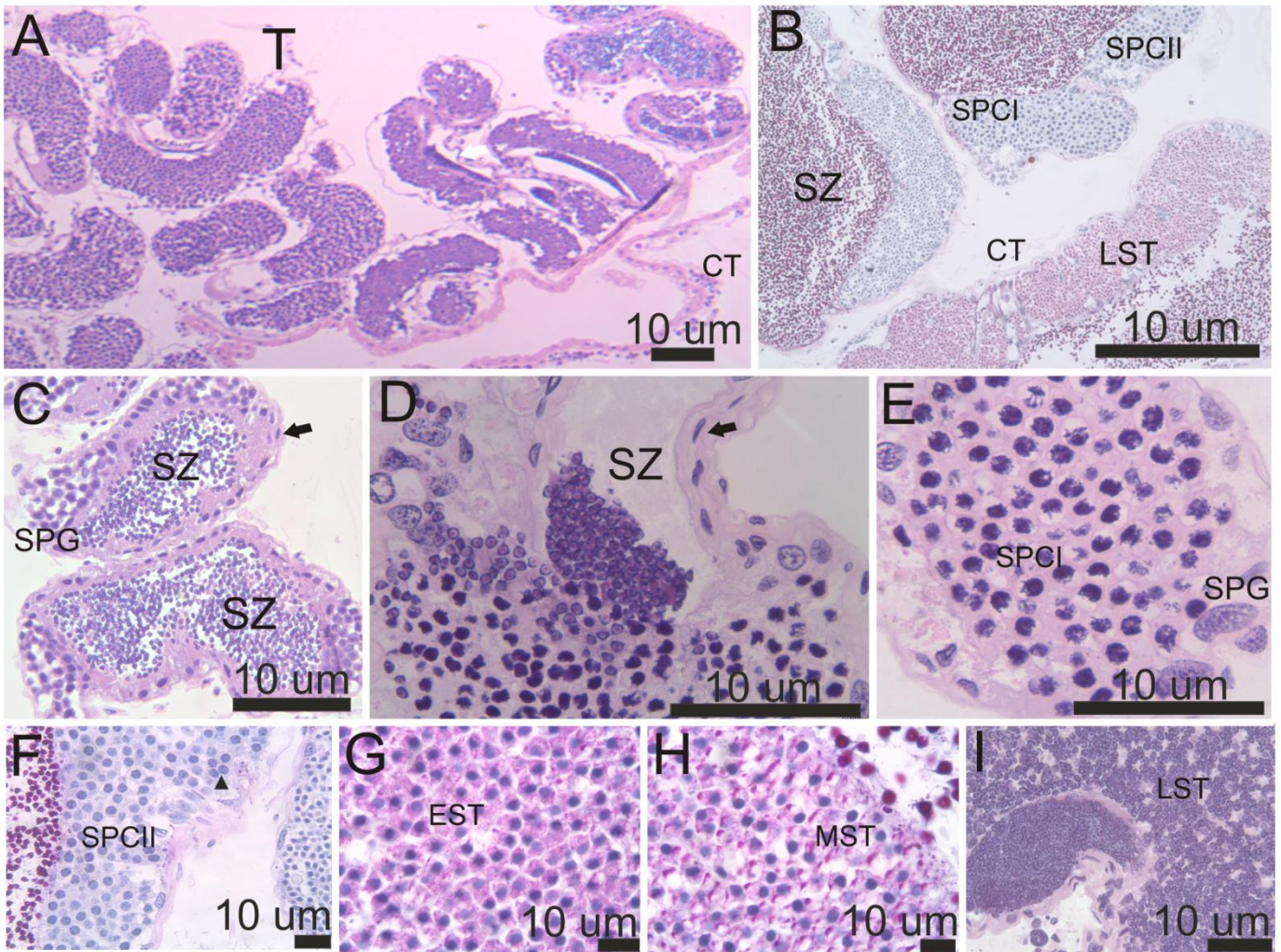


Figura 2: Espermatogênese e espermiogênese em Mithracidae. **A:** Aspecto geral do testículo do tipo intermediário onde nota-se o túbulo seminífero preenchido de espermatozoides (seta branca). **B:** Testículo envolto por tecido conjuntivo e justaposto a esta camada encontram-se as células acessórias que circundam as células germinativas. **C:** Espermatogônias na periferia do lóbulo, células acessório com núcleo achatado (seta preta). **D:** Espermatozoides sendo evacuados no túbulo seminífero. Células acessório com núcleo achatado (seta preta). **E:** Espermatócitos I em fase de divisão. **F:** Espermatócitos II com tamanho reduzido e o núcleo já preenchido (cabeça de seta). **G:** Espermátide em estágio inicial. **H:** Espermátide média. **I:** Espermátide tardia. As figuras são referentes ao padrão geral encontrado em *Damithrax hispidus*, *Mithrax aculeatus* e *Mithraculus forceps*. CT: tecido conjuntivo; EST: espermátide inicial; MST: espermátide média; LST: espermátide tardia; SPCII: espermatócito secundário; SPCI: espermatócito primário; SPG: espermatogônia; SZ: espermatozoide; T: testículo.

