

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 03/10/2024.

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ZOOLOGIA)**

---

**Caracterização do sistema reprodutor masculino e feminino em Portunoidea sob um contexto evolutivo: existem padrões de produção, transferência e armazenamento do fluido seminal?**

**CAMILA DE OLIVEIRA ASSUGENI**

**Rio Claro - SP  
2024**

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ZOOLOGIA)**

---

**Caracterização do sistema reprodutor masculino e feminino em Portunoidea sob um contexto evolutivo: existem padrões de produção, transferência e armazenamento do fluido seminal?**

**CAMILA DE OLIVEIRA ASSUGENI**

**Orientador: Fernando José Zara**

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

**Rio Claro - SP  
2024**

A851c Assugeni, Camila de Oliveira  
Caracterização do sistema reprodutor masculino e feminino em Portunoidea sob um contexto evolutivo: existem padrões de produção, transferência e armazenamento do fluido seminal? / Camila de Oliveira Assugeni. -- Rio Claro, 2024  
205 p.  
  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Fernando José Zara  
  
1. Biologia reprodutiva. 2. Sistemática filogenética. 3. Brachyura. 4. Sistema reprodutor masculino. 5. Sistema reprodutor feminino. I. Título.

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E FEMININO EM PORTUNOIDEA SOB UM CONTEXTO EVOLUTIVO: EXISTEM PADRÕES DE PRODUÇÃO, TRANSFERÊNCIA E ARMAZENAMENTO DO FLUIDO SEMINAL?

**AUTORA: CAMILA DE OLIVEIRA ASSUGENI**

**ORIENTADOR: FERNANDO JOSÉ ZARA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas (Zoologia), pela Comissão Examinadora:

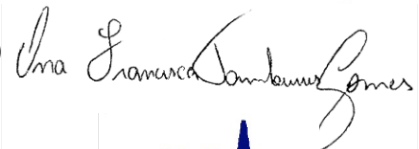
Prof.Dr. FERNANDO JOSÉ ZARA (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / UNESP Jaboticabal



Prof. Dr. FERNANDO LUIS MEDINA MANTELATTO (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / USP Ribeirão Preto



Profa. Dra. ANA FRANCISCA TAMBURUS GOMES (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / USP Ribeirão Preto



Prof. Dr. RAFAEL ROBLES (Participação Virtual)  
Facultad de Ciencias Químico Biológicas / Universidad Autónoma de Campeche



Prof. Dr. ÁLVARO LUIZ DIOGO REIGADA (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / Universidade Santa Cecília



Rio Claro, 03 de outubro de 2022

## **Agradecimentos**

Aos processos nº 2010/50188-8 e nº 2018/13685-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo financiamento de minha bolsa de Doutorado (Processo 140080/2018-0).

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

Ao Laboratório de Morfologia de Invertebrados do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP Campus de Jaboticabal que me proporcionou todas as condições físicas, laboratoriais e intelectuais para o desenvolvimento de minha tese.

Ao Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) da UNESP, IB, Campus de Rio Claro pelo suporte na minha formação e pela resolução de problemas, que levaram a dilatação de prazo de defesa devido a pandemia.

Ao meu orientador Fernando J. Zara pela confiança depositada e oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela paciência, por sempre me ensinar, pelas inúmeras discussões científicas e acima de tudo por todo apoio pessoal e pela amizade. Obrigada pelo exemplo de ética e conduta acadêmica.

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

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da USP de Ribeirão Preto, onde aprendi muito com a Tuca, obrigada pela grande atenção.

Ao Laboratório de Histotécnica da USP de Ribeirão Preto, onde processei grande parte das amostras. Agradeço também a Dona Vani que me ensinou esta nova técnica.

Ao BioMolPep, do Instituto de Biociências, Campus São Vicente, pelos ensinamentos, pelas tentativas e grande esforço em me ajudar, em especial o Professor Marcos Toyama e a Mariana.

Ao Departamento de Química da USP de Ribeirão Preto e ao técnico Eduardo Crevelin pelas inúmeras discussões e tentativas de uma metodologia aplicável para minhas amostras, pelos ensinamentos e discussões.

Á Deus por tudo, principalmente por toda força que consegui ter nesses períodos tão difíceis que vivi durante meu doutorado, senão fosse a fé, nem sei o que seria de mim. Agradeço também por todas as oportunidades e por sempre me proteger...

Aos meus pais Eliana e Edilson (*in memoriam*) por terem me possibilitado de realizar sonhos, os quais vocês não tiveram a oportunidade de realizar e que agora se tornaram nossos sonhos! Principalmente um grande obrigada e um eterno “Eu te amo” para meu pai, que mesmo não estando aqui neste dia, me convenceu a cursar o Doutorado, quando eu estava relutante. Então pai, este título é pra você (espero que esteja orgulhoso de mim, onde quer que esteja)!! E também muito obrigada a você mãe, que juntas somos mais fortes e imbatíveis! Só nós sabemos a força que nos damos. Amo demais vocês!

A minha irmã Leticia por ser minha melhor amiga, aguentar meus desesperos, grosserias, compartilhar “rolês”, confidências e tudo que só nós sabemos. Obrigada por estar me acompanhando em todos os momentos nessa jornada, nem sei o que seria de mim sem você! Te amo muito!!

Aos meus novos colegas de trabalho (PEI José Velloni) pela equipe que formamos e por todos os momentos compartilhados.

Marcia Mataqueiro, muito obrigada por todo acolhimento, ensinamentos, paciência, por cuidar de mim, por me ouvir, pelos conselhos, por todo apoio técnico, sem você eu não teria chegado até aqui e principalmente muito obrigada pela grande amizade que levarei pra sempre!

Maria Alice Garcia Bento, serei eternamente grata por tudo que compartilhamos nestes anos, agradeço pela amizade, abrigo, ensinamentos, discussões científicas, risadas, choros, estresses compartilhados, pelo apoio que me deu (jamais esquecerei), por fazer tanto por mim, enfim, foi uma longa, difícil e também muito feliz jornada, crescemos muito juntas, criamos confiança em nós mesmas e espero que esta amizade permaneça pra sempre! MUITÍSSIMO obrigada pela ajuda nesta tese. Amo você, amiga!!  
rnanda Salti, muito obrigada por tudo que vivemos na FCAV, foram tempos incríveis e pela amizade que tenho certeza que permanecerá pra sempre, obrigada pelos “podcasts” que enviamos uma a outra. Muito obrigada por sua ajuda na minha Tese, além de todo apoio emocional, sem você seria quase impossível! Amo você!!

