

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO
MESQUITA FILHO – UNESP – CENTRO DE
AQUICULTURA DA UNESP**

**Sistema reprodutor masculino em
Porcellanidae: reconstrução do caráter
ancestral com base na morfologia,
histoquímica e ultraestrutura dos
espermatóforos e espermatozoides.**

Bárbara Paiva Camillo

Jaboticabal, São Paulo
2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO
MESQUITA FILHO – UNESP – CENTRO DE
AQUICULTURA DA UNESP**

**Sistema reprodutor masculino em
Porcellanidae: reconstrução do caráter
ancestral com base na morfologia,
histoquímica e ultraestrutura dos
espermatóforos e espermatozoides.**

Bárbara Paiva Camillo

Orientador: Dr. Fernando José Zara

Coorientadora: Dra. Ivana Trettin

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós- graduação em Aquicultura do Centro
de Aquicultura da UNESP - CAUNESP,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Aquicultura
(Biologia Aquática).

Jaboticabal, São Paulo
2020

C183s

Camillo, Bárbara Paiva

Sistema reprodutor masculino em Porcellanidae: reconstrução do caráter ancestral com base na morfologia, histoquímica e ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides. / Bárbara Paiva Camillo. -- Jaboticabal, 2020

156 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Fernando José Zara

Coorientadora: Ivana Ivana Trettin

1. Morfologia. 2. Caranguejos. 3. Sistema reprodutor. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

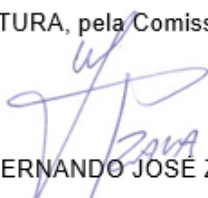
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Sistema reprodutor masculino em Porcellanidae: reconstrução do caráter ancestral com base na morfologia histoquímica e ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides.

AUTORA: BÁRBARA PAIVA CAMILLO

ORIENTADOR: FERNANDO JOSÉ ZARA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em
AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



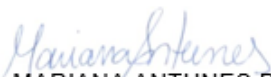
Prof. Dr. FERNANDO JOSÉ ZARA

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV/ UNESP



Dra. IVANA MIRANDA DA SILVA

Biologie I / Universität Regensburg, Alemanha



Prof. Dr. MARIANA ANTUNES DA SILVA

Departamento de Zoologia / IB/UNESP, Botucatu-SP

Jaboticabal, 25 de maio de 2020.

*Sonhe com aquilo que você quer
ser, porque você possui apenas
uma vida e nela só se tem uma
chance
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para
fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la
forte. Tristeza para fazê-la
humana.
E esperança suficiente para
fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não tem
as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para
aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e
tentam sempre.
E para aqueles que
reconhecem a importância
das pessoas que passaram
por suas vidas.*

Clarisse Lispector

Dedico este trabalho ao meu eterno e grande herói, amigo, avô e pai Pagé (*in memoriam*). Este trabalho é seu meu pai, e onde estiver, saiba que conseguimos. Te amo para sempre.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Bolsa de Mestrado, Processo nº 88882.433718/2019-01 pela bolsa de mestrado concedida. Esta dissertação foi em grande parte subsidiada dentro do Projeto CAPES Ciências do Mar II #1989/2014 processo 23038.004309/2014-51.

Ao suporte financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio dos projetos associados ao Laboratório de Morfologia de Invertebrados (Jovem Pesquisador #2005/04707-5, Biota #2010/50188- 8 e Biota Intercrusta #2018/13685-5) os quais subsidiaram uma parte importante do estudo ultraestrutural dos espermatozoides.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando José Zara, por todo tempo dedicado, por todo conhecimento transmitido, todo auxílio, confiança e incentivo. Obrigada por ter aceitado ser meu pai científico.

À querida Marcia Fiorese Mataqueiro, técnica e grande ser humano que encontrei nesta etapa da minha vida, que sempre me auxiliou nas técnicas laboratoriais e nos conselhos da vida.

Ao grande Djalma Rosa, conhecido como Passarinho, pelas coletas, aventuras, brincadeiras e aprendizado. Você foi muito importante para a realização deste trabalho.

Aos amigos, companheiros e ex-companheiros do Laboratório de Morfologia de Invertebrados, Camila, Fernanda, Maria Alice, Guilherme, Lucas, Timóteo, Leo Jaime (*in memoriam*) e Abner (*in memoriam*). Por todos os conhecimentos, trabalhos, esforços, alegrias e comilanças compartilhadas. Em especial a Camila, Fernanda e Maria, que além de amigas, se tornaram irmãs. Obrigada por toda ajuda e apoio, vocês são incríveis, nossos dias ficaram marcados para sempre comigo.

À Dra. Claudia Maria Fiorillo pelo seu suporte técnico e por sempre me receber com muita paciência e carinho. E ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV, UNESP Câmpus de Jaboticabal.

Ao Dr. Lucas Rezende Penido Paschoal e a Dr^a. Ana Francisca Tamburus Gomes por terem contribuído tanto com as sugestões durante a banca de qualificação. A Dr^a. Mariana Antunes da Silva e Dr^a. Ivana Miranda Trinttin por toda colaboração na banca de defesa.

Aos funcionários e professores da UNESP-FCAV e do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária, em especial à Marcia Macri. Obrigada por terem contribuído para a realização deste mestrado.

Ao Programa de pós graduação do Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, pela oportunidade e por todo suporte e contribuição para a realização do meu projeto de mestrado. Ao David Oliveira Lorente, por toda paciência e por me ajudar sempre.

À Deus, por ter me acompanhado em todas as etapas da minha vida, por ter me dado força para continuar quando eu conheci a dor da maneira mais profunda. Obrigada Grande Arquiteto do Universo, por todo carinho e proteção.

Ao meu avô e pai Pagé (*in memorian*), que durante sua existência na Terra, soube transmitir todo amor, felicidade e cuidado com toda nossa família. De onde está, sei que vibra também por mais esta conquista. A você, saudoso e querido pai, muito obrigada.

A minha Vózinha Neuza, por toda oração, carinho e cuidado, você é luz vó! Obrigada por todo cafuné e colo que me dá até hoje. Te amo!

A minha mãe Inajara, mulher de fibra, guerreira, obrigada por sempre me incentivar a ir além, por me tornar alguém forte. Este sonho também é seu, te amo, minha rainha.

Ao meu irmão Pedro, todo meu amor e respeito. Você é minha inspiração diária. Dou a minha vida por você.

Aos meus tios Jamara, Zé, Juliana e Bira, por toda confiança depositada e carinho, tenho os melhores tios do mundo. Em especial ao Tio Bira, que se tornou minha base, minha força e meu grande amigo nos piores e melhores momentos. Obrigada Tio, por cuidar de mim e não ter deixado que eu desistisse de nada.

Aos meus primos, Jade, João, Yasmin e Ytawane, além de primos somos irmãos de alma, agradeço por toda parceria de sempre, sempre estarei com vocês, vocês são as coisas mais preciosas da minha vida. Ytawane (tutu), minha pequena valente, prima e afilhada, talvez leia isto só quando estiver mais velha, quero que saiba que muitas vezes foi você com toda sua doçura, amor, carinho e curiosidade rs quem me deu energia para continuar neste caminho.

Ao Guilherme Augusto Morete Junior, meu grande amor, namorado, companheiro e melhor amigo, faltam palavras para te agradecer, você foi meu pilar, ouviu quando eu precisava dizer, e falou quando eu precisava escutar, você foi meu

fiel companheiro que durante essa jornada não só do mestrado, me levantou quando eu não tinha mais forças, acalmou meu coração quando estava desesperado, e me fez enxergar o quanto eu era capaz mesmo quando eu achava que não conseguiria. Obrigada por ficar ao meu lado mesmo que jogando vídeo game enquanto eu escrevia este trabalho rs. Te amo, te amo, te amo!

Minha eterna gratidão a todos que participaram desta jornada!

Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Bolsa de Mestrado, Processo nº 88882.433718/2019-0. Projeto CAPES Ciências do Mar II #1989/2014 processo 23038.004309/2014-51.

Sumário

Prólogo	10
Referências:	15
Capítulo 1. Sistema reprodutor masculino em Porcellanidae e implicações filogenéticas em Anomura.	19
Resumo	20
Abstract	21
Introdução	22
Material e Métodos	23
Resultados	
Anatomia geral	26
Histologia e histoquímica.....	26
Testículo.....	26
Vaso deferente.....	27
Ultraestrutura dos vasa deferentia e espermatóforos	28
Microscopia eletrônica de varredura e contraste interdiferencial de fase.....	29
Discussão	52
Agradecimentos	58
Referências:	59
Capítulo 2. Caracterização ultraestrutural do espermatozoide em caranguejos porcelana comparado a outros Anomura.	69
Resumo	70
Abstract	71
Introdução	72
Material e Métodos	73
Resultados	75
Morfologia geral do espermatozoide em MEV e DIC	75
Caracterização geral das estruturas e camadas da vesícula acrossomal do espermatozoide em Porcellanidae em ultraestrutura	76
Ultraestrutura do Espermatozoides	77
Dados moleculares	85
Reconstrução da história de caracteres.....	86
Discussão	136
Agradecimentos	142
Referências:	143
Material Complementar	147

Resumo geral da dissertação

Os caranguejos da família Porcellanidae tem seu sistema reprodutor masculino desconhecido do ponto de vista histológico e pouco estudado no aspecto ultraestrutural dos espermatozoides. Nesta dissertação, apresentamos o padrão anatomo-histológico do sistema reprodutor masculino, além da ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de Porcellanidae, buscando entender as relações de parentesco e a evolução do sistema reprodutor e suas células germinativas entre as superfamílias da infraordem Anomura. Foram coletados com auxílio de um barco de pesca camaroeira, além de coleta manual na região entre marés e por meio de mergulho livre e autônomo (3m), machos adultos dos gêneros *Pachycheles*, *Petrolisthes*, *Pisidia*, *Porcellana* e *Megalobrachium* em Ubatuba e São Vicente (SP), Brasil, e em Valdivia, Chile. As amostras foram processadas seguindo rotinas para histologia, microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Análises do fluido seminal, empacotamento dos espermatozoides e formação dos espermatóforos, apresentaram o mesmo padrão para todas as espécies estudadas, e semelhante a outros Anomuras já descritos na literatura, sendo simplificado e sem diferenciações macroscópicas. Os espermatóforos de Porcellanidae seguem o padrão tripartido pedunculado como descrito para a maioria dos Anomura, porém se diferenciam por apresentarem um pedúnculo diminuto, característica compartilhada com Galatheidae e Munidae. A ultraestrutura dos espermatozoides dos Porcellanidae é caracterizada por uma vesícula acrossomal saliente ao espermatozoide, possuindo camadas concêntricas e diferente dos outros Galatheoidea por apresentarem: opérculo centralmente perfurado, cone perforatorial eletrondenso, e anel perforatorial posterior. Porcellanidae possuem características compartilhadas entre as espécies mais proximamente relacionadas e algumas exclusivas de cada gênero. *Pisidia brasiliensis* e *Porcellana sayana*, possuem um “ombro” na região apical do acrossoma. *Porcellana sayana* e *Megalobrachium roseum* o cone perforatorial se estende até a abertura opercular. No gênero *Petrolisthes*, ocorre uma estrutura exclusiva, o anel tubular eletrondenso. *Pisidia brasiliensis* possui botão apical. Assim, a ultraestrutura do espermatozoide destas espécies de Porcellanidae representam um novo conjunto de caracteres os quais são claramente relacionados filogeneticamente, quando traçados por meio do uso da filogenia mais recente da infraordem.