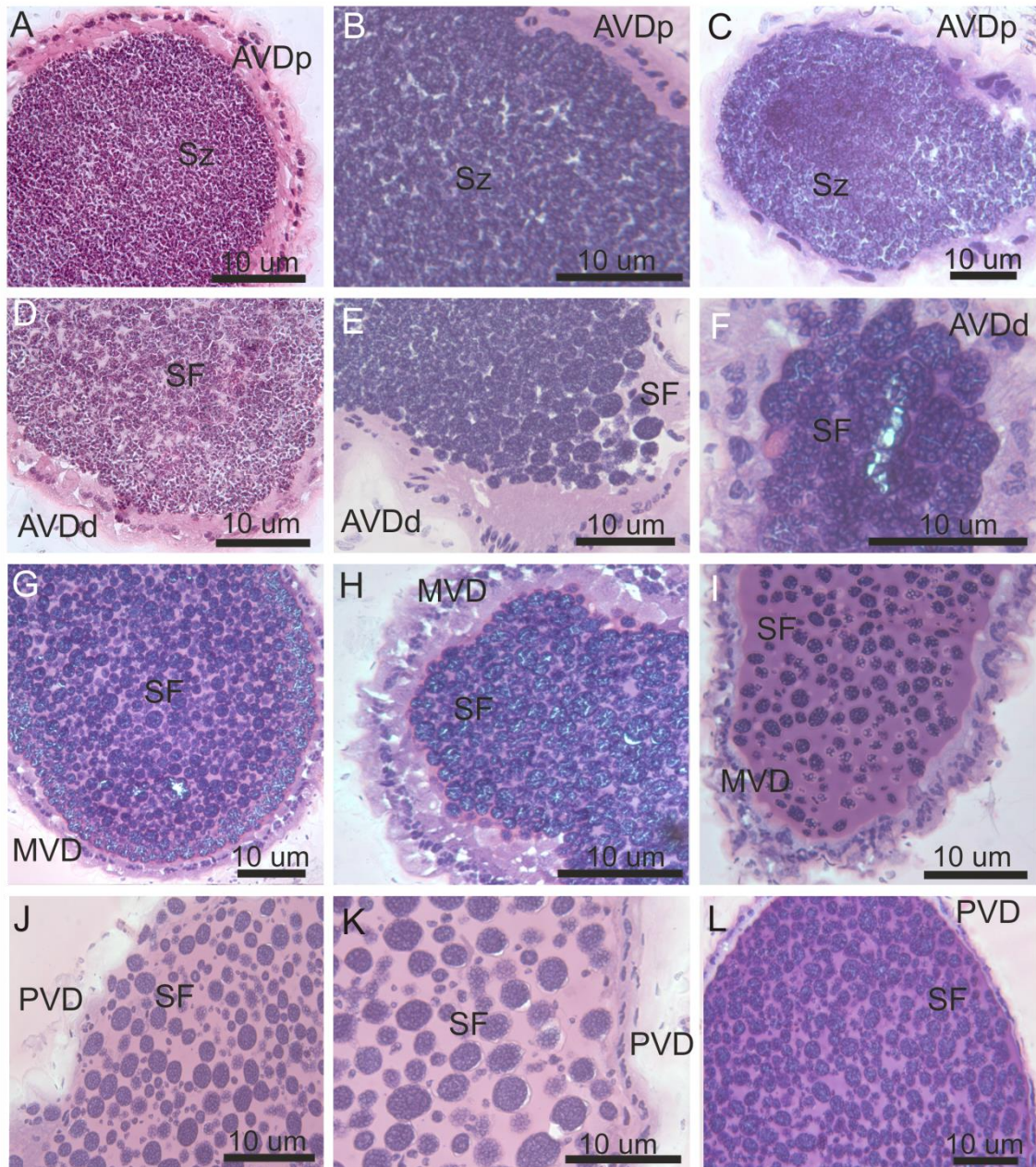


Figura 3. Vasa deferentia. **A, B, C:** Porção proximal do vaso deferente anterior a qual recebe uma massa homogênea de espermatozoides maduros dos testículos. **D, E, F:** Região distal do vaso deferente anterior onde se inicia a formação dos espermatóforos; A parede da AVD é composta por uma camada de tecido conjuntivo, uma camada muscular intermediária e um epitélio interno colunar estratificado com núcleos arredondados-elípticos. **G, H, I:** Na região média do vaso deferente nota-se um epitélio secretor monoestratificado e uma camada de tecido muscular envolto por tecido conjuntivo e os espermatóforos estão imersos em secreção acidófila. **J, K, L:** A região posterior do vaso deferente possui epitélio estratificado cúbico com núcleos irregulares e camada de tecido muscular, envoltos por tecido conjuntivo, no lúmen deste vaso

encontram-se espermátóforos imersos em uma grande quantidade de secreção acidófila. **Figura A, D, G e J:** *Damithrax hispidus*. **Figura B, E, H e K:** *Mithrax aculeatus*. **Figura C, F, I e L:** *Mithraculus forceps*. AVDp: porção proximal do vaso deferente anterior; AVDd: porção distal do vaso deferente anterior; MVD: região média do vaso deferente; PVD: região posterior do vaso deferente; SF: espermátóforo; SZ: espermatozoide.