Bárbara Paiva, minha comadre... Parceira de vida e de momentos inesquecíveis! Você foi imprescindível neste período todo, desde quando nos conhecemos, não desgrudamos mais, você sempre esteve presente e muito disposta a ajudar, jamais esquecerei de tudo que sempre fez e faz por mim, de tudo que vivemos, das risadas e dos tombos... Amo muito você!!

Marcia Macri, obrigada pela amizade, pelos ensinamentos, puxões de orelha, comidas boas, você foi imprescindível neste percurso todo!!

## **Resumo**

Nesta tese conciliou-se os caracteres morfológicos e químicos do sistema reprodutor masculino, incluindo espermatóforos, espermatozoides, fluido seminal e também os caracteres do sistema reprodutor feminino (tipo de receptáculo seminal, armazenamento espermático e estratégia de cópula) em Portunoidea, que integrados a filogenia molecular permitiram contar brevemente a história da recuperação do caráter ancestral com base no que se conhece mundialmente. Os resultados deste trabalho foram eficazes na recuperação do estado ancestral de caráter e conseguiram corroborar e solucionar em partes as controvérsias existentes na classificação dos Portunoidea, dado a importância do entendimento da relação entre os padrões morfológicos e evolutivos desta superfamília. Esta tese é o ponto inicial para a elucidação dos diferentes padrões de acasalamento, deiscência dos espermatóforos e cópula em Portunoidea. Ainda, são necessários diferentes gêneros desta superfamília, que não foram estudados sobre este ponto de vista para finalizar a história evolutiva do sistema reprodutor dentro deste importante clado de Brachyura.

**Palavras-chave:** espermatozoide, Portunidae, receptáculo seminal, sistema reprodutor.

## **Abstract**

In this thesis, the morphological and chemical characters of the male reproductive system were reconciled, including spermatophores, spermatozoa, seminal fluid and also the characters of the female reproductive system (type of seminal receptacle, sperm storage and copulation strategy) in Portunoidea, which integrated the phylogeny molecular analysis allowed us to briefly tell the story of the recovery of the ancestral character based on what is known worldwide. The results of this work were effective in recovering the ancestral state of character and managed to corroborate and partly solve the existing controversies in the classification of the Portunoidea, given the importance of understanding the relationship between the morphological and evolutionary patterns of this superfamily. This thesis is the starting point for the elucidation of different mating patterns, spermatophore dehiscence and copulation in Portunoidea. Still, different genera of this superfamily, which have not been studied from this point of view, are needed to finalize the evolutionary history of the reproductive system within this important clade of Brachyura.

**Keywords:** Portunidae, reproductive system, seminal receptacle, sperm

## Sumário

<b>Introdução e revisão da literatura.....</b>	<b>10</b>
<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>23</b>
<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>77</b>
<b>Capítulo 3 .....</b>	<b>109</b>
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>144</b>
<b>Considerações finais .....</b>	<b>167</b>

## 1. Introdução da tese e revisão da literatura

### 1.1 Contextualização do grupo de estudo

A infraordem Brachyura é um dos grupos mais diversos dentro de Crustacea, com aproximadamente 7.000 espécies descritas ocorrendo entre os ambientes marinho, de água doce e terrestres (Ng et al., 2008; De Grave et al., 2009; Tsang et al., 2014, Evans, 2018). Nesta infraordem está inserida família Portunidae Rafinesque, 1815, que compreende 7 subfamílias, 40 gêneros e 307 espécies predominantemente marinhas, embora algumas possam entrar em sistemas estuarinos com reduzida salinidade, a partir da foz de rios até profundidades de até 75m (Williams, 1984; Ng et al., 2008; De Grave et al., 2009). Os Portunidae ocorrem ao longo da costa do Atlântico Ocidental, incluindo a costa leste dos Estados Unidos, Antilhas, Venezuela, Guianas, Brasil, Uruguai e Argentina (Melo, 1996). Muitas espécies de siris dessa superfamília constituem importante recurso pesqueiro na América, Europa e Japão, podendo ser alvo direto de pescarias ou integrarem a fauna acompanhante em arrastos de pescas camaroeiras, como é o caso principalmente, das espécies de *Callinectes* Stimpson, 1860 (Melo, 1996; Mantelatto et al., 2009; Boos et al., 2010). Além disso, em regiões de estuário estes siris são utilizados como fonte de renda e alimentação para população ribeirinha, que por sua vez utilizam métodos rudimentares de captura. No Brasil, os portunídeos estão representados por 21 espécies, sendo 19 delas nativas, pertencentes a 8 gêneros: *Achelous*, *Arenaeus*, *Callinectes*, *Coenophthalmus*, *Cronius*, *Laleonectes*, *Ovalipes* e *Portunus*. Existem registros, também, de duas espécies invasoras pertencentes aos gêneros *Scylla* e *Charybdis* (Melo, 1996; Mantelatto et al., 2009; Boos et al., 2010, Pinheiro et al., 2016). Segundo Pita et al. (1985), *Callinectes danae* Smith, 1869 é o mais abundante portunídeo brasileiro capturado em bacias com influxo moderado a grande de água doce, como o complexo estuarino de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo e o quinto Brachyura mais abundante em Ubatuba, Estado de São Paulo (Branco e Masunari, 1992; Costa e Negreiros-Fransozo, 1998). A espécie *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 se destaca por sua distribuição cosmopolita, com registros de introdução reportada para Atlântico Oriental, Mar do Norte, Mar Mediterrâneo, Mar Adriático, Mar Negro, e na região do Indo-Pacífico (Japão) (Williams, 1974; Fiussen & Fonseca, 2009). Uma vez que estas espécies possuem elevado interesse econômico sendo alvo de exploração pelo homem para utilização na alimentação, é importante que se entenda a relação entre os padrões morfológicos e evolutivos das famílias de Portunoidea que ainda continua pouco compreendida, frente a sua grande diversidade de representantes, para futura criação e manutenção destas espécies em cativeiros.