Palavras-chave: anatomia; microscopia eletrônica; caranguejos porcelana; vaso deferente; morfologia.

Abstract

The crabs of the Porcellanidae family have their male reproductive system unknown from the historical point of view and little studied in the ultrastructural aspect of sperm. In this dissertation, we present the histological pattern of the male reproductive system, in addition to the ultrastructure of sperm and sperm from porcellanids, seeking to understand how kinship relationships and the evolution of the reproductive system and its germ cells between the superfamilies of Anomura's infrastructure. Were collected with the aid of a camaro fishing boat, in addition to manual collection in the region between tides and free and autonomous diving medium (3m), adult males of the genera *Pachycheles*, *Petrolisthes*, *Pisidia*, *Porcellana* and *Megalobrachium* in Ubatuba and São Vicente (SP), Brazil, and in Valdivia, Chile. As the samples were processed following routines for histology, transmission electron microscopy and scanning. Analysis of seminal fluid, sperm packaging and sperm formation, analysis of the same pattern for all studied species, and similar to other Anomuras already applied in the literature, being simplified and without macroscopic differences. Porcellanid spermatozoa follow the pedunculated tripartite pattern as described for most Anomura, but they differ by presenting a tiny peduncle, resources shared with Galatheididae and Munidae. An ultrastructure of porcelain spermatozoa is characterized by an acrosomal vesicle protruding from the sperm, having concentric layers and different from the other Galatheoidea in that they have: centrally perforated operculum, perforated electron- condensed cone and perforated posterior ring. Porcellanidae has characteristics shared between the closest species and some exclusive to each genus. *Pisidia brasiliensis* and *Porcellana sayana*, have a "shoulder" in the apical region of the acrosome. *Porcellana sayana* and *Megalobrachium roseum* or perforated cone extend to the opercular opening. In the *Petrolisthes* genus, there is an exclusive structure or an electronic tubular ring. *Pisidia brasiliensis* has an apical bud. Thus, an ultrastructure of the sperm of these species of Porcellanidae represents a new set of characters, which are clearly related phylogenetically, when traced using the most recent phylogeny of the infraorder.

Key-words: anatomy; electronic microscopy; porcelain crabs; vas deferens; morphology.

Prólogo

A infraordem Anomura MacLeay, 1838 é composta por 7 superfamílias: Hippoidea Latreille, 1825, Aegloidea Dana, 1852, Lomisoidea Bouvier, 1895, Chirostyloidea Ortmann, 1892, Galatheaidea Samouelle, 1819, Paguroidea Latreille, 1802 e Lithodoidea Samouelle, 1819, com 17 famílias, 265 gêneros e cerca de 2.470 espécies (Bracken- Grissom et al., 2013; Wolfe et al., 2019). Este grupo é bastante heterogêneo, com grande diversidade de morfologia corpórea e apomorfias que os caracterizam, como presença de linha anomurica na carapaça, base da antena localizada lateralmente na margem anterior da carapaça, e o quinto par de pereiópodo reduzido (Scholtz e Richter, 1995).

Dentre os Galatheaidea, encontra-se a família Porcellanidae constituída por 30 gêneros e aproximadamente 300 espécies válidas, distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo em todos os oceanos (Mantelatto e Miranda, 2016). No Atlântico ocidental são reconhecidas 48 espécies, distribuídas em 7 gêneros: *Megalobrachium* (Stimpson, 1858), *Minyocerus* (Stimpson, 1858), *Pachycheles* (Stimpson, 1858), *Petrolisthes* (Stimpson, 1858), *Pisidia* (Leach, 1820), *Polyonyx* (Stimpson 1858) e *Porcellana* (Lamarck, 1801) (Bracken- Grissom et al., 2013). Os gêneros *Polyonix* e *Minyocerus* são menos amostrados no litoral de São Paulo devido à dificuldade de coleta e raridade destes grupos (Veloso e Mello, 1993; Hiller et al., 2006). Os Porcellanidae ocorrem em diferentes habitats, principalmente espécies do gênero *Petrolisthes* ocorrem em substratos duros, tais como rochas; os gêneros *Pisidia*, *Megalobrachium* e *Pachycheles*, que ocorrem em sistemas de grutas, recifes de coral e associados a algas calcárias e briozoários, enquanto outras espécies, como as do gênero *Porcellana* estão associadas a ermitões e cnidários (Veloso e Melo, 1993; Veloso et al., 1999). Os porcelanídeos têm grande relevância nos ecossistemas, uma vez que são primariamente filtradores, característica ausente nas outras famílias de Galatheaidea, assim, servindo de elo entre a matéria orgânica particulada e os níveis tróficos superiores (Veloso et al., 1999).

O sistema reprodutor masculino em Decapoda é descrito como um órgão bilateral formado por um par de testículos e vaso deferente, geralmente localizados no cefalotórax (Krol et al., 1992). Em Brachyura, o testículo pode ser classificado histologicamente como lobular ou tubular, como proposto por Nagao e Munehara

(2003). O tipo lobular exibe vários lóbulos (cistos ou ácinos) seminíferos, conectados a um ducto seminífero central, sendo o mesmo tipo descrito para Dendrobranchiata e Pleocyemata (Felgenhauer, 1992; Krol et al., 1992; Minagawa et al., 1994; Hobbs et al., 2007; 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, e é encontrado mais comumente nos camarões carídeos e em alguns Brachyura, como Majoidea, Ocypodoidea e Grapsoidea (Minagawa et al., 1994; Simeó et al., 2009; Tiseo et al., 2014). Os vasa deferentia são encarregados da produção do fluido seminal e empacotamento dos espermátóforos (Zara et al., 2012; López Greco, 2013). Em Brachyura, o vaso deferente é dividido em três regiões distintas: região anterior (AVD) que tem a função de produzir as secreções e empacotar os espermátóforos, média (MVD) e posterior (PVD) que são responsáveis por armazenar os espermátóforos e produzir a maior parte do fluido seminal (Krol et al., 1992; Simeó et al., 2009; Zara et al., 2012; Tiseo et al., 2014). Em Anomura, o vaso deferente liga-se aos gonóporos, localizados na base da coxa, ou coxopodito, do quinto par de pereópodos e através deles os espermátóforos são transferidos ao esterno das fêmeas (Mouchet, 1931; Hess e Bauer, 2002). Por sua vez, o vaso deferente em Anomura não apresenta diferenças macroscópicas, e a divisão de regiões ocorre de acordo com sua posição relativa ao testículo. Estas regiões apresentam nomenclatura e funções distintas do que é visto em Brachyura, sendo: região proximal (PVD) no qual os espermatozoides livres estão imersos em secreção e formam uma longa massa espermática; média (MVD) que também possui características secretoras, porém participam da formação dos espermátóforos com o aumento do volume das secreções e ação de contrações musculares e a região distal (DVD) que separa totalmente e armazena os espermátóforos (Mouchet, 1931; Matthews, 1953, 1954; Berry e Heydor, 1970).

Os espermátóforos de Decapoda desempenham um papel importante na transferência de espermatozoides, uma vez que estes são aflagelados (Felgenhauer e Abele, 1991), e alguns grupos não possuem órgão copulatório ou intromitente, realizando fecundação externa (Subramoniam, 1993; Tudge, 1999; Hess e Bauer, 2002). Em Anomura, os espermatozoides são empacotados em espermátóforos do tipo coenospérmicos, ou seja, mais de um espermatozoide dentro da ampola espermatóforica (Tudge, 1991). Os Anomura se caracterizam

pela grande variedade e complexidade na morfologia dos seus espermatóforos (Tudge, 1991; Subramoniam, 2017). De maneira geral a morfologia espermatofórica pode ser classificada em dois tipos principais. O primeiro são os espermatóforos tripartidos, que se encontram individualizados dentro do vaso de vaso deferente, este tipo corre na maioria dos Anomura, sendo formados por ampola, pedúnculo e um pé que se adere ao cordão gelatinoso (Tudge, 1991; Subramoniam, 1993). A morfologia da ampola e o comprimento do pedúnculo são variáveis, e são considerados estruturas específicas para separar famílias ou espécies (Subramoniam, 1984, 1993; Tudge, 1999). O segundo tipo, é observado em Hippidae Latreille, 1825, no qual os espermatóforos também são tripartidos, porém, são semelhantes a uma fita continua estando praticamente fundidos uns aos outros (Subramoniam, 1984). Ainda dentro de Anomura, uma exceção é encontrada na superfamília Aegloidea Dana, 1852, onde não ocorre a formação de espermatóforos, e os espermatozoides encontram-se livres imersos no fluido seminal ao longo do vaso deferente (Sokolowicz et al., 2007). Desta maneira pode-se notar que a informação sobre o sistema reprodutor masculino em Anomura encontra-se bastante fragmentada e desconexa, tanto do ponto de vista anatomo-histológico, quanto no aspecto da formação do fluido seminal e organização dos espermatóforos, como na morfologia desta estrutura transportadora de espermatozoides para as diferentes superfamílias.

A ultraestrutura dos espermatozoides e espermatóforos vem sendo utilizada como ferramenta importante na taxonomia moderna por auxiliar no entendimento das relações filogenéticas em Decapoda. Esta ferramenta vem sendo amplamente integrada a matrizes de dados moleculares, produzindo excelentes resultados quando utilizados para entender a história evolutiva de um grupo, a partir da reconstrução do caráter ancestral, por meio do mapeamento de caracteres espermáticos (Jamieson, 1994; Tudge, 1995, 1996, 1997c, 2009; Camargo et al., 2016, 2017; Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2019). A ultraestrutura dos espermatozoides em Anomura é semelhante à encontrada em Brachyura, entretanto, as principais diferenças estão na morfologia do acrossoma e na zonação do mesmo (Tudge, 1992, 1995, 1997c). Apesar da grande variedade e abundância de membros da família Porcellanidae, existem poucos estudos com a descrição da ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides até o momento (Tudge e Jamieson, 1996 a, b).

De acordo com Tudge e Jamieson (1996b) a principal diferença no tocante a célula espermática que divide os membros de Porcellanidae é referente a morfologia nuclear. As espécies do gênero *Petrolisthes* apresentam núcleo com formato de taça arredondada, observada em *P. armatus* e *P. lamarckii* (Tudge e Jamieson.,1996b), sendo os outros três gêneros estudados *Aliaporcellana*, *Pisidia* e *Polyonyx* caracterizado por ter um núcleo alongado marcado pela presença de microtúbulos que formam vários braços microtubulares, levando a formação da estrutura do núcleo-microtubular, (Tudge e Jamieson, 1996b). Segundo os mesmos autores, um conjunto particular de caracteres da vesícula acrossômica, dos gêneros *Aliaporcellana*, *Pisidia* e *Polyonyx* os une. A vesícula acrossômica é saliente e claramente superior em relação ao citoplasma. O opérculo é largo, plano e centralmente perfurado. Em geral, a parede da câmara perforatorial nos espermatozoides dos porcelanídeos é dobrada de forma variada para formar septos largos, e o zoneamento concêntrico da vesícula acrossômica tem três características importantes: o cone perforatorial denso e o anel perforatorial, sendo uma autopomorfia da família, e a zona interna do acrossomo dividida em subopercular e basal, sendo uma sinapomorfia compartilhada com membros da família Galatheidae (Tudge e Jamieson, 1996 a,b). Em *P. armatus* e *P. lamarckii* ocorre uma diferença importante na morfologia geral do espermatozoide que divide o grupo, estes indivíduos exibem caracteres acrossomais únicos sendo: um anel tubular que circunda a câmara perforatorial no seu ponto médio e uma crista opercular notável que, juntamente com a forma nuclear globular separa este gênero dos demais estudados dentro da família Porcellanidae.