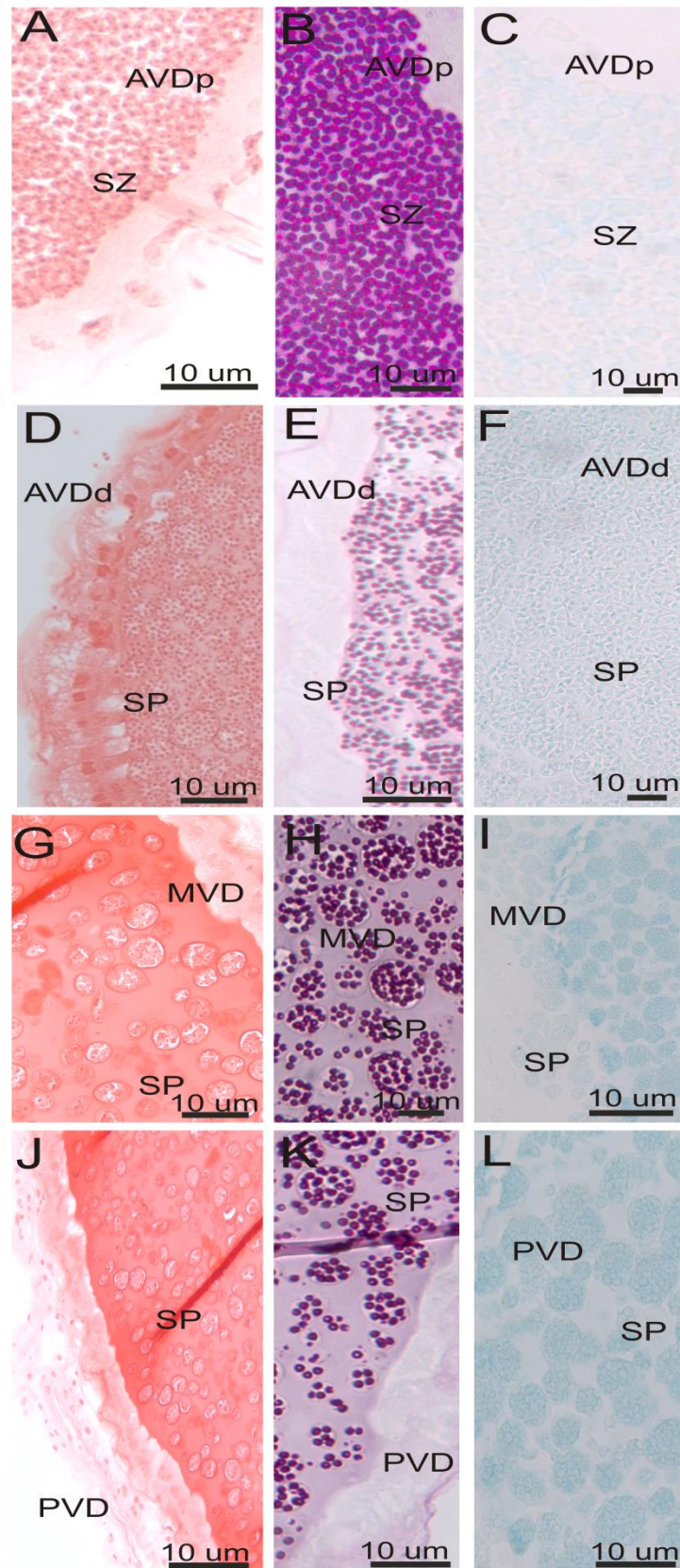


Figura 4. Histoquímica dos vasa deferentia de *Damithrax hispidus*, *Mithrax aculeatus* e *Mithraculus forceps*. **A:** AVDp com secreção negativa para proteínas. **B:** AVDp apresenta secreção reativa para polissacarídeos neutros. **C:** Secreção negativa para

polissacarídeos ácidos. **D:** Secreção reativa para proteínas. **E:** secreção reativa para polissacarídeos neutros, a qual auxilia na separação das massas espermáticas em espermátóforos. **F:** Secreção fracamente positiva para polissacarídeos ácidos. **D, E, F:** Os espermátóforos na AVDD são caracterizados pela presença de parede glicoproteica, com reação fortemente positiva para proteínas e positiva para polissacarídeos neutros e positiva para os ácidos. **G e J:** As secreções encontradas na MVD e PVD mostram reação fortemente positiva para proteínas, **H e K:** positiva polissacarídeos neutros. **I e L:** secreção da MVD e PVD positiva para polissacarídeos ácidos. AVDP: porção proximal do vaso deferente anterior; AVDD: porção distal do vaso deferente anterior; MVD: região média do vaso deferente; PVD: região posterior do vaso deferente; SP: espermátóforo; SZ: espermatozoide.

Conclusões

O estudo da ultraestrutura dos espermatozoides se mostrou uma ferramenta muito eficiente no estabelecimento de relações de parentesco. Uma vez que, a partir da morfologia do espermatozoide as espécies podem ser agrupadas em gêneros. O estudo da espermiotaxonomia, principalmente com animais da mesma espécie de regiões zoogeográficas distantes mostra a precisão desta ferramenta para o relacionamento de espécies. A filogenia molecular deste trabalho realizada com base no mapeamento dos caracteres dos espermatozoides mostrou os mesmos resultados encontrados na última revisão filogenética e morfológica para Mithracidae, bem como a ultraestrutura dos espermatozoides. Desta maneira, estas duas ferramentas são complementares, evidenciando resultados mais completos.

A divisão de espécies dentro dos gêneros *Mithrax* e *Mithraculus*, mostra-se possível através deste trabalho e principalmente a comprovação da classificação de ambos como gêneros separados.