## 1.2 Sistema reprodutor masculino

De uma maneira geral, o sistema reprodutor em *Brachyura* é 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; López-Greco, 2013, Mclay & Becker, 2015). Segundo Nagao & Munehara (2003), o testículo pode ser classificado como do tipo lobular ou tubular. O tipo lobular é constituído por vários lóbulos com células no mesmo estágio de maturação, nos quais são conectados por um ducto seminífero central, sendo o padrão mais comum aos caranguejos (Johnson, 1980; Diesel, 1989; Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2009; Zara et al., 2012). Por sua vez, o tipo tubular é constituído por um túbulo único e convoluto, preenchido em seu interior por células germinativas em diferentes estágios sequenciais de maturação (Chiba & Honma, 1972; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1999; Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2010). Estas células caracterizam os diferentes estágios da espermatogênese e espermiogênese. As espermatogônias são caracterizadas por apresentar grande diâmetro nuclear e são localizadas nos centros germinativos, ocupando a região mais periférica dos túbulos seminíferos (Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2009). Os espermátides são encontrados na região mais intermediária dos túbulos seminíferos, conhecida por zona de maturação ou transformação (Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2010). A zona de evacuação é constituída pelo tubo coletor, nos quais armazenam e carregam espermatozoides maduros através dos ductos seminíferos em direção ao vaso deferente (Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2009). De maneira geral, o vaso deferente em *Brachyura* é dividido em três diferentes regiões, tais como: a anterior (AVD), responsável pela formação dos espermatóforos e as regiões média (MVD) e posterior (PVD), as quais produzem grandes quantidades de secreções e armazenam os espermatóforos até a cópula (Simeó et al., 2009; Nicolau et al., 2012; Zara et al., 2012; Mclay & Becker, 2015). Em algumas espécies, a MVD e PVD podem exibir bolsas laterais, glândulas acessórias, expansões laterais, divertículos ou cecos, como observado em alguns representantes de *Portunoidea* Rafinesque, 1815, *Majoidea* Samouelle, 1819, *Grapsoidea* e *Ocypodoidea* (Johnson, 1980; Jivoff et al., 2007; Castilho et al., 2008; Simeó et al., 2009; Zara et al., 2012; Tiseo et al., 2014; Antunes et al., 2016, 2018). Tais estruturas produzem grandes quantidades de secreções que podem ser adicionadas ao fluido seminal no vaso deferente ou são expansões do vaso, responsáveis pelo aumento de fluido seminal, como ocorrem nos siris azuis (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013).

### 1.3 Sistema reprodutor feminino

O sistema reprodutor feminino de Brachyura é constituído por um órgão bilateral de origem ectomesodérmica denominado receptáculo seminal, cuja função é armazenar espermatozoides para posteriores eventos de fertilização (Diesel 1989, 1991; Guinot & Quenette, 2005; López-Greco et al., 2009; McLay & López-Greco, 2011). Este órgão é chave para determinar desde padrões de armazenamento, manutenção e até evidências de competição espermática (Diesel, 1991). Na superfamília Portunoidea, assim como em outros Brachyura, o receptáculo seminal é conectado aos ovários por meio do oviduto. O receptáculo seminal fica dentro da cavidade cefalotorácica abaixo do coração, circundada por parte da musculatura de locomoção associada aos apódemas internos (Pyle & Cronin, 1950). O receptáculo seminal pode ser classificado como dorsal, ventral, ou intermediário de acordo com a posição de inserção do oviduto em relação à vagina, a qual se localiza ventralmente (Diesel, 1991, McLay & López-Greco, 2011, Zara et al., 2014). Apesar de ambas terem se derivado de uma característica ancestral totalmente ectodérmica chamada espermateca, os receptáculos seminais tipo dorsal são considerados o mais próximo da condição ancestral (McLay & López-Greco, 2011). Em Portunidae o padrão do receptáculo seminal é majoritariamente dorsal, como ocorre em *Arenaeus cribarius* (Zara et al., 2014), *C. sapidus* (Johnson, 1980) e *Portunus pelagicus* Linnaeus 1758 (Bawab & El-Sherief, 1988). Porém em *Portunus hawaiiensis* Herbst 1783 o receptáculo seminal foi classificado como do tipo intermediário (Ryan, 1967, Diesel, 1991; McLay & López-Greco, 2011). A diferença nos tipos de receptáculos pode estar relacionada à cópula com mais de um macho, levando a competição espermática (Diesel, 1989, 1991; McLay & López-Greco, 2011). A competição espermática normalmente é limitada em Brachyura, pois os espermatozoides são imóveis e desprovidos de flagelo (Krol et al., 1992). Esta competição torna-se ainda menor com os diversos mecanismos que impedem a poliandria como a cópula com a fêmea em durante a muda, seguido pela guarda do macho o qual pode depositar um tampão de secreção denominado plug-espermático ou, em outros casos, a fêmea realiza a postura dos ovos logo após a cópula (McLay & López-Greco, 2011). Contudo, com a possibilidade da ausência destas características durante a cópula, como observado em Thalamitinae (Norman et al., 1999; Watanabe et al., 2022), podem diminuir as chances e a importância da competição espermática, visto que a possibilidade de poliandria torna-se plausível e vantajosa para aumento da variabilidade genética da prole. Em particular para alguns representantes das famílias Cancridae e Portunidae, o fluido seminal produzido no vaso deferente dos machos forma o plug-espermático no receptáculo seminal (Hartnoll, 1969; Hinsch