Assim, nesta dissertação são apresentados dois capítulos em formato de artigos científicos. O primeiro, trata-se da primeira descrição comparativa da produção do fluido seminal e espermatóforos para os porcelanídeos *Megalobrachium roseum* (Rathbun, 1900), *Pisidia brasiliensis* Haig in Rodrigues da Costa, 1968, *Porcellana sayana* (Leach, 1820), *Pachycheles monilifer* (Dana, 1852), *Petrolisthes armatus* (Gibbes), *Pachycheles riisei* (Stimpson, 1859), *Petrolisthes granulosus* (Guérin, 1835) e *Petrolisthes laevigatus* afim de compreender se existem padrões nas relações filogenéticas das famílias e superfamílias de Anomura. No segundo capítulo, é descrito a ultraestrutura dos espermatozoides das espécies de Porcellanidae mencionadas (exceto *Pachycheles riisei*), afim de entender a história evolutiva deste grupo comparando com os demais Anomura

através do manejo dos caracteres morfológicos dos espermatozoides.

Referências:

- Assugeni, C. D. O.; Magalhães, T.; Bolaños, J. A.; Tudge, C. C.; Mantelatto, F. L.; Zara, F. J. (2017). Ultrastructure of spermatozoa of spider crabs, family Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura): Integrative analyses based on morphological and molecular data. *Journal of morphology*, 278, 1628-1646.
- Berry, P. F., e Heydorn, A. E. F. (1970). A comparison of the spermatophoric masses and mechanisms of fertilization in Southern African spiny lobsters (Palinuridae). *Oceanographic Research Institute*, 25, 1-18.
- Bracken-Grissom, H. D.; Cannon, M. E.; Cabezas, P.; Feldmann, R. M.; Schweitzer, C. E.; Ah Yong, S. T.; Felder, D. L.; Lemaitre, R.; Crandall, K. A. (2013). A comprehensive and integrative reconstruction of evolutionary history for Anomura (Crustacea: Decapoda). *BMC Evolutionary Biology*, 13, 128.
- Buranelli, R. C.; Mantelatto, F. L. (2012). Reproductive apparatus of the male giant hermit crab *Petrochirus diogenes* (Anomura, Diogenidae): morphology and phylogenetic implications. *Aquatic Biology*, 16, 241-251.
- Buranelli, R.C.; Zara, F.J.; Mantelatto F.L. (2014). Male reproductive system of the red brocade hermit crab *Dardanus insignis* (Diogenidae) and its relationship to other family members. *Zoomorphology*, 133, 127-137.
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., e Zara, F. J. (2016). Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology*, 135, 67-81.
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F.L., Zara, F.J., (2017). Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod Structure & Development*, 46, 588-600.
- Felgenhauer, B. E. (1992). Internal anatomy of the Decapoda: an overview. *Microscopic anatomy of invertebrates*, 10, 45-75.
- Garcia, T. M., e Silva, J. R. F. (2006). Testis and vas deferens morphology *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *Journal of Crustacean Biology*, 9, 266-277.
- Hess, G. S.; Bauer, R. T. (2002). Spermatophore transfer in the hermit crab *Clibanarius vittatus* (Crustacea, Anomura, Diogenidae). *Journal of Morphology*,

253, 166-175.

- Hiller, A.; Kraus, H.; Marc, A.; Werding, B. (2006) The *Petrolisthes galathinus* complex: species boundaries based on color pattern, morphology and molecules, and evolutionary interrelationships between this complex and other Porcellanidae (Crustacea: Decapoda: Anomura). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40, 547-569.
- Hobbs Jr, H. H., Harvey, M. C., e Hobbs III, H. H. (2007). A comparative study of functional morphology of the male reproductive systems in the Astacidea with emphasis on the freshwater crayfishes (Crustacea: Decapoda). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 624, 1-69.
- Jamieson, B. G. M. (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.
- Krol, R. M., Hawkins, W. E., e Overstreet, R. M. (1992) Reproductive components Microscopic anatomy of invertebrates, *Wiley-Liss*, 10, 295-344.
- López Greco. L. (2013). Functional anatomy of the reproductive system. In: *Functional Morphology and Diversity*. Edited by Les Watling and Martin Thiel. Oxford University Press, 413-450.
- Mantelatto, F. L., e Miranda, I. (2016). Avaliação do caranguejo porcelânico *Minyocerus angustus* (Dana, 1852) (Decapoda: Porcellanidae). *Livro vermelho dos crustáceos do Brasil: avaliação 2010-2014*.
- Matthews, D. C. (1954). The Origin and Development of the Spermatophoric Mass of a Nephropsid Lobster, *Enoplometopus occidentalis* (Randall).
- Matthews, D.C. (1953). The development of the pedunculate spermatophores of a hermit crab, *Dardanus asper* (De Haan). *Pacific Science*, 7, 255-267.
- Minagawa, M., Chiu, J.-R., Kudo, M., Takashima, F., (1994). Male reproductive biology of the red frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands. *Marine Biology*, 118, 393-401.
- Mouchet S. (1931). Spermatophores des Crustacés Décapodes Anomures et Brachyours et castration parasitaire chez quelques Pagures. *Annales de la Station Océanographique de Salammô*, 6, 1-203.
- Nagao, J.; Munehara, H. (2003). Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Fisheries Science*, 69, 1200-1208.
- Scholtz, G.; Richter, S. (1995). Phylogenetic systematics of the reptantian

- Decapoda (Crustacea, Malacostraca). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 113, 289- 328.
- 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.
- Subramoniam, T. (1984). Spermatophore formation in two intertidal crabs *Albunea symnista* and *Emerita asiatica* (Decapoda: Anomura). *The Biological Bulletin*, 166, 78-95.
- Subramoniam, T. (1993) Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans. *Advances in marine biology*. Academic Press, 29, 129-214.
- Subramoniam, T. (2017). Sexual biology and reproduction in crustaceans. *Academic Press*, Chap. 12, 325-368.
- Tirelli, T.; Campantico, E.; Pessani, D.; Tudge, C. C. (2006) Description of the male reproductive apparatus of the hermit crab *Calcinus tubularis* (Decapoda: Anomura: Diogenidae). *Biology of the Anomura II Crustacean Research*, 6, 13-21.
- Tiseo, G. R.; Mantelatto, F. L.; Zara, F. J. (2014). Is cleistospermy and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*, 34, 704–716.
- Tudge, C. C. (1991). Spermatophore diversity within and among the hermit crab families, Coenobitidae, Diogenidae, and Paguridae (Paguroidea, Anomura, Decapoda). *The Biological Bulletin*, 181, 238-247.
- Tudge, C. C. (1992). Comparative ultrastructure of hermit crab spermatozoa (Decapoda: Anomura: Paguroidea). *Journal of Crustacean Biology*, 12, 397-409.
- Tudge, C. C. (1995). Ultrastructure and phylogeny of the spermatozoa of the Infraorders Thalassinidea and Anomura (Decapoda, Crustacea). *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle. Serie A, Zoologie*, 166, 251-263.
- Tudge, C. C. (1997). Phylogeny of the Anomura (Decapoda, Crustacea): Spermatozoa and spermatophore morphological evidence. *Contributions to Zoology*, 67, 125-141.
- Tudge, C. C. (1999). Spermatophore morphology in the hermit crab families

- Paguridae and Parapaguridae (Paguroidea, Anomura, Decapoda). *Invertebrate Reproduction e Development*, 35, 203-214.
- Tudge, C. C. (2009). Sperm morphology and its bearing on decapod phylogeny. In: Martin, J. W.; Crandall K. A.; Felder, D. L. (Eds) Decapod crustacean phylogenetics. *Crustacean issues 18*. Taylor and Francis/CRC Press.
- Tudge, C. C.; Jamieson, B. G. M. (1996a). Spermatophore and spermatozoal morphology in the Porcellanidae. I. *Aliaporcellana suluensis* and *Pisidia longicornis* (Decapoda: Anomura: Porcellanidae). *Crust Res* 25, 73–85.
- Tudge, C. C.; Jamieson, B. G. M. (1996b). Spermatophore and spermatozoal morphology in the Porcellanidae. II. Genera *Petrolisthes* and *Polyonyx* (Decapoda: Anomura). *Journal of Crustacean Biology*, 16, 535-546.
- Tudge, C.C. (1991) Spermatophore diversity within and among the hermit crab families, Coenobitidae, Diogenidae, and Paguridae (Paguroidea, Anomura, Decapoda). *Biology Bulletin*, 181, 238-247.
- Veloso, V. G., Buckup, L.; Bond-Buckup, G. (1999). Família Porcellanidae (caranguejos anomuros marinhos). *Os crustáceos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 504, 398-405.
- Veloso, V. G.; Melo, G. A. S. (1993). Taxonomia e distribuição da família Porcellanidae (Crustacea: Decapoda: Anomura) no litoral brasileiro. *Iheringia, Série Zoologia*, 75, 171-186.
- Wolfe, J. M, Breinholt, J. W., Crandall, K. A., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., Timm, L. E., Siddall, M. E. e Bracken-Grissom, H. D. (2019). A phylogenomic framework, evolutionary timeline and genomic resources for comparative studies of decapod crustaceans, *Proceedings of the Royal Society B*, 286, 2-10.
- 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.

**Sistema reprodutor masculino em Porcellanidae
e implicações filogenéticas em Anomura.**

Resumo

Neste trabalho, realizamos pela primeira vez a descrição comparativa do sistema reprodutor masculino, produção, composição química do fluido seminal e a caracterização dos espermatóforos em sete espécies de Porcellanidae. O testículo de todas espécies estudadas é do tipo lobular. Os vasa deferentia foram divididos arbitrariamente em regiões proximal (PVD), média (MVD) e distal (DVD), devido a ausência de regiões anatômicas diferentes. Na PVD os espermatozoides livres estão imersos em secreção tipo I, a qual é uma matriz gelatinosa, glicoproteica, negativa para polissacarídeos ácidos, que por aglutinação formam massas espermáticas. A matriz encontra-se envolta por uma secreção tipo II basófila, fortemente positiva para proteínas, positiva para polissacarídeos neutros e ácidos. Na MVD o epitélio colunar simples, pouco mais delgado em relação a região anterior, possui no lúmen uma secreção adicional, tipo III, acidófila e glicoproteica, sem reatividade para polissacarídeos ácidos. A secreção do tipo II em conjunto com ação muscular e aumento do volume da secreção tipo III começa a envolver as massas de espermatozoides para formar as paredes da ampola e o pedúnculo dos espermatóforos. Os pedúnculos são aderidos através do pé sobre a secreção tipo III, a qual se trata de um longo cordão gelatinoso. Na DVD o epitélio pavimentoso simples encontra-se envolto por espessa camada muscular. O material luminal tem as mesmas características químicas apresentadas na região anterior, porém devido ao lumen mais amplos, os espermatóforos encontram-se mais separados. Em Porcellanidae, os espermatóforos seguem o padrão encontrado na maioria dos Anomura, sendo os espermatóforos pedunculados e divididos em três grandes regiões: ampola, pedúnculo de comprimento variável, e pé. Porém em Porcellanidae, o pedúnculo é diminuto e a ampola é classificada como simples, estas características são compartilhadas com outros Galatheaidea, das famílias Galatheididae e Munidae, sendo diferente de Paguroidea, Lithodoidea e Limosoidea, os quais o pedúnculo varia de curto a longo, e em algumas espécies além da ampola principal, nota-se o surgimento de uma ampola acessória. Em Hippidae os espermatóforos são tripartidos, porém estão aderidos, formando uma fita espermatóforica contínua, não sendo separado totalmente as ampolas e pedúnculos. Desta maneira, os espermatóforos não podem ser considerados como caráter seguro para separação de família, gênero e espécies em Anomura.