Nas espécies de Mithracidae que tiveram o receptáculo seminal estudados notou-se a ausência de pacotes espermáticos e o receptáculo seminal do tipo ventral, sendo o tipo mais comum para Majoidea. A ausência de pacotes espermáticos indica que o receptáculo seminal funciona como uma grande câmara de fertilização, já que não é possível identificar se a fêmea copula com mais de um macho, sendo assim impossível selecionar um esperma específico. Ao redor dos espermatozoides que se encontram no lúmen do receptáculo seminal notou-se uma secreção positiva para polissacarídeos ácidos, que é proveniente dos machos, uma vez que a região mesodérmica deste, foi negativa para azul de Alcian.

O sistema reprodutor masculino seguiu o padrão encontrado em Brachyura, entretanto, com a ausência de glândulas acessórias no vaso deferente. Tais glândulas parecem estar fortemente relacionadas a formação de pacotes espermáticos, já que as espécies descritas na literatura que não possuem glândulas acessórias também não possuem pacotes espermáticos, fato que foi demonstrado com as espécies de Mithracidae deste estudo. Sendo assim, para investigações futuras esta característica deve ser examinada com cuidado e levada em conta principalmente para os Majoidea.

O estudo do sistema reprodutor se mostrou relevante para o entendimento dos mecanismos de transferência e competição espermática. Apesar das espécies de Mithracidae estudadas terem um sistema reprodutor simples, o mecanismo de funcionamento se mostrou extremamente interessante. Assim, o conhecimento sobre a

biologia reprodutiva é imprescindível ainda mais para este grupo de caranguejos aranha, os quais mostram elevado índice de utilização em aquariofilia marinha, área bastante crescente no Brasil. Assim, a verificação das estratégias reprodutivas com a ausência de competição espermática é informação crucial para futuros estudos de criação comercial, o que levaria ao declínio da atividade de retirada de animais da natureza.

Referências da introdução

- Baeza JA, Bolaños JA, Fuentes S, Hernandez JE, Lira C, Lopez R. Molecular phylogeny of enigmatic Caribbean spider crabs from the *Mithrax–Mithraculus* species complex (Brachyura: Majidae: Mithracinae): ecological diversity and a formal test of genera monophyly. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2010, 90, 851–858.
- Batoy CB, Sarmago JF, Pilai BC. Breeding season, sexual maturity and fecundity of the blue crab *Portunus pelagicus* (L.) in selected coastal waters in Leyte and Vicinity, Phillipines. *Annals of Tropical Research*. 1989, 9, 157-177.
- Bolaños JA, Scelzo, MA. Larval development of the spider crab *Mithrax verrucosus* Milne-Edwards, reared in the laboratory (Decapoda: Brachyura: Majidae). *The American Zoologist*. 1981, 21, 989.
- Bolaños JA, Lares LB, Hernández JE. Desarrollo larval de *Mithrax caribbaeus* Rathbun, 1920 (Crustacea: Decapoda: Majidae) realizado en condiciones de laboratorio. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*. 1990, 29, 67–89.
- Bolaños JA, Hernández G, Lira C. *Mithraculus cinctimanus* Stimpson, 1860 y *Speloeophorus pontifer* (Stimpson, 1871) (Crustacea: Decapoda: Brachyura), dos nuevas adiciones a la carcinofauna venezolana. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*. 2000, 39, 25–31.
- Camargo TR, Rossi N, Castilho AL, Costa RC, Mantelatto FL, Zara FJ. Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology*. 2015, DOI 10.1007/s00435-015-0287-2.
- Castilho GG, Ostrensky A, Pie M R, Boeger WA. Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*. 2008, 89: 157–161.
- Desmarest AG. Malacostracés. in: *Dictionaire des Sciences Naturelle*, 1825. 28.
- Diesel R. Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *Journal of Crustacean Biology*. 1989, 9, 266–277.