1988). Este plug preenche o receptáculo seminal impedindo ou dificultando a introdução de material genético de outros machos, limitando ou evitando a competição espermática (Hines et al., 2003; Hartnoll, 1969, Wolcott et al., 2005; Zara et al., 2012, 2014). Porém, em sincronia com o desenvolvimento ovariano, o plug-espermático desaparece e o receptáculo seminal torna-se menor e mais flácido, como observado em outras espécies de Portunoidea: como no Carcinidae *Car. maenas* (Spalding, 1942) e nos Portunidae *P. hawaiiensis* (Ryan, 1967), *P. pelagicus* (Bawab & El-Sherief 1988), *C. danae* (Zara et al., 2012) e *Ar. cribrarius* (Pinheiro & Fransozo, 2002; Zara et al., 2014). Por sua vez, no Thalamitinae *Charybdis smithii* não existe evidência de plug no receptáculo (Balasubramanian & Suseelan, 1998). Segundo Hartnoll (1968, 1969), a vagina em Eubrachyura pode ser classificada morfológicamente como do tipo simples ou côncava (Hartnoll, 1968, 1969). A vagina é uma região revestida por cutícula que se abre para o externo através da vulva e pode ser encontrada associada a forte musculatura, auxiliando no processo de contração e expansão da parede durante a transferência espermática e desova (McLay & López-Greco, 2011; McLay & Becker, 2015). Desta maneira, a fêmea parece apresentar papel ativo nestes processos por promover a expansão da vagina possibilitando a entrada do órgão masculino na cópula e a saída dos ovócitos após a fertilização interna (Becker et al., 2011). Os principais compostos químicos identificados nas secreções do receptáculo seminal são os lipídeos, proteínas e os polissacarídeos (Jeyalectumie e Subramoniam, 1987, 1991; Jayasankar, 1997; Zara et al., 2014; Antunes et al., 2016), sendo que principalmente os dois últimos, parecem atuar na manutenção dos espermatozoides no interior do receptáculo seminal (Jayasankar & Subramoniam, 1999). Para *S. serrata* foi mostrado que a ação de uma proteína presente no fluido seminal destes caranguejos possui atividade contra microorganismos (Jayasankar & Subramoniam, 1999). Além disso, foi observado por Assugeni & Zara (2022), em algumas espécies de Mithracidae MacLeay, 1838, uma secreção proveniente do fluido seminal com reação para polissacarídeos ácidos ao redor dos espermatozoides no lúmen do RS. Tal secreção parece participar da manutenção dos espermatozoides e possui provável atividade antibacteriana. A ação enzimática no plasma seminal também está relacionada ao metabolismo espermático, uma vez que, mesmo passando de um meio anaeróbico (vaso deferente) para outro aeróbico (receptáculo seminal), os espermatozoides permanecem viáveis, o que foi comprovado por experimentos que demonstram a absorção de oxigênio pelos espermatozoides no interior do RS (Jayasankar & Subramoniam, 1999). Desta maneira, a manutenção dos espermatozoides no interior do receptáculo seminal pode estar relacionada ao metabolismo da própria estrutura de

armazenamento, bem como ser auxiliada por compostos presentes no fluido seminal proveniente do macho e/ou da união das duas estratégias.

#### **1.4 Ultraestrutura dos espermatozoides**

A ultraestrutura dos espermatozoides ou espermiotaxonomia tem sido utilizada como uma importante ferramenta na resolução de problemas filogenéticos e taxonômicos (Jamieson, 1991; 1994; Jamieson & Tudge 2000; Tudge et al., 2012; Camargo et al., 2017, 2020; Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018). Em geral, o espermatozoide de Brachyura é uma célula imóvel e aflagelada, constituída por um acrossoma esférico e estruturalmente complexo (Tudge, 2009). O acrossoma mostra em um dos polos, oposto ao núcleo, o opérculo eletrondenso, o qual pode ser perfurado ou não. Abaixo do opérculo encontra-se a camada subopercular e nesta, podem existir estruturas importantes como o anel opercular acessório, observado somente nos Eubrachyura (Jamieson & Tudge, 2000). Internamente, o acrossomo pode apresentar zonas concêntricas desde a periferia até o centro. Estas zonas ou camadas podem receber nomes específicos e caracterizar determinados grupos de crustáceos. Em geral, tais zonas são comumente classificadas por: zona acrossomal interna, mediana, raiada e externa (para revisão ver Jamieson, 1994). Estas zonas podem, ainda, apresentar características particulares, como lamelas concêntricas (Jamieson, 1994; Jamieson et al., 1995; Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009). Centralmente ao acrossoma encontra-se a câmara perforatorial, a qual é uma invaginação do citoplasma periférico que apresenta ampla variação de forma (Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009). O núcleo não mostra cromatina condensada e podem constituir os braços radiais, com ou sem a presença de citoesqueleto (microtúbulos) (Hinsch, 1986; Jamieson, 1994; Benetti et al., 2008; Klaus et al., 2009; Tudge, 2009). Em alguns grupos, como Majoidea, o núcleo do espermatozoide pode apresentar um processo mediano posterior, o qual é um prolongamento no polo oposto ao opérculo com ou sem microtúbulos (Jamieson, 1994; Tudge et al., 2012). Tendo em vista ao panorama geral apresentado, este estudo busca descrever as morfologias do sistema reprodutor masculino e feminino das espécies de Portunoidea que ocorrem no Brasil, realizando uma comparação entre elas buscando elucidar se os padrões obtidos coevoluíram com o a morfologia, produção e composição química do fluido seminal, do receptáculo seminal e ultraestrutura dos espermatozoides.

## 1.5 Filogenia

A sistemática de Portunoidea se desenvolveu a partir de uma base estabelecida por autores do século 19 e 20 (Dana, 1852; Milne-Edwards, 1861; Miers, 1886; Balss, 1922; Rathbun, 1930). A partir de então, as classificações sistemáticas deste grande grupo sempre passou por extensas revisões, que vem sendo constantemente atualizadas e complementadas por diversos autores (Stephenson, 1972; Apel & Spiridonov, 1998; Karasawa et al., 2008; Ng et al., 2008; Schubart & Reuschel, 2009; Mantelatto et al., 2009, Ng, 2011; Spiridonov et al., 2014; Evans, 2018; Mantelatto et al., 2018; Windsor et al.; 2019; Spiridonov, 2020).

Spiridonov et al. (2014) a partir de análises morfológicas e moleculares, propuseram mudanças no arranjo filético da superfamília Portunoidea Rafinesque, 1815, a qual era composta por oito famílias, uma vez que a subfamília Polybiinae Ortmann, 1893 foi elevada ao status de família. Ao mesmo tempo em que foi proposta a família Ovalipidae para abrigar os animais do gênero *Ovalipes*, separado dos demais Geryonidae.