Palavras-chave: anatomia; microscopia eletrônica; histologia; histoquímica; caranguejos porcelana.

Abstract

In this work, we performed for the first time the comparative description of the male reproductive system, production, chemical composition of the seminal fluid and the characterization of spermatophores in seven species of Porcellanidae. The testis of all studied species is of the lobular type. The vasa deferentia were arbitrarily divided into proximal (PVD), medium (MVD) and distal (DVD) regions, due to the absence of different anatomical regions. In PVD, free sperm are immersed in type I secretion, which is a gelatinous, glycoprotein matrix, negative for acid polysaccharides, which by agglutination form sperm masses. The matrix is surrounded by a type II basophil secretion, strongly positive for proteins, positive for neutral and acidic polysaccharides. In MVD, the simple columnar epithelium, slightly thinner in relation to the anterior region, has an additional type III, acidophilic and glycoprotein secretion in the lumen, with no reactivity for acid polysaccharides. Type II secretion together with muscle action and increased volume of type III secretion begins to involve the masses of sperm to form the walls of the ampoule and the peduncle of the spermatophores. The peduncles are adhered through the foot on the type III secretion, which is a long gelatinous cord. In DVD, the simple pavement epithelium is surrounded by a thick muscular layer. The luminal material has the same chemical characteristics presented in the previous region, but due to the larger lumen, the spermatophores are more separated. In Porcellanidae, spermatophores follow the pattern found in most Anomura, the spermatophores being pedunculated and divided into three large regions: ampoule, peduncle of variable length, and foot. However, in Porcellanidae, the peduncle is small and the ampoule is classified as simple, characteristics that are shared with others Galatheaidea, from the family Galatheididae and Munidae, being different from Paguroidea, Lithodoidea and Limosoidea, which the peduncle varies from short to long, and in some species in addition to the main ampoule, an accessory ampoule appears. In Hippidae the spermatophores are tripartite, however they are adhered, forming a continuous spermatophoric tape, the ampoules and peduncles not being completely separated. Thus, spermatophores cannot be considered as a good character for separation of family, genus and species in Anomura.

Keywords: anatomy; electron microscopy; histochemistry; histology; porcelain crabs.

Introdução

A Infraordem Anomura MacLeay, 1838 contém 7 superfamílias, 20 famílias, 335 gêneros e mais de 2.500 espécies. O ancestral comum mais recente de todas as famílias atuais irradiou-se logo após o Triássico representando a origem do primeiro clado de ramificação Albuneidae-Hippidae (Bracken-Grissom et al., 2013). A família Porcellanidae pertence à superfamília Galatheoidea Samouelle, 1819 juntamente com Galatheidae Samouelle, 1819 e Munididae Ahyong, Baba, Macpherson & Poore, 2010. As superfamílias Paguroidea Latreill, 1802, Lithodoidea Samouelle, 1819, Aeloidea Dana 1852 são considerados grupo-irmão de Galatheoidea (Bracken-Grissom et al., 2013).

A morfologia comparativa do sistema reprodutor em Decapoda, bem como a ultraestrutura dos espermatozoides e espermatóforos, vem fornecendo caracteres utilizados para resolver problemas taxonômicos e estabelecer relações de parentescos entre grupos de crustáceos (Jamieson e Tudge, 1990; Jamieson, 1991; Jamieson et al., 1995; Mantelatto et al., 2009; Fantucci e Mantelatto, 2011).

Em geral, o sistema reprodutor masculino de Decapoda é formado por um órgão bilateral, composto por um par de testículos ligados a um par de vasa deferentia, o qual termina nos gonópodos (Krol et al., 1992). A espermatogênese e espermiogênese ocorrem nos testículos, sendo este órgão classificado histologicamente como lobular ou tubular (Nagao e Munehara, 2003). Em Anomura, os espermatozoides maduros, são liberados no vaso deferente, que pode ser dividido em três regiões com base na proximidade com o testículo: proximal (PVD), onde os espermatozoides encontram-se livres; região média (MVD); onde os espermatóforos são montados e a região distal (DVD), onde os espermatoforos estão totalmente formados e mais separados uns dos outros, devido ao volume de fluido seminal (Mouchet, 1931; Hinsch, 1991; Kronenberger et al., 2004; Tirelli et al., 2006, 2010; Buranelli et al., 2014). Apesar desta caracterização anatômica e morfológica, o sistema reprodutor masculino em Porcellanidae é desconhecido sob o ponto de vista histológico, histoquímico e ultraestrutural.

Em Anomura existe uma grande variedade e complexidade na morfologia dos espermatóforos (Tudge, 1991; Subramoniam, 2017). Em geral, os espermatozoides estão incluídos nos espermatóforos coenospérmicos, caracterizados por uma ampola, pedúnculo com comprimento variável e pé, sendo classificado como espermatóforos tripartidos (Tudge, 1991; Scelzo et al., 2004;

Amadio e Mantelatto, 2009; Buranelli et al., 2014). Os espermatóforos da família Porcellanidae descritos em literatura (Tudge e Jamieson, 1996a,b) apresentaram pedúnculo diminuto e ausência de ampola acessória (Tudge e Jamieson, 1999a,b). Esta mesma morfologia foi descrita para espermatóforo de Galatheidæ e Munididae (Hinsch, 1991; Kronenberger et al., 2004), o que mostra ser uma característica exclusiva de famílias pertencentes a Galatheoidea, uma vez que, outras superfamílias de Anomura como Paguroidea, Lithodoidea e Lomisoidea apresentam variações em relação ao comprimento do pedúnculo, podendo ser curto ou longo e em algumas espécies ocorre a presença a formação de ampola dupla ou acessória (Tudge, 1991, 1995, 1997a, c; Tudge et al., 1998; Fantucci e Mantelatto, 2011).

Outros padrões morfológicos podem ser observados para os espermatóforos dentro de Anomura. Na família Hippidae, apesar dos os espermatóforos também serem tripartidos, estes encontram-se totalmente aderidos uns aos outros formando uma fita espermatofórica contínua (Mattheus, 1956; Hinsch, 1991; Tudge, 1997 a,c, 1999; Kronenberger et al., 2004;). Por outro lado, nas poucas espécies estudadas em Aeglidæ, o espermatóforo é ausente. (Sokolowicz et al., 2007). Apesar da análise comparativa dos espermatóforos já terem sido estudadas entre famílias de ermitões (Tudge, 1991), uma análise ampla entre as superfamílias de Anomura nunca foi realizada.

Assim, neste trabalho descrevemos pela primeira vez a histologia e ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de Porcellanidae, caracterizando a produção do fluido seminal, composição química, empacotamento e morfologia dos espermatóforos, buscando compreender como ocorreu a evolução da estrutura do espermatóforo e se esta estrutura apresenta padrão nas superfamílias e famílias de Anomura que permitam separá-las através da utilização dos espermatóforos.

Material e Métodos

Machos adultos (N = 5) de *Megalobrachium roseum* (Rathbun, 1900), *Pisidia brasiliensis* Haig in Rodrigues da Costa, 1968, *Porcellana sayana* (Leach, 1820) *Pachycheles monilifer* (Dana, 1852), *Petrolisthes armatus* (Gibbes, 1850), e *Pachycheles riisei* (Stimpson, 1859), sendo esta espécie somente um indivíduo coletado, foram coletados entre março de 2018 e março de 2019 nos municípios de Ubatuba (25 ° 07'385''S / 47 ° 52'508''W) e São Vicente, Estado de São Paulo,

Brasil (23°58'52. 19"S/ 46°27'15.66"W). Adicionalmente, dois indivíduos de *Petrolisthes granulosus* (Guérin, 1835) e *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835) foram amostrados no município de Valdivia, Chile (39°48'51" S/ -73° 14'45" O). As coletas foram realizadas manualmente ou por mergulho livre e autônomo, além de arrasto com barco de pesca camaroeira. Após serem coletados, os animais foram transportados vivos em caixas de isopor com aeração adequada para o laboratório e mantidos em aquários até o momento da dissecação.

Para a descrição do sistema reprodutor e análise da produção de fluido seminal, os animais foram anestesiados por choque térmico (-20°C/10 min) durante 15 min e posteriormente dissecados. As amostras de sistema reprodutor masculino foram fixadas em paraformaldeído a 4% preparado com água do mar em tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 7,2) por 24 h (4 °C). Durante este período, a anatomia geral do sistema reprodutor masculino foi fotografada com uso do estereomicroscópio com sistema de imagem e mensuração IM50Leica®. Após a fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em álcool (70 a 100%), embebidas e incluídas em resina glicolmetacrilato Leica®. Cortes seriados de 4-7 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e corados com hematoxilina e eosina para descrição histológica geral (Junqueira e Junqueira, 1983). Para as análises histoquímicas, as lâminas foram coradas com Xylidine ponceau para detecção de proteínas totais (Mello e Vidal, 1980), ácido periódico de Schiff (PAS) e azul de Alcian (pH 2,5) para detecção de polissacarídeos neutros e ácidos, respectivamente (Junqueira e Junqueira, 1983). Para análise ultraestrutural do vaso deferente e espermatóforos, porções (1mm³) do vaso deferente foram fixadas por 4 horas em solução Karnovsky (2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído) em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,3) preparado com água do mar filtrada, sendo posteriormente pós- fixadas em 1% de tetróxido de ósmio, no mesmo tampão, por 2 horas. A contrastação "En Bloc" foi realizada com acetato de uranila 2% aquaso (Overnight, 4°C). As amostras foram desidratadas em acetona (50% a 100%), embebidas e incluídas em resina Epon- Araldite. Os cortes finos e ultrafinos (50 a 60 nm) foram seccionados no ultramicrotomo Leica UC7, recolhidos em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo a 2% (Zana et al., 2001). As micrografias foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão (MET) Jeol J1010 operado com feixe de elétrons a 80KV.

Para a caracterização morfológica dos espermátóforos, fragmentos de vaso deferente também fixados em solução de Karnovsky (1965) foram analisados sob microscopia de luz e eletrônica. Para a microscopia de luz, os vasos deferentes passaram pela montagem total, com leve esmagamento da lamínola contra a lâmina. Os espermátóforos foram analisados, medidos e fotografados no microscópio de contraste interdifereencial de fase (DIC) Zeiss Axioscope, por meio do programa Axio Vision. Para a microscopia eletrônica de varredura, as amostras após a foram completamente secas no ponto crítico EMS 850, com CO₂ líquido. Os materiais foram aderidos aos “stubs” e recobertos por ouro (5 nm) em no metalizador Supputering SC 070 Balzer Union. As imagens foram obtidas no MEV Zeiss Evo 10, operado com voltagens variando de 10-20 kV. Tendo em vista a grande similaridade anatômica do sistema reprodutor, optou-se por processar a única amostra da espécie *Pachycheles riisei* (Stimpson, 1859) para a caracterização do espermátóforo por meio da MEV e DIC.