- Diesel R. Sperm competition and mating behaviour in Brachyura. In: Bauer RT, Martin JW, editors. Crustacean Sexual Biology. Columbia University Press, New York, NY. 1991, pp. 145–163.
- Erkan M, Tunali Y, Balkis H, Oliveria E. Morphology of Testis and Vas Deferens in the Xanthoid Crab, *Eriphia verrucosa* (ForskÅL, 1775) (Decapoda: Brachyura). Journal of Crustacean Biology. 2009, 29: 458-465.
- Fransozo A, Hebling NJ. Desenvolvimento pós -embrionário de *Mithrax hispidus* (herbst, 1790) (Decapoda, Majidae) em laboratório. Ciência e Cultura. 1982, 34, 385–395.
- Garth JS. Brachyura of the Pacific coast of America: Oxyrhyncha. Allan Hancock Pacific Expeditions. 1958, 21,1–499
- González-Pisani X, Barón P, López-Greco LS. Functional anatomy of the female reproductive systems of two spider crabs (Decapoda, Majoidea). Invertebrate Biology. 2012. 131:61–74.
- Guinot D, Tavares M. Une nouvelle famille de crabes du Crétacé, et la notion de Podotremata Guinot, 1977 (Crustacea, Decapoda, Brachyura). Zoosystema. 2001, 23: 507–546.
- Guinot D, Quenette G. The spermatheca in Podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implications. Zoosystema. 2005, 27, 267–342.
- Guinot D, Tavares M, Castro P. Significance of the sexual openings and supplementary structures on the phylogeny of brachyuran crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura), with new nomina for higherranked podotreme taxa. Zootaxa. 2013, 3665, 1–414.
- Hartnoll RG. Morphology of the genital ducts in female crabs. Zoological Journal of the Linnean Society. 1968, 47,279–300.
- Hendrickx ME. Los Cangrejos Braquiuros (Crustacea: Brachyura: Majoidea y Parthenopoidea) del Pacífico Mexicano. (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO] e Instituto de Ciencias del Mar y Limnología: UNAM, México. 1999.
- Hinsch GW, Walker MH. The Vas Deferens of the Spider Crab, *Libinia emarginata*. Journal of Morphology. 1974, 143: 1-20.

- Jamieson BGM. Phylogeny of the Brachyura with particular reference to the Podotremata: evidence from a review of sperml ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philosophical transactions: Biological Sciences*. 1994, 345, 373–393.
- Jamieson BGM, Tudge CC. Crustacea-Decapoda. 1–95pp. In: Jamieson, BGM. (ed.), *Reproductive Biology of Invertebrates*. Vol. IX, part C: Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny: John Wiley & Sons, Chichester. 2000.
- Jivoff P, Hines AH, Quackenbush, LC. Reproductive Biology and Embrionic Development, 255-286 p. In, Cronin, L. E.; Kennedy, V. S. (eds.), *The Blue Crab *Callinectes sapidus**. Maryland, Maryland Sea Grant College. 2007.
- Johnson PT. *Histology of the Blue Crab *Callinectes sapidus*: A Model for the Decapoda*. Praeger, New York. 1980.
- Klaus S, Schubart CD, Brandis D. Ultrastructure of sperm and spermatophores of old world freshwater crabs (Brachyura: Potamoidea: Gecarcinucidae, Potamidae, and Potamonautidae). *Journal of Morphology*. 2009, 270, 175–193.
- Klaus S, Brandis D. Evolution of sperm morphology in potamid freshwater crabs (Crustacea: Brachyura: Potamoidea). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2010, 161: 5.
- Klaus S, Münzner S, Modenbach AC, Streit B, Tudge CC. Spermatophore formation and spermultrastructure of *Sundathelphusa philippina* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*. 2013. 94: 267–272.
- Krol RM, Hawkins WE, Overstreet RM. Reproductive components, pp. 295-343. In, Harrison, F. W.; Humes, A. G. (eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 10: Decapod Crustacea, Wiley-Liss Inc., New York. 1992, 474.
- McLay CL & López-Greco LS. A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: how did a race to be first become a race to be last? *Zoologischer Anzeiger*. 2011, 250, 378–406.
- Melo GAS. *Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do Litoral Brasileiro*. São Paulo. 1996.
- Moriyasu M., Benhalima K. Snow crabs, *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius, 1788) (Crustacea: Majidae) have two types of spermatophore: hypotheses on mechanism of fertilization and population reproductive dynamics in the southern Gulf of St. Lawrence, Canada. *Journal of Natural History*. 1998, 32: 1651-1665.