Entretanto, Evans (2018) realizou uma extensa revisão taxonômica e filogenética dos Portunoidea, acrescentando um maior número de representantes principalmente de táxons de Caphyrinae e Thalamitinae em busca de propor uma classificação mais robusta e com mais suporte para os Portunoidea. Sendo assim, esta será a hipótese filogenética considerada nesta tese, na qual atualmente Portunoidea é composta por três famílias: Carcinidae, Geryonidae e Portunidae. Uma vez que, Ovalipidae retornou para Geryonidae no status de subfamília Ovalipinae. As demais famílias que haviam sido propostas por Spiridonov et al. (2014) retornaram na revisão de Evans (2018) para o status de subfamílias, o que foi corroborado por Spiridonov (2020). Além disso, Evans (2018) também suporta a classificação de *Cronius* (*sensu* Mantelatto et al., 2009) em Thalamitinae.

Além disso, Spiridonov (2020) e Koch et al. (2022) propuseram uma nova subfamília: Achelouinae Spiridonov, 2020 para compor a família Portunidae. Sendo assim, os animais do gênero *Achelous* que se encontravam classificados em Portuninae, agora estão classificados em nesta nova subfamília.

No primeiro capítulo denominado **“Evolution of spermatozoa characters in Portunoidea (Crustacea: Decapoda): Integrative analysis of morphology and its phylogenetic implications”**, foi realizada uma análise comparativa da ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de membros da superfamília Portunoidea, além da proposição de uma filogenia molecular. Esta filogenia foi analisada sob um contexto morfológico-evolutivo, além de comparada a filogenias já existentes na literatura que

corroboraram ou não os achados ultraestruturais dos espermatozoides. Adicionalmente, os resultados moleculares aqui propostos foram integrados ao mapeamento de caracteres dos espermatozoides (primeiro capítulo), a morfologia do sistema reprodutor masculino (segundo capítulo), estratégias de armazenamento no receptáculo seminal (terceiro e quarto capítulos), com o objetivo de recuperar caracteres ancestrais reprodutivos dos Portunoidea.

No segundo capítulo nomeado de “**Produção e transferência do fluido seminal em *Achelous*, *Cronius*, *Arenaeus* e *Ovalipes* (Brachyura, Portunoidea)**”, apresentamos uma comparação histológica e histoquímica do sistema reprodutor masculino de quatro diferentes gêneros de Portunoidea, em busca de padrões de transferência espermática.

O terceiro capítulo “**From sperm plug formation to ovulation: morphological and ultrastructural modifications in the seminal receptacle of the blue crab *Callinectes danae***” mostra a publicação de um artigo no periódico científico na Zoologischer Anzeiger. Este capítulo trata-se da descrição ultraestrutural e histológica do receptáculo seminal de *Callinectes*, além de um experimento de cópula que foi essencial para a elucidação de como se dá a formação do plug-espermático. Esta pesquisa também foi de suma importância para preencher lacunas acerca do “abraço pós-copulatório” e da dissolução do mesmo em sincronia ao desenvolvimento ovariano das fêmeas.

O quarto capítulo intitulado “**Novos insights sobre a morfologia e evolução do armazenamento espermático em Portunoidea (Decapoda: Brachyura), com base nos gêneros *Achelous* e *Cronius***” realizamos a descrição anatômica, histológica e histoquímica do receptáculo seminal de *Achelous spinicarpus*, *Achelous spinimanus* e *Cronius ruber*, associado ao mapeamento de caracteres filogenéticos do armazenamento espermático em Portunoidea.

Desta maneira, esta Tese pretende contar a evolução morfológica dos espermatóforos e espermatozoides em Portunoidea e, também testar a hipótese de que nesta superfamília existe um único padrão de produção de fluido seminal e transferência espermática com ausência de competição de espermática pela formação do plug-espermático no receptáculo seminal tipo dorsal.

## Referências

- Antunes, M.; Zara, F.J.; López-Greco, L. S.; Negreiros-Fransozo, M. L., 2016. Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea. *Invertebrate Biology*, 135, 75-86.
- Antunes, M.; Zara, F. J.; López-Greco, L. S. & Negreiros-Fransozo, M. L., 2018. Male reproductive system of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* (Inachoididae). *Invertebrate Biology*, 137, 171-184.
- Apel, M., Spiridonov, V., 1998. Taxonomy and zoogeography of the portunid crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae) of the Arabian Gulf and adjacent waters. *Fauna of Saudi Arabia* 17, 159-331.
- Assugeni, C.O.; Magalhães, T.; Bolanos, J.A.; Tudge, C.C.; Mantelatto, F.L., Zara, F.J., 2017. Ultrastructure of spermatozoa of spider crabs, Family Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura): Integrative analyses based on morphological and molecular data. *Journal of Morphology*, 1-19.
- Assugeni, C.O. & Zara, F.J., 2022. Functional morphology of the seminal receptacle of *Mithrax*, *Mithraculus* and *Omalacantha* spider crabs (Brachyura: Mithracidae). *Tissue and Cell*, 76.
- Balasubramanian, C.P. & Suseelan, C., 1998. Reproductive biology of the female deepwater crab *Charybdis smithii* (Brachyura: Portunidae) from the Indian seas. *Asian Fisheries Science*.
- Balss, H., 1922. Ostasiatische Decapoden. IV. Die Brachyrhynchen (Cancridea). *Archiv für Naturgeschichte*, 88, 94-166.
- Becker, C.; Brandis, D. & Storch, V., 2011. Morphology of the female reproductive system of European pea crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae). *Journal of Morphology*, 272, 12-26.
- Benetti, A. S.; Santos, D. C.; Negreiros-Fransozo, M. L.; Scelzo, M. A., 2008. Spermatozoal ultrastructure in three species of the genus *Uca* Leach, 1814 (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Micron*, 39, 337-343.
- Branco, J.O. & Masunari, S., 1992. Crescimento *Callinectes danae* Smith, 1992 (Decapoda, Portunidae) da Lagoa da Conceição, Florianópolis, SC, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 9, 175-180.
- Bawab, F.M. & El-Sherief, S.S., 1988. Stages of the reproductive cycle of the female crab *Portunus pelagicus* (L., 1758) based on the anatomical changes of the spermatheca (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Crustaceana* 54, 139-148.
- Boos, H.; Oliveira, M.M. & Delfim, R., 2010. Novos registros do siri exótico *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) (Crustacea, Portunidae), no litoral do Estado de Santa Catarina, Brasil. *Revista CEPsul - Biodiversidade e Conservação Marinha*, 1, 1-7.
- Chiba, A. & Honma, Y., 1972. Studies on gonad maturity in some marine invertebrates-VI, Seasonal changes in the testes of the line shore crab. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 38: 317-329.
- Camargo, T. R.; Rossi, N.; Castilho, A. L.; Costa, R. C.; Mantelatto, F. L.; Zara, F. J., 2017. Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod structure & development*, 46, 588-600.
- Camargo, T, R.; Wolf, M, R.; Mantelatto, F. L.; Tudge, C.C; Zara, F. J., 2020. Ultrastructure of spermatozoa of members of Calappidae, Aethridae and Menippidae and discussion of their phylogenetic placement. *Acta Zoologica*, 101, 89-100.
- Castilho, G. G.; Ostrensky, A.; Pie, M. R.; Boeger, W. A., 2008. Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica*, 89, 157-161.