As diferentes regiões do espermátóforo tripartido foram nominadas como ampola, pedúnculo e pé (ou base) seguindo a nomenclatura de (Tudge, 1991; Tudge e Jamieson 1996a,b). Contudo, para a classificação da morfologia da ampola do espermátóforo, seguiu-se a nomenclatura padrão e métrica utilizada para as formas planas de gregarinas proposta por Clopton (2004).

Para descrever e comparar as estruturas dos espermátóforos de Porcellanidae e outros Anomura descritos na literatura, foram tomadas as medidas: comprimento e largura do pedúnculo, comprimento e largura da ampola, comprimento total do espermátóforo (pedúnculo mais ampola), presença ou ausência de projeção tubular da ampola, presença ou ausência de ampola acessória. O pedúnculo dos espermátóforos foi classificado de acordo com o seu comprimento em diminuto (1 a 20 µm), curto (21 a 100 µm) e longo (acima de 101 µm). As medidas foram realizadas nas imagens obtidas em DIC através do programa ImageJ, no qual para Porcellanidae foram mensurados 15 espermátóforos por indivíduo (Zar, 1984). Para as outras famílias de Anomura disponíveis na literatura, as medidas foram tomadas de acordo com a disponibilidade de micrografias com barra de escala e/ou resultados descritos em cada trabalho. Os resultados dos caracteres e medidas morfológicas obtidos neste trabalho foram organizados na tabela I. O comprimento do pedúnculo e comprimento e largura da ampola foram plotados em gráfico através do programa

Oringi 8.0.

Resultados

Anatomia geral

Macroscopicamente, o sistema reprodutor masculino em todas as espécies estudadas apresentou-se como um órgão bilateral em formato de letra “H”, composto por testículos com anatomia tubular ondulado unidos por uma comissura central conectados ao par de vasa deferentia (Fig. 2A e B). O vaso deferente apresenta-se sob a forma de um túbulo único e translúcido. Devido a ausência de caracteres anatômicos em todas as espécies estudadas, as regiões do vaso deferente foram determinadas arbitrariamente de acordo com sua proximidade com o testículo divididas em região proximal (PVD), média (MVD) e distal (DVD) (Fig. 2A e B). Para as espécies *M. roseum*, *Pi. brasiliensis*, *Po. sayana*, *Pa. monilifer* e *Pa. riisei*, *Pe. granulosus* e *Pe. laevigatus*, o vaso deferente possui aspecto convoluto em toda extensão (Fig. 2A). Na espécie *P. armatus* a PVD e MVD apresentam aspecto espiralado, sendo a região distal reta (Fig. 2B) se abrindo na coxa do quinto par de pereiópodos (Fig. 2A e B).

Histologia e histoquímica

Testículo

Nas oito espécies estudadas, os testículos mostram o mesmo padrão histológico, classificado como do tipo lobular. O testículo contém numerosos lóbulos (ou ácinos) seminíferos que se encontram envoltos por células acessórias (Sertoli) assentadas sobre uma camada de tecido conjuntivo (Fig. 3A). As células em cada lóbulo encontram-se em estágios distintos de espermatogênese e espermiogênese (Fig. 3A).

A espermatogênese e a espermiogênese seguiu o mesmo padrão em todas as espécies deste trabalho. As espermatogônias são células que apresentam núcleos arredondados, preenchido com heterocromatina, nucléolo evidente e citoplasma reduzido (Fig. 3B). Os espermatócitos primários apresentaram núcleo marcado pelos diferentes estágios de prófase meiótica devido a condensação cromossômica (Fig. 3C). Os espermatócitos secundários são caracterizados pelo núcleo arredondado corado de forma homogênea e com tamanho evidentemente

menor do que nos espermátocitos primários (Fig. 4D).

As espermátides foram divididas em três estágios distintos: inicial (EST), intermediária (IST) e tardia (LST). As EST apresentam núcleos ainda arredondados com pequena vesícula acrossomal evidente (Fig. 3E). A principal característica das IST é a alteração da morfologia nuclear, onde o núcleo passa a ser achatado em um dos polos, aqui denominado de polo basal e a vesícula acrossomal no polo oposto ao núcleo, denominado de pólo apical (Fig. 3F). Nas espermátides tardias, a morfologia relembra o espermatozoide, mostrando a vesícula acrossomal bem desenvolvida e excêntrica, quase destacada do núcleo (Fig. 3G). Os espermatozoides encontram-se no lúmen do ducto seminífero caracterizado pelo polo apical marcado com a vesícula acrossomal bem evidente, sempre saliente ao núcleo por meio de uma região citoplasmática (Fig. 3H).

Vaso deferente

O vaso deferente apresentou o mesmo padrão de composição química do fluido seminal e a formação e montagem dos espermatóforos nas sete espécies estudadas. Somente a morfologia da ampola do espermatóforo teve variação entre algumas espécies. A PVD possui epitélio colunar simples, assentado sobre uma camada de musculatura e envolto por uma camada delgada de tecido conjuntivo (Fig. 4A-D). No lúmen da PVD observa-se dois tipos de secreções: secreção tipo I basófila, no qual os espermatozoides livres estão imersos, e secreção tipo II, também basófila, mais compacta, envolvendo a secreção tipo I, preenchendo os espaços até o ápice do epitélio (Fig. 4A e B). A secreção tipo I começa a ser compactada em massas espermáticas isoladas separadas uma das outras pela secreção tipo II, provavelmente devido à ação muscular (Fig. 4C e D). Histoquimicamente, a secreção tipo I e II são reativas para proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos, porém secreção tipo II é levemente menos positiva para proteínas, positiva para polissacarídeos neutros e ácidos nesta região (Fig. 4E-I).

Na MVD, o epitélio colunar simples é inicialmente alto, ligeiramente mais delgado que a PVD e vai se tornando cúbico mais próximo a DVD. A musculatura abaixo do epitélio mantém a mesma espessura. No lúmen desta região ocorre o aparecimento da secreção do tipo III acidófila (Fig. 5A-C). Devido ao aumento

progressivo do volume desta última secreção e, muito provavelmente com o auxílio da ação da musculatura, esta secreção ajuda na maior separação das massas espermáticas formada pela secreção tipo I e a secreção tipo II delimitando as paredes das ampolas, as quais são contínuas com os pedestais ou pedúnculos e pé dos espermatóforos. Cada base encontra-se aderida a secreção do tipo III, a qual atua como um cordão gelatinoso. Este cordão é intensamente reativo para proteínas, menos positivo para polissacarídeos neutros e negativo para os ácidos (Fig. 5D-G). Na MVD a secreção tipo I é positiva para proteínas, polissacarídeos neutros, e fortemente reativa para os ácidos (Fig. 5D- G). A secreção do tipo II apresenta dois componentes com diferença de intensidade para proteínas, sendo um menos positivo em relação ao outro (Fig. 5D). Esta secreção tipo II tem reação homogênea para polissacarídeos, sendo intensamente reativa para os neutros e positiva para os ácidos (Fig. 5E-G).

A DVD apresenta o epitélio pavimentoso simples, claramente identificado por seus núcleos achatados e citoplasma discreto. A musculatura torna-se acentuadamente espessa próximo ao gonópore (Fig. 5H). As secreções mantêm as mesmas características químicas observadas na MVD (Fig. 5H-O). Somente na espécie *P. armatus*, nota-se uma projeção bastante característica, a projeção tubular da ampola. Esta projeção é um prolongamento oco da parede da ampola, com lúmen contínuo a área onde estão os espermatozoides. Esta projeção tem a parede positiva para proteínas, polissacarídeos neutros e negativa para os ácidos (Fig. 5M-O).

Ultraestrutura dos vasa deferentia e espermatóforos

O epitélio das diferentes regiões do vaso deferente nas sete espécies de Porcellanidae aqui estudadas, apresentam a mesma característica ultraestrutural. Assim, serão utilizados como modelo descritivos as espécies *M. roseum* e *P. armatus*. O epitélio do vaso deferente na região proximal apresenta uma camada de tecido conjuntivo e a camada muscular nem sempre é notada, provavelmente devido a uma distribuição helicoidal das suas fibras (Fig. 6A e B). O lúmen da PVD é preenchido por uma secreção com três elementos eletrondenso e elétron-lúcida (Fig. 6A). Em todas as regiões, as células epiteliais mostram o citoplasma preenchido por retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocôndrias e complexo de Golgi (Fig. 6B). A região basal das células epiteliais em todas as regiões é

caracterizada por invaginação da membrana plasmática, com muitas mitocôndrias próximas. Ainda na PVD nota-se uma camada muscular delgada logo abaixo da lâmina basal espessa (Fig. 6C). A região apical das células contém RER, complexos de Golgi, mitocôndrias e pequenas vesículas elétricas-lúcidas as quais são exocitadas por entre as microvilosidades (Fig. 6D e E). As células da DVD mantêm seu aspecto sintetizador de proteínas, porém abaixo da lâmina basal, pode-se notar as fibras musculares em corte oblíquo (helicoidal) e transversal. As células são pavimentosas e continuam preenchidas por RER. Porém as microvilosidades são mais esparsas, bem como as invaginações da membrana plasmática basal torna-se pouco profundas. No lúmen pode-se notar as diferentes secreções, sendo a secreção tipo III, a qual forma o cordão gelatinoso, com característica semelhante a impressão digital, enquanto a tipo II é mais granular formado por componentes de diferentes eletrondensidades (Fig. 6F, G e 7A).

Ultraestruturalmente em todas as espécies de Porcellanidae aqui estudadas, o lúmen do vaso deferente é preenchido pela secreção tipo I, no qual os espermatozoides estão embebidos, com característica granular composta por diferentes densidades de elétrons (Fig. 7A-F). A secreção tipo II, granular com dois elementos: um mais eletrondenso responsável por formar a parede da ampola, pedestal e o pé dos espermatóforos, cuja a formação acontece por aglutinação deste material granular (Fig. 7F-I). A secreção tipo III é responsável pela formação do cordão gelatinoso e contínuo, no qual os espermatóforos são aderidos pelo pé, sendo constituída por dois componentes diferentes (Fig. 7J-L). O primeiro componente forma uma camada com aspecto viscoso, em contato com a secreção tipo II. Este componente é eletrondenso e possui grânulos menos eletrondensos (Fig. 7M). O outro componente, em contato com as células epiteliais possui um material de aspecto fibrilar e globular assumindo um aspecto de impressão digital. Este componente forma a principal matriz gelatinosa do cordão e é onde o pé do espermatóforo está inserido (Fig. 7M-O).

Microscopia eletrônica de varredura e contraste interdiferencial de fase

Os espermatóforos das espécies de Porcellanidae aqui estudadas apresentaram padrão tripartidos compostos por ampola, pedestal diminuto e pé (Fig. 8A-V). As ampolas compõem a peça mais destacada, bem desenvolvida, formadas por duas válvulas que quando unidas, formam uma linha de abertura,

constituindo uma porção mais rígida e elevada da ampola (Fig. 7I e 8C, F, G, Q e V). A ampola foi dividida em região anterior, sendo aquela com margem livre na secreção tipo II e região posterior, na margem de contato com pedestal e o pé. A ampola apresentou formas variadas, sendo uma mesma forma encontrada em diferentes gêneros de Porcellanidae (tabela I).