- Nagao J, Munehara H. Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. Fisheries Science. 2003, 69: 1200–1208.
- Nascimento FA, Zara FJ. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). Nauplius. 2013, 21(2): 161-177.
- Nicolau CF, Nascimento AA, Machado-Santos C, Sales A, Oshiro LM Y. Gonads of males and females of the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Grapsidae: Brachyura: Decapoda): a histological and histochemical view. Acta Zoologica (Stockholm). 2012, 93: 222–230.
- Ng PKL, Guinot D, Davie PJF. Systema Brachyurorum: Part I. an annotated checklist of extant Brachyuran crabs of the world. Raffles Bulletin of Zoology, 2008, 17, 1–286.
- Pohle GW, Marques FPL. Larval stages of *Paradasygius depressus* (Bell, 1835) (Brachyura: Majidae) and a phylogenetic hypothesis for 21 genera of Majidae. Proceedings of the Biological Society of Washington. 2000, 113, 739–760.
- Rathbun MJ. The spider crabs of America. Bulletin of the United States National Museum. 1925, 129, 1–613.
- Rhyne AL, Fujita Y, Calado. Larval development and 1st crab of *Mithraculus sculptus* (Decapoda: Brachyura: Majoidea: Mithracidae) described from laboratory-reared material. Journal of the Marine biological association of the United Kingdom. 2004, 86, 1133–1147.
- Santana W, Pohle G, Marques F. Zoeal stages and megalopa of *Mithrax hispidus* (herbst, 1790). (Decapoda: Brachyura: Majoidea: Mithracidae): a reappraisal of larval characters from laboratory cultured material and review of larval of *the Mithrax–Mithraculus* species complex. Invertebrate Reproduction & Development. 2003, 44, 1, 17–32.
- Sainte-Marie G, Sainte-Marie B. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). II. Multiple types of sperm cells and of spermatophores in the Spermathecae of mated females. Canadian Journal of Zoology. 1998, 77: 451–462.
- Santos C M, Lima G V, Nascimento A A, Sales A, Oshiro L M Y. Histological and histochemical analysis of the gonadal development of males and females of *Armases rubripes* (Rathbun 1897) (Crustacea, Brachyura, Sesamidae). Brazilian Journal of Biology. 2009, 69: 161-169.

- Simeó, C.G.; Ribes, E. and Rotllant, G. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Tissue and Cell*. 2009, 41: 345-361.
- Tiseo GR, Mantelatto FL, Zara FJ. Is cleistospermy and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*. 2014, 34(6), 704-716.
- Tudge CC. Sperml morphology and its bearing on decapod phylogeny. 101-119 pp. In: Martin JW, Crandall KA, Felder DL (eds) *Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean issues 18*. Taylor and Francis/CRC Press, Boca Raton. 2009.
- Tudge CC, Scheltinga DM, Jamieson BGM, Guinot D, Forges BR. Comparative ultrastructure of the sperm of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. *Acta Zoologica (Stockholm)*. 2014, 95, 1–20.
- Wagner HP. The genera *Mithrax* Latreille, 1818 and *Mithraculus* White, 1847 (Crustacea: Brachyura: Majidae) in the Western Atlantic Ocean. *Zoologische Verhandelingen*. 1990, 264, 1–65.
- White A. List of the specimens of Crustacea in the collection of the British Museum. London: British Museum. 1847.
- Windsor AM, Felder DL. Molecular phylogenetics and taxonomic reanalysis of the family Mithracidae Macleay (Decapoda: Brachyura: Majoidea). *Invertebrate Systematics*. 2014, 28, 145–173.
- Wolcott DL, Hopkins WB, Wolcott TG. Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. Effects of male mating history, male size, and season. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2005.319: 43-55.
- Zara FJ, Toyama MH, Caetano FH, López-Greco LS. Spermatogenesis, Spermatophore, and Seminal Fluid Production in the adult Blue Crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*. 2012, 32:249-262.
- Zara FJ, Pereira RR, Sant'anna BS. Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribarius*. *The Biological Bulletin*. 2014, 227, 19-32.