- Costa, T.M. & Negreiros-Fransozo, M.L.; 1998. The reproductive cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 (Decapoda, Portunidae) in the Ubatuba region, Brazil. *Crustaceana*.
- Dana, J.D., 1852. *Crustacea*. Part I. United States Exploring Expedition during the years 1838–1842 under the command of Charles Wilkes, U.S.N., 13, Philadelphia: C. Sherman.
- Davie, P. & Türkay, M., 2009. Portunoidea Rafinesque, 1815. Accessed through: World Register of Marine Species at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=106702>, 2021.
- De Grave, S.; Pentcheff, N.D.S.; Ahyong, T.; Chan, T.; Crandall, K.A.; Dworschak, P.C.; Felder, D.L.; Feldmann, R.M.; Franssen, C.H.J.M.; Goulding, L.Y.D.; Lemaitre, R.; Low, M.E.Y.; Martin, J.W.; Ng, P.K.L.; Schweitzer, C.E.; Tan, S.H.; Tshudy, D.; Wetzer, R.A., 2009. Classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology*, 21, 1-109.
- Diesel, R., 1989. Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *Journal of Crustacean Biology*, 9, 266-277.
- Diesel, R., 1991. Sperm competition and the evolution of mating behavior in Brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae), In: J. Martin & R. Bauer, *Crustacean Sexual Biology*, Columbia University Press, New York, 145-163.
- Evans, N., 2018. Molecular phylogenetics of swimming crabs (Portunoidea Rafinesque, 1815) supports a revised family-level classification and suggests a single derived origin of symbiotic taxa. *PeerJ*, 6, 42-60.
- Fiussen, B.M.N. & Fonseca, D.B., 2009. Determinação da estrutura etária de *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 ocorrendo na região estuarina da Lagoa dos Patos, RS. *Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil*, 13 a 17 de Setembro de 2009, São Lourenço- MG: 1,3.
- Garcia Bento, M.A.; Trenttin, I. M.; Mantelatto, F.L.; Zara, Fernando J., 2018. Comparative spermatozoal ultrastructure and molecular analysis in dromiid crabs and their phylogenetic implications for Dromiidae and Podotremata (Decapoda: Brachyura). *Arthropod Structure & Development*, 47, 627-642.
- Guinot, D.; Quenette, G., 2005. The spermatheca in Podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implication. *Zoosystema*, 27, 267-342.
- Hartnoll, R. G., 1968. Morphology of the genital ducts in female crabs. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*, 47, 279-300.
- Hartnoll, R. G., 1969. Mating in Brachyura. *Crustaceana*, 16, 161-181.
- Hines, A.H.; Jivoff, P.R.; Bushmann, P.J. Montfrans, J. V. Reed, S.A.; Wolcott, D.L & Wolcott, T.G., 2003. Evidence for sperm limitation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bulletin of Marine Science*, 72, 287-310.
- Hinsch, G. W., 1986. A comparison of sperm morphologies, transfer and sperm mass storage between two species of crab, *Ovalipes ocellatus* and *Libinia emarginata*. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 10, 79-87.
- Hinsch, G.W., 1988. Morphology of the reproductive tract and seasonality of reproduction in the golden crab *Geryon fenneri* from the Eastern Gulf of Mexico.
- Jamieson, B.G.M., 1991. Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. *Memoirs of the Queensland Museum*, 31, 109-142.