A ampola de *Megalobrachium roseum* foi classificada como ovoide, não muito alongada com a sua região posterior levemente mais larga do que a anterior (Fig. 8A-C) e seu pedúnculo mede $4,2 \pm 0,36 \mu\text{m}$. A ampola de *Pa. monilifer* é classificada como eliptóide, sendo mais longa do que larga (Fig. 8D-F) o pedúnculo diminuto possui comprimento de $3,01 \pm 0,26 \mu\text{m}$. Em *Pa. risei* a ampola é fusiforme, com a margem anterior e posterior ligeiramente mais afilada que a porção mediana e o pedúnculo diminuto têm $4 \pm 0,28 \mu\text{m}$ de comprimento (Fig. 8G-I). A espécie *Pi. brasiliensis* tem sua ampola em formato largamente deltoide, com as margens posteriores mais largas que suas extremidades, e pedúnculo volumoso com $8,93 \pm 0,77 \mu\text{m}$ (Fig. 8J e K). *Por. sayana* por sua vez, também apresenta ampola elipsóide como vista em *Pa. monilifer*, porém seu pedúnculo tem $2,73 \pm 0,49 \mu\text{m}$ de comprimento (Fig. 8L-N). As espécies do gênero *Petrolisthes* aqui estudadas possuem uma longa ampola finamente deltoide, onde sua margem posterior é mais larga do que sua margem anterior, como claramente observado em *P. laevigatus* com pedúnculo diminuto medindo $5,14 \pm 0,49 \mu\text{m}$ (Fig. 8O e P), *P. granulosus* $5,98 \pm 0,53 \mu\text{m}$ (Fig. 8Q e R) e *P. armatus* que possui pedúnculo diminuto com comprimento de $16,73 \pm 2,02 \mu\text{m}$ (Fig. 8S-V).

Apenas em *Petrolisthes armatus*, a ampola mostra uma modificação, a projeção tubular da ampola. Esta estrutura é um longo filamento oco, o qual também mostra a presença da linha de abertura acompanhando sua projeção (Fig. 8T). Por meio do DIC, foi possível observar o desenvolvimento da projeção tubular da ampola em *P. armatus* a qual forma-se no início da MVD, tornando-se completa ainda nesta região (Fig. 8W-Y).

Os espermatóforos de Porcellanidae e Galatheidae foram classificados com pedúnculo diminuto em relação ao seu comprimento. As outras superfamílias têm pedestal curto ou longo, sem um padrão típico para as superfamílias ou mesmo para uma família (Fig. 9 e tabela II). A razão comprimento pela largura das ampolas agrupou apenas os Porcellanidae, e Galatheidae apresentou razão bastante diferente. Os pedestais e a ampola também mostram um padrão em famílias de

Anomura (Fig. 10 e tabela II).

Figura 1. Diagrama geral do espermatóforo em Porcellanidae, indicando as medidas realizadas: **CA:** comprimento da ampola; **CP:** comprimento do pedúnculo; **CT:** comprimento total do espermatóforo; **f:** pé; **LA:** largura da ampola; **LP:** largura do pedúnculo; **PTA:** projeção tubular da ampola.

A: espermatóforo de *Petrolisthes armatus*. **B:** espermatóforo de *Pisidia brasiliensis* representando as demais espécies.

Fig. 1

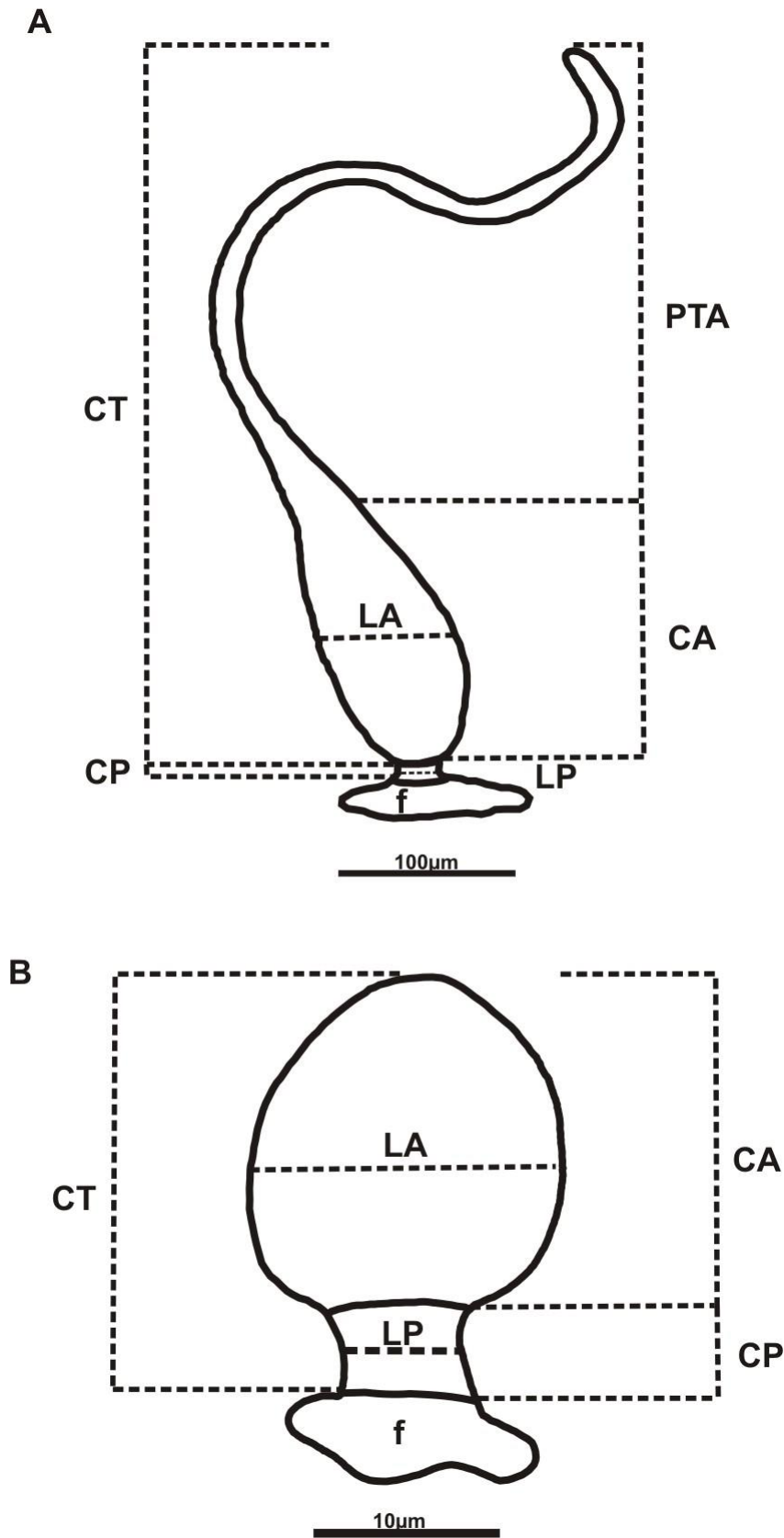
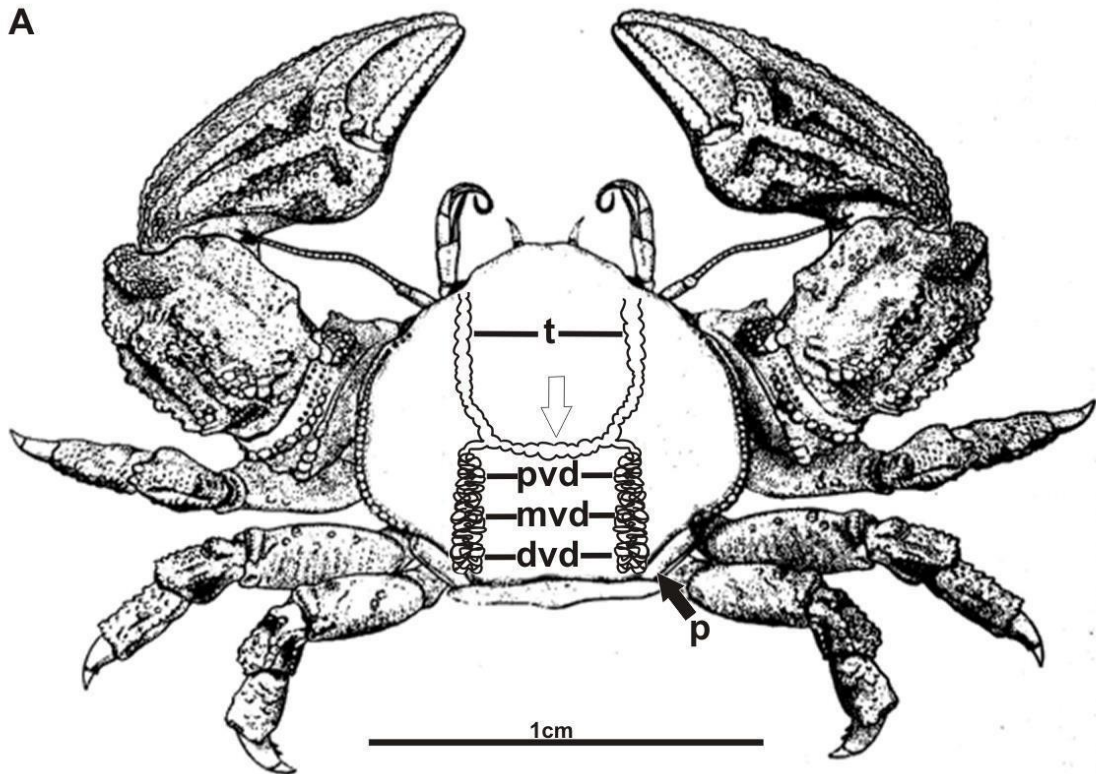


Figura 2. Esquema geral do sistema reprodutor masculino em Porcellanidae adaptado de Mello (1992) e Kronenberger et al. (2004). Padrão anatômico do sistema reprodutor masculino em formato de “H” disposto na cavidade cefalotorácica. O par de testículos estão conectados por uma comissura central (seta branca) e desembocam no vaso deferente, também pareado. Este vaso foi dividido arbitrariamente em região proximal, média e distal, a qual desemboca no gonópodo da coxa do reduzido quinto par de pereópodo (seta preta). Nas espécies *Megalobrachium roseum*, *Pisidia brasiliensis*, *Porcellana sayana*, *Pachycheles monilifer*, *Pachycheles riisei*, *Petrolisthes granulosus* e *Petrolisthes laevigatus* o vaso deferente é um tubo convoluto **(A)**, enquanto em *Petrolisthes armatus* forma voltas semelhante a um mola helicoidal **(B)**. **t:** testículo; **dvd:** vaso deferente distal; **mvd:** vaso deferente médio; **pvd:** vaso deferente proximal.