- Jamieson, B. G. M., 1994. Phylogeny of the Brachyura with Particular Reference to the Podotremata: Evidence from a Review of Spermatozoal Ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 345, 373-393.
- Jamieson, B. G. M.; Guinot, D.; Forges, B. R., 1995. Phylogeny of the Brachyura (Crustacea, Decapoda): evidence from spermatozoal ultrastructure. In: Jamieson, B. G. M., Ausio, J., & Justine, J.-L. (eds), *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. Muséum National d' Histoire Naturelle, 166, 265-283.
- Jamieson, B.G.M.; Tudge, C. C., 2000. Crustacea-Decapoda. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.), *Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny*, 1-95.
- Jayasankar, V.; Subramoniam, T., 1997. Proteolytic activity in the seminal plasma of the mud crab, *Scylla serrata* (Forsk.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, B. 116, 347-352.
- Jayasankar, V & Subramoniam, T., 1999. Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236, 253-259.
- Jeyalectumie, C.; Subramoniam, T., 1987. Biochemical composition of seminal secretions with special reference to LDH activity in the reproductive tissues of the field crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Experimental Biology*, 46, 231-236
- Jeyalectumie, C & Subramoniam, T., 1991. Biochemistry of seminal secretions of the crab *Scylla serrata* with reference to sperm metabolism and storage in the female. 1991. *Molecular Reproduction and Development*, 30, 44-55
- Jivoff, P.; Hines, A. H.; Quackenbush, L. C., 2007. Reproductive Biology and Embryonic Development, 255-286. In: Cronin, L. E.; Kennedy, V. S. (eds.), *The Blue Crab *Callinectes sapidus**. Maryland Sea Grant College.
- Johnson, P.T., 1980. *Histology of the blue crab *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda*. Praeger, New York. 440.
- Karasawa, H., Schweitzer, C.E., Feldmann, R.M., 2008. Revision of Portunoidea Rafinesque, 1815 (Decapoda: Brachyura) with emphasis on the fossil genera and families. *Journal of Crustacean Biology*, 28, 82-127.
- Klaus, S.; Schubart, C. D.; Brandis, D., 2009. Ultrastructure of Spermatozoa and spermatophores of old world Freshwater Crabs (Brachyura: Potamoidea: Gecarcinucidae, Potamidae, and Potamonautidae). *Journal of Morphology*, 270, 175-193.
- Koch, M., Spiridonov, V.A., Ďuris, Z., 2022. Revision of the generic system for the swimming crab subfamily Portuninae (Decapoda: Brachyura: Portunidae) based on molecular and morphological analyses. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1-49.
- Krol, R. M.; Hawkins, W. E.; Overstreet, R. M., 1992. 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.
- López-Greco, L. S.; Fransozo, V.; Negreiros-Fransozo, M. L.; Santos, D. C., 2009. Comparative morphology of the seminal receptacles of *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) (Brachyura, Ocypodoidea). *Zootaxa*, 2106, 41-50.
- López-Greco, L. S., 2013. Functional anatomy of the reproductive system. In: *Functional Morphology and Diversity*. Edited by Les Watling and Martin Thiel, Oxford University Press.
- Mantelatto, F.L.; Robles, R.; Schubart, C.D. & Felder, D.L., 2009. Molecular phylogeny of the Genus *Cronius* Stimpson, 1860, with reassignment of *C. tumidulus* and several American species of *Portunus*

- to the Genus *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae). In: Martin, J.W., Crandall, K.A. & Felder, D.L. (Org.). Crustacean Issues: Decapod Crustacean Phylogenetics. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis/ CRC Press, 29, 537-551.
- Mclay, C. L.; López Greco, L. S., 2011. A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: how did a race to be first become a race to be last?. *Zoologischer Anzeiger*, 4, 378-406.
- Mclay, C. L. & Becker, C., 2015. Reproduction in Brachyura. In: Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, and Biology. The Crustacea, Brill, 9, 185-243.
- Melo, G. A. S., 1996. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e Siris) do litoral brasileiro. Editora Plêiade; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
- Miers, E.J., 1886. Report on the Brachyura collected by H.M.S. Challenger during the years 1873–1876. In: Murray J, ed. Zoology. Report on the Scientific results of the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873–76 under the command of captain George S. Nares, R.N., F.R.S. and the late captain Frank Tourle Thomson, Vol. 17. Edinburgh: Neill and Company, 1-362.
- Milne-Edwards, A., 1861. Études zoologiques sur les Crustacés récents de la famille des Portuniens. *Archives du Muséum National d’Histoire Naturelle de Paris* 10, 309-421.
- Nagao, J.; Munehara, H., 2003. Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Fisheries Science*, 69, 1200-1208.
- Nascimento, F. A. D. & Zara, F. J., 2013. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius*, 21, 161-177.
- Ng, P. K. L.; Guinot, D.; Davie, P. J. F., 2008. Systema Brachyurorum: Part 1. An annotated checklist of extant Brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 17, 1-286.
- Norman, C.P.; Nuka, T.; Miyazaki, T., 1999. Mating behavior in *Thalamita picta* (Brachyura: Portunidae) and comparisons with congeneric species. *Crustacean Research*, 28, 16-23.
- Nicolau, C. F.; Nascimento, A. A.; Machado-Santos, C.; Sales, A.; Oshiro, L. M. Y., 2012. Gonads of males and females of the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Grapsidae: Brachyura: Decapoda): a histological and histochemical view. *Acta Zoologica*, 93, 222-230.
- Pyle, R. & Cronin, L. E., 1950. The General Anatomy of the Blue Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. Chesapeake Biological Laboratory.
- Pinheiro, M.A.A. & Fransozo, A., 2002. Reproduction of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Brachyura: Portunidae) on the Brazilian coast near 23°30'S. *Journal of Crustacean Biology*, 23, 416-428.
- Pinheiro, M.A.A.; Boos, H.; Reigada, A.L.D.; Severino-Rodrigues, E.; Rocha, S.S.; Hereman, M.J. & Souza, M.R., 2016. Avaliação dos Caranguejos Portunídeos (Decapoda: Portunoidea: Ovalipidae, Polybiidae e Portunidae). Cap. 26. In: Pinheiro, M. & Boos, H. (Org.). Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014. Porto Alegre, RS, Sociedade Brasileira de Carcinologia - SBC, 466 p.
- Pita, J.B.; Severino-Rodrigues, E.; Graça-Lopes, R.; Coelho, J.A.P., 1985. Levantamento da família Portunidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura) no Complexo Baía-Estuário de Santos, S. Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 12, 153-16.
- Rathbun, M.J., 1930. The cancrioid crabs of America of the families Euryalidae, Portunidae, Atelecyclidae, Cancridae, and Xanthidae. *Bulletin of the United States National Museum*, 152, 1-609.