Fig. 2

A



B

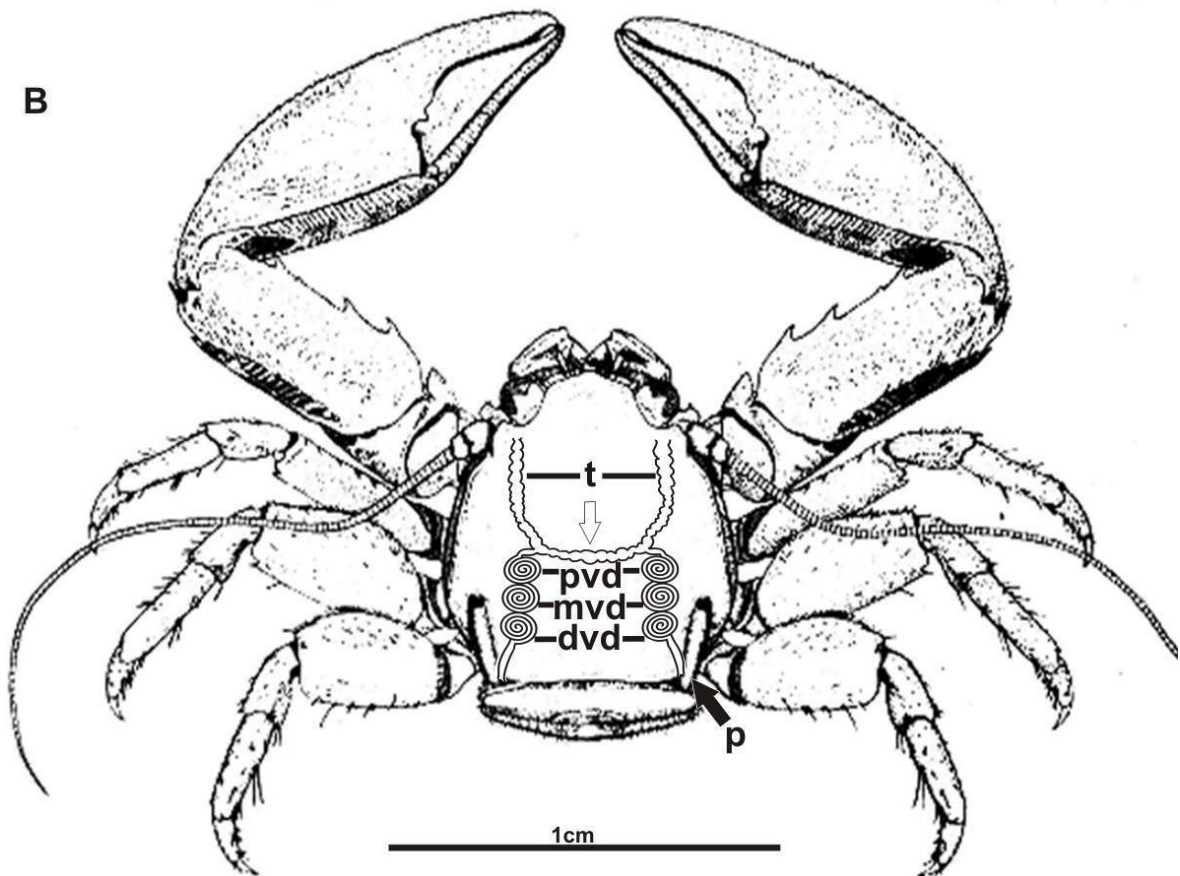


Figura 3. Espermatogênese e espermiogênese em Porcellanidae.

Nas sete espécies estudadas aqui, os testículos mostram o mesmo padrão histológico, classificado como do tipo lobular, assim utilizamos como modelo descritivos as espécies *Pisidia brasiliensis* e *Petrolisthes armatus*. **A:** Aspecto geral do testículo do tipo lobular envolto por tecido conjuntivo, justaposto a células acessórias (seta branca). **B:** espermatogônias com núcleos grandes com heterocromatina e nucléolo evidente (seta preta). **C:** espermatócitos primários com núcleo arredondado com cromossomos condensados em prófase meiótica (seta preta). **D:** espermatócitos secundários com núcleos compactos e homogêneos (seta preta). **E:** espermatíde inicial com núcleo arredondado (setas brancas) e pequena vesícula pró-acrossomal (setas pretas). **F:** espermatíde intermediária distinguindo dois pólos, o acrossomal (setas pretas) e o nuclear (setas brancas). **G:** espermatíde tardia ainda no lóbulo seminífero, com morfologia semelhante à dos espermatozoides, com vesícula acrossomal (setas pretas) praticamente madura e excêntrica a um núcleo (setas brancas). **H:** Espermatozoides maduros e livres no ducto seminífero com pólo apical bem marcado pela vesícula acrossomal (setas pretas), anexada posteriormente a um núcleo globular (setas brancas), por meio de delgada região citoplasmática (cabeça de seta). **ac:** célula acessória; **ct:** tecido conjuntivo; **dc:** ducto coletor; **est:** espermatíde inicial; **ist:** espermatíde intermediária; **lst:** espermatíde tardia; **n:** núcleo; **spg:** espermatogônia; **spcl:** espermatócito primário; **spcll:** espermatócito secundário; **sz:** espermatozoides.

Figura A, B, C e F: *Petrolisthes armatus*; **Figura D, E, G e H:** *Pisidia brasiliensis*.

Fig. 3

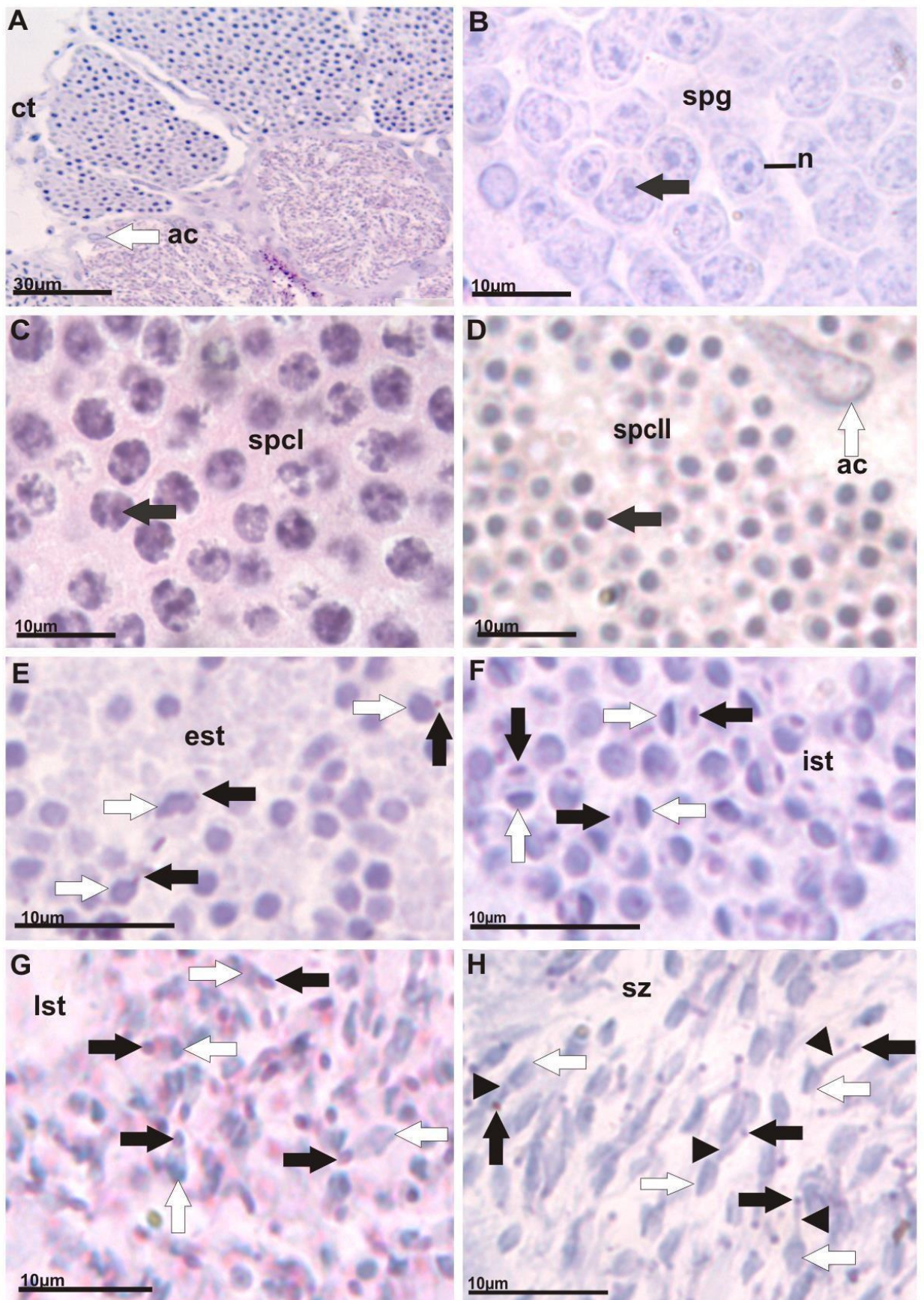


Figura 4. Vaso deferente proximal (PVD) de Porcellanidae.

A: corte longitudinal mostrando espermatozoides embebidos em secreção tipo I basófila, e ao redor do epitélio presença da secreção tipo II fortemente basófila (seta preta). Corado com HE **B:** detalhe do lúmen do vaso com espermatozoides livres imersos em secreção tipo I basófila e envoltos por secreção tipo II fortemente basófila (seta preta). Corado com HE **C:** corte transversal no qual a secreção tipo II basófila, agrupa os espermatozoides em massas espermáticas. **D:** detalhe do PVD mostrando os espermatozoides sendo agrupados. Corado com HE. **E:** Técnica de Xylidine ponceu evidenciando o caráter proteico das secreções do vaso. **F:** Destaque para secreção tipo II fortemente positiva para proteínas (seta branca). Corado com Xylidine ponceu **G:** Reação positiva para polissacarídeos neutros das secreções na PVD. Corado com PAS **H:** Detalhe do lúmen do vaso apontando secreções tipo I (seta preta) e tipo II (seta branca) reativas para polissacarídeos neutros. Corado com PAS. **I:** Reação levemente positiva da secreção tipo II e fortemente positiva da secreção II (seta branca) para polissacarídeos ácidos. Corado com Azul de Alcian. **ep:** epitélio; **m:** camada muscular; **n:** núcleo; **sz:** espermatozoide; **s1:** secreção tipo I; **s2:** secreção tipo II.

Figura A: *Porcellana sayana*; **Figura B, E e H:** *Petrolisthes armatus*; **Figura C:** *Megalobrachium roseum*; **Figura D e F:** *Pisidia brasiliensis*; **Figura G:** *Petrolisthes laevigatus*; **Figura I:** *Pachycheles monilifer*.