- Ryan, E. P.; 1967. Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* Herbst (Brachyura: Portunidae). I. The male system. Proceedings of the Symposium on Crustacea at Erkulán, India. Part II. Symposium, Series 2, 522-544.
- Sainte-Marie, G. & B. Sainte-Marie., 1999. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). I. Observations on spermiogenesis and spermatophore formation in the vas deferens. Canadian Journal of Zoology, 77, 440-450.
- Schubart, C.D., Reuschel, S., 2009. A proposal for a new classification of Portunoidea and Cancroidea (Brachyura: Heterotremata) based on two independent molecular phylogenies. In: Martin JW, Crandall KA, Felder DL, eds. Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean issues, 18. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 533-549.
- Simeó, C. G.; Ribes, E; Rotllant, G., 2009. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). Tissue and Cell, 41, 345-361.
- Simeó, C. G.; Kurtz, K.; Chiva, M.; Ribes, E.; Rotllant, G., 2010. Spermatogenesis of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). Journal of morphology, 271, 394-406.
- Spiridonov, V.A.; Neretina, T.V.; Schepetov, D., 2014. Morphological characterization and molecular phylogeny of Portunoidea Rafinesque, 1815 (Crustacea Brachyura): implications for understanding evolution of swimming capacity and revision of the family-level classification. Zoologische Anzeiger, 253, 404-429.
- Spiridonov, V.A., 2020. An update of phylogenetic reconstructions, classification and morphological characters of extant Portunoidea Rafinesque, 1815 (Decapoda, Brachyura, Heterotremata), with a discussion of their relevance to fossil material. Geologija, 63, 133-166.
- Stephenson, W., 1972. Portunid crabs from the Indo-West-Pacific and Western America in the Zoological Museum, Copenhagen (Decapoda, Brachyura, Portunidae). Steenstrupia, 2, 127-156.
- Tiseo, G. R.; Mantelatto, F. L.; Zara, F. J., 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, 704-716.
- Tsang, L. M.; Schubart, C. D.; Ahyong, S. T.; Lai, J. C.; Au, E. Y.; Chan, T. Y.; Ng, K. L. P ; Chu, K. H., 2014. Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. Molecular biology and evolution, 31, 1173-1187.
- Tudge, C. C., 2009. Spermatozoal morphology and its bearing on decapod phylogeny. In: Martin, J.W., Crandall, K.A. & Felder, D.L. (eds), Crustacean Issues. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis/CRC Press, 101-119.
- Tudge, C.C.; Scheltinga, D.M.; Jamieson, B.G.M.; Guinot, D.; Forges, B.R., 2012. Comparative ultrastructure of the spermatozoa of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. Acta Zoologica (Stockholm), 95, 1-20.
- Watanabe, T.T.; López-Greco, L.S.; Zara, F.J., 2022. Seminal fluid and spermatophore production in a western Atlantic invasive swimming crab, *Charybdis hellerii*, reveals a different pattern to Portunoidea. Arthropod Structure & Development, 66, 1467-8039.
- Williams, A.B., 1974. The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). Fishery Bulletin, 72, 685-798.
- Williams, A.B., 1984. Shrimps, lobsters and crabs of Atlantic coast of Eastern United States, Maine to Florida. Washington, Smithsonian Institution Press, 550.

- Wolcott, D. L.; Hopkins, C. W. B.; Wolcott, T. G., 2005. Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun: effects of male mating history, male size and season. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 319, 43-55.
- Zara, F. J.; Toyama, M. H.; Caetano, F. H.; López-Greco, L. S., 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue Crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*, 32, 249-262.
- Zara, F. J.; Pereira, G. R. R.; Sant'anna, B. S., 2014. Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius*. *The Biological Bulletin*, 227, 19-32.

## Considerações Finais

Nesta tese conseguimos conciliar os caracteres morfológicos e químicos do sistema reprodutor masculino, incluindo espermatóforos, espermatozoides, fluido seminal e também os caracteres do sistema reprodutor feminino (tipo de receptáculo seminal, armazenamento espermático e estratégia de cópula) em Portunoidea, que integrados a filogenia molecular permitiram contar brevemente a história da recuperação do caráter ancestral com base no que se conhece mundialmente. A ultraestrutura dos espermatozoides das espécies dos gêneros *Callinectes*, *Arenaeus*, *Portunus* e *Ovalipes* mostrou sinal filogenético quanto a morfologia da câmara perforatorial onde estes mesmos animais apresentam o tipo geral elipsóide e a zona acrossomal raiada dilatada na região média da vesícula acrossomal. Os Portunidae do gênero *Achelous* apresentam uma autapomorfia em relação a morfologia da câmara perforatorial que é do tipo piriforme e que difere dos demais Portunidae aqui descritos. Os Thalamitinae *Cronius ruber*, *Charybdis helleri* e *Caphyra rotundifrons* apresentam como sinapomorfia a câmara perforatorial com morfologia geral do tipo fusiforme. Todos os Portunidae aqui estudados apresentam quatro camadas concêntricas do acrossoma. Porém, as espécies das famílias Carcinidae e Geryonidae apresentam como sinapomorfia a presença de cinco camadas concêntricas do acrossoma.

Nos Portunoidea aqui estudados, verificamos que o estado de caráter ancestral em relação ao espermatóforo remete a morfologia de parede compacta e espessa, que ocorre nos animais formadores de plug-espermático dos gêneros (*Callinectes*, *Arenaeus*, *Portunus*, *Scylla*, *Ovalipes*, *Chaceon* e *Carcinus*), os quais também realizam a cópula durante a muda e apresentam a região média e posterior do vaso deferente composta por secreção granular e sem espermatóforos ou espermatozoides, respectivamente. Assim, tais gêneros não apresentam competição espermática. Estes resultados mostram a coevolução entre machos e fêmeas onde a lenta deiscência espermática e que ocorre somente no receptáculo seminal tem sincronia com dissolução do plug-espermático e ao desenvolvimento ovariano.

Nas fêmeas de *A. spinicarpus*, *A. spinimanus* e *Cr. ruber*, descrevemos pela primeira vez a ocorrência de receptáculo seminal do tipo ventral e a formação de pacotes espermáticos em Portunoidea. Estas espécies ao que nos parece também realiza a cópula em intermuda (rígida), desta maneira, beneficiando o último macho a copular com a fêmea. Neste caso, evidenciando a competição espermática nestes animais. A morfologia dos espermatóforos que ocorre nestes animais está relacionada a rápida deiscência, uma vez que no receptáculo das fêmeas, logo após a transferência espermática, nota-se apenas espermatozoides livres.

Os resultados deste trabalho foram eficazes na recuperação do estado ancestral de caráter e conseguiram corroborar e solucionar em partes as controvérsias existentes na classificação dos Portunoidea, dado a importância do entendimento da relação entre os padrões morfológicos e evolutivos desta superfamília. Esta tese é o ponto inicial para a elucidação dos diferentes padrões de acasalamento, deiscência dos espermatóforos e cópula em Portunoidea. Ainda são necessários diferentes gêneros desta superfamília, que ainda não foram estudados sobre este ponto de vista para finalizar a história evolutiva do sistema reprodutor dentro deste importante clado de Brachyura.