Fig. 4

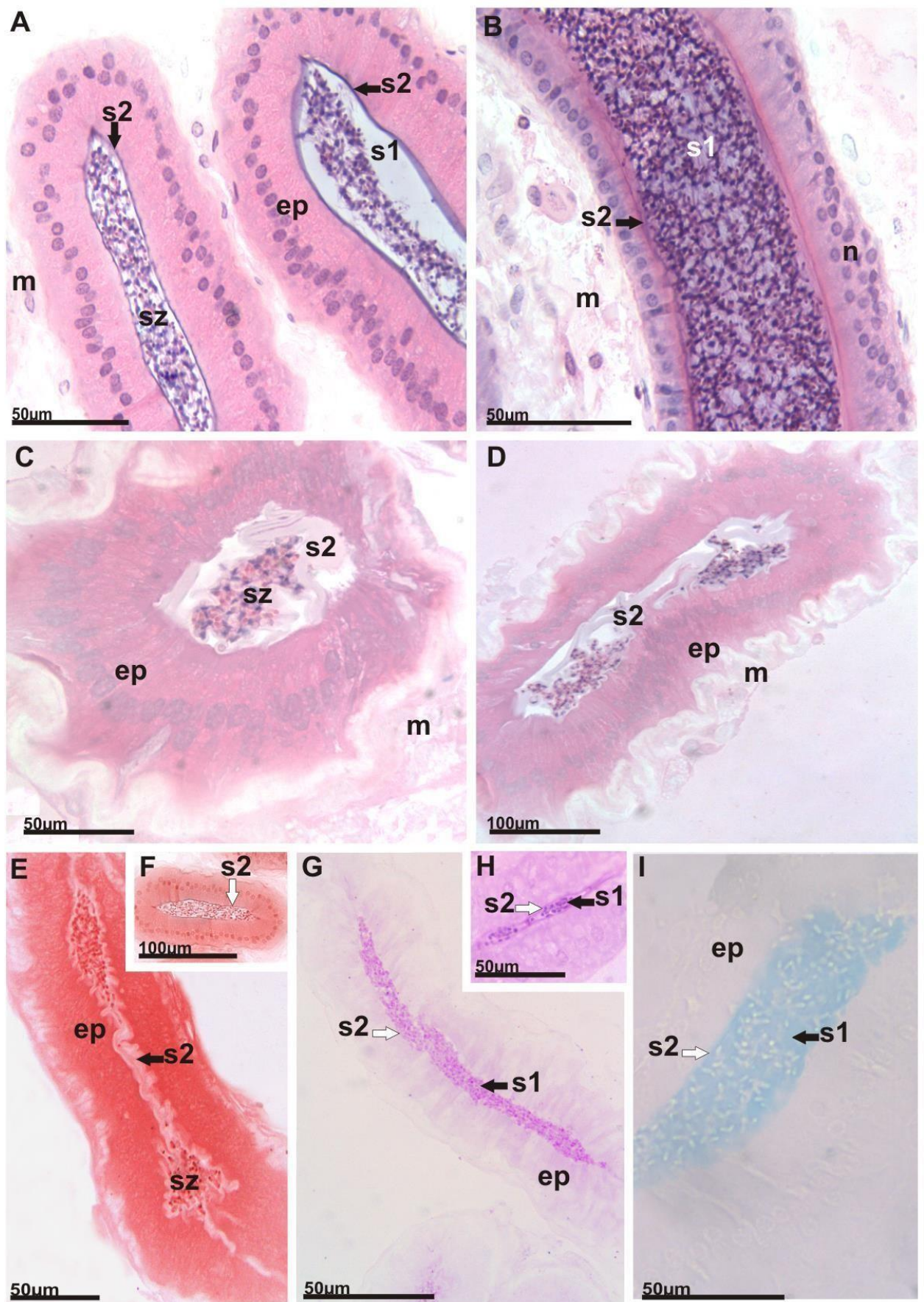


Figura 5. Histologia e histoquímica das regiões média (MVD) e distal (DVD) do vaso deferente em Porcellanidae. A: vista geral do MVD com a secreção tipo III acidófila (cabeça de seta), e secreção tipo II (seta branca) empacotando as massas de espermatozoides. Corado com HE. **B:** Detalhe da ampola e pedúnculo formados pela secreção tipo II e secreção do tipo III formando o pé (cabeça de seta preta). Corado com HE. **C:** Detalhe dos espermatóforos quase totalmente formados e aderidos a secreção tipo

III. Nota-se que o epitélio se encontra mais delgado. Corado com HE. **D:** Técnica de Xylidine Ponceu demonstrando os espermatóforos com reação fortemente positiva para proteínas na MVD. **E:** Reação fortemente positiva dos espermatóforos para polissacarídeos neutros de Porcellanidae. Corado com PAS. **F:** Detalhe do espermatóforo sob técnica de PAS, mostrando a parede da ampola (seta preta), os espermatozoides imersos em secreção I, e o pedúnculo (seta branca). **I:** MVD mostrando caráter acidófilo, com cordão negativo, secreção tipo I fortemente reativa e secreção do tipo II positiva para polissacarídeos ácidos. Corado com Azul de Alcian. **H:** corte transversal da DVD mostrando epitélio com núcleo pavimentoso (cabeça de seta preta) e uma musculatura espessa. Corado com HE. **I:** Corte longitudinal da DVD mostrando a mesma composição química das secreções e espermatóforos observados nas outras regiões. Nota-se epitélio com núcleo pavimentoso e menos espesso que as outras regiões. Corado com HE. **J:** DVD de *P. armatus* com projeção tubular da ampola basófila. Corado com HE. **K:** Detalhe da DVD evidenciando o caráter proteico das secreções e espermatóforos. Corado com Xylidine ponceu. **L:** Detalhe da DVD com reação positiva para polissacarídeos neutros da secreção tipo I (seta preta) e tipo III e fortemente positiva para o espermatóforo e secreção tipo II. Corado com PAS. **M:** Detalhe da DVD mostrando o mesmo caráter acidófilo da MVD. Detalhe para a projeção tubular da ampola, sendo negativa para polissacarídeos ácidos. Corado com Azul de Alcian. **N:** detalhe da parede da projeção tubular da ampola positiva para proteínas. Corado com Xilydine ponceu. **O:** parede da projeção tubular da ampola positiva para polissacarídeos neutros. Corado com PAS.

a: ampola; **ep:** epitélio; **f:** pé **m:** camada muscular; **n:** núcleo; **s:** pedúnculo; **sp:** espermatóforo; **sz:** espermatozoide; **s1:** secreção tipo I; **s2:** secreção tipo II; **s3:** secreção tipo III; **tpa:** projeção tubular da ampola.

Figura A e L: *Pachycheles monilifer*; **Figura B, J, M, N, e O:** *Petrolisthes armatus*; **Figura C e K:** *Petrolisthes laevigatus*; **Figura D:** *Pisidia brasiliensis*; **Figura E:** *Porcellana sayana*; **Figura F:** *Petrolisthes armatus*; **Figura G e I:** *Petrolisthes granulatus*; **Figura H:** *Megalobrachium roseum*.

Fig. 5

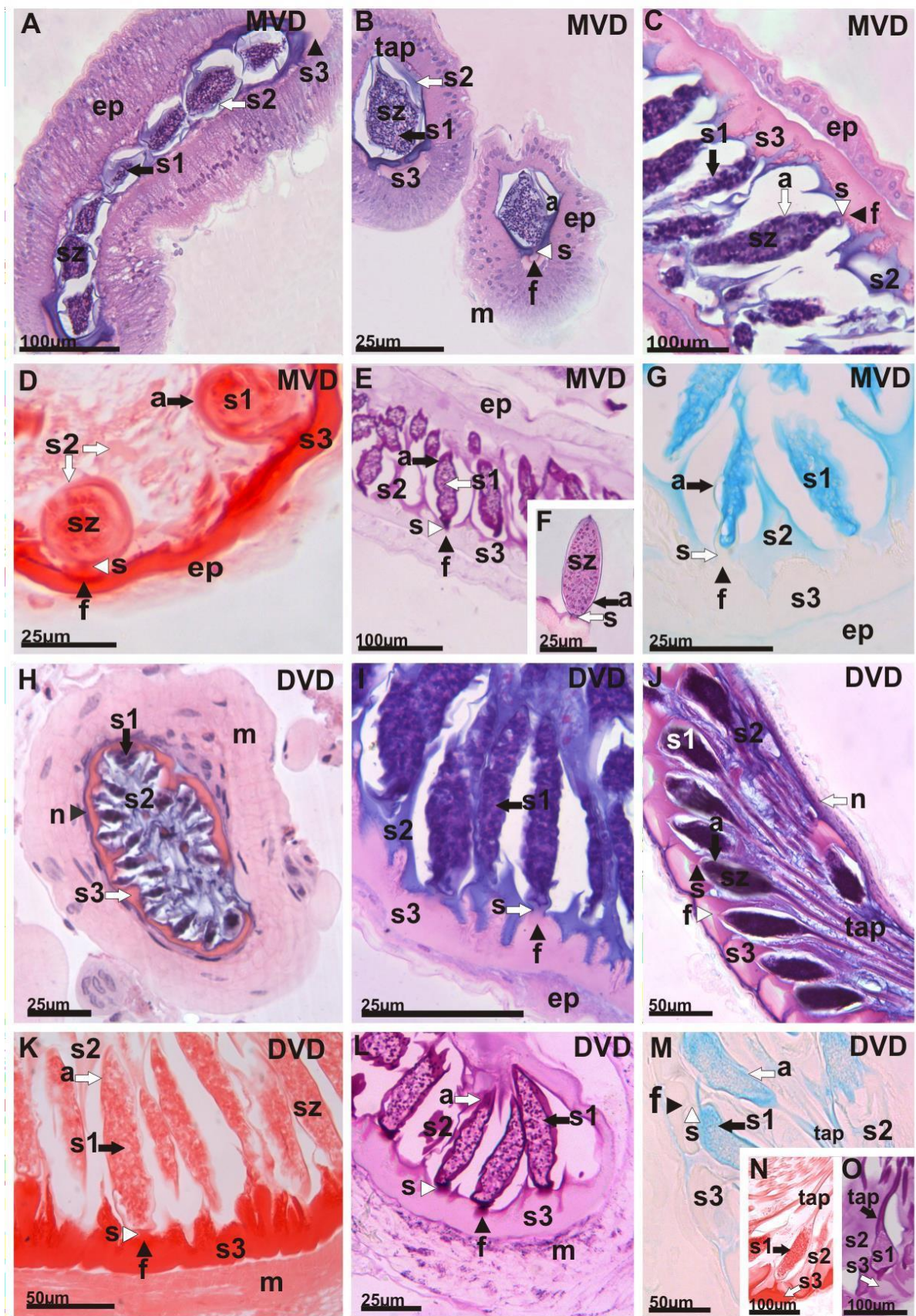


Figura 6. Ultraestrutura do vaso deferente em Porcellanidae.

Nas oito espécies estudadas aqui o vaso deferente seguiu o mesmo padrão, assim utilizamos como modelo descritivos as espécies *M. roseum* e *P. armatus*. **A - D: Vaso deferente proximal.** **A:** Células do epitélio da PVD com núcleos elípticos, sobre o tecido conjuntivo. A musculatura delgada não é observada. O lúmen é preenchido por dois tipos de secreção, sendo uma eletrondensa e outra menos eletrondensa onde os espermatozoides encontram-se livres. Nota-se microvilosidades no polo apical. **B:** citoplasma contendo retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocôndrias e complexo de Golgi. **C:** Detalhe do polo basal com delgada camada muscular, lamina basal, e invaginações da membrana plasmática. **D:** Detalhe do epitélio mostrando o complexo de Golgi. **E:** Detalhe do polo apical, mostrando as microvilosidades, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, e dois tipos de vesículas sendo uma com material granular eletrondensa (seta preta) e outra elétron-lúcida (seta branca). **F e G: Vaso deferente distal.** **F:** Detalhe do polo basal mostrando dois tipos de musculatura uma oblíqua e outra transversal **G:** vista geral do delgado epitélio, com poucas organelas e esparsas microvilosidades. No lúmen nota-se a secreção tipo III, a qual forma o cordão gelatinoso, com aspecto de impressão digital e a secreção tipo II, menos eletrondensa e granular.

bl: lâmina basal; **cg:** complexo golgi; **cy:** citoplasma; **ep:** epitélio; **lm:** musculatura longitudinal; **lu:** lúmen; **mt:** mitocôndrias; **mv:** microvilosidades; **n:** núcleos; **om:** musculatura oblíqua; **rer:** retículo endoplasmático rugoso; **s2:** secreção tipo II; **s3:** secreção tipo III; **tc:** tecido conjuntivo.

Figura A-E: *Megalobrachium roseum*; **Figura F e G:** *Petrolisthes armatus*.

Fig. 6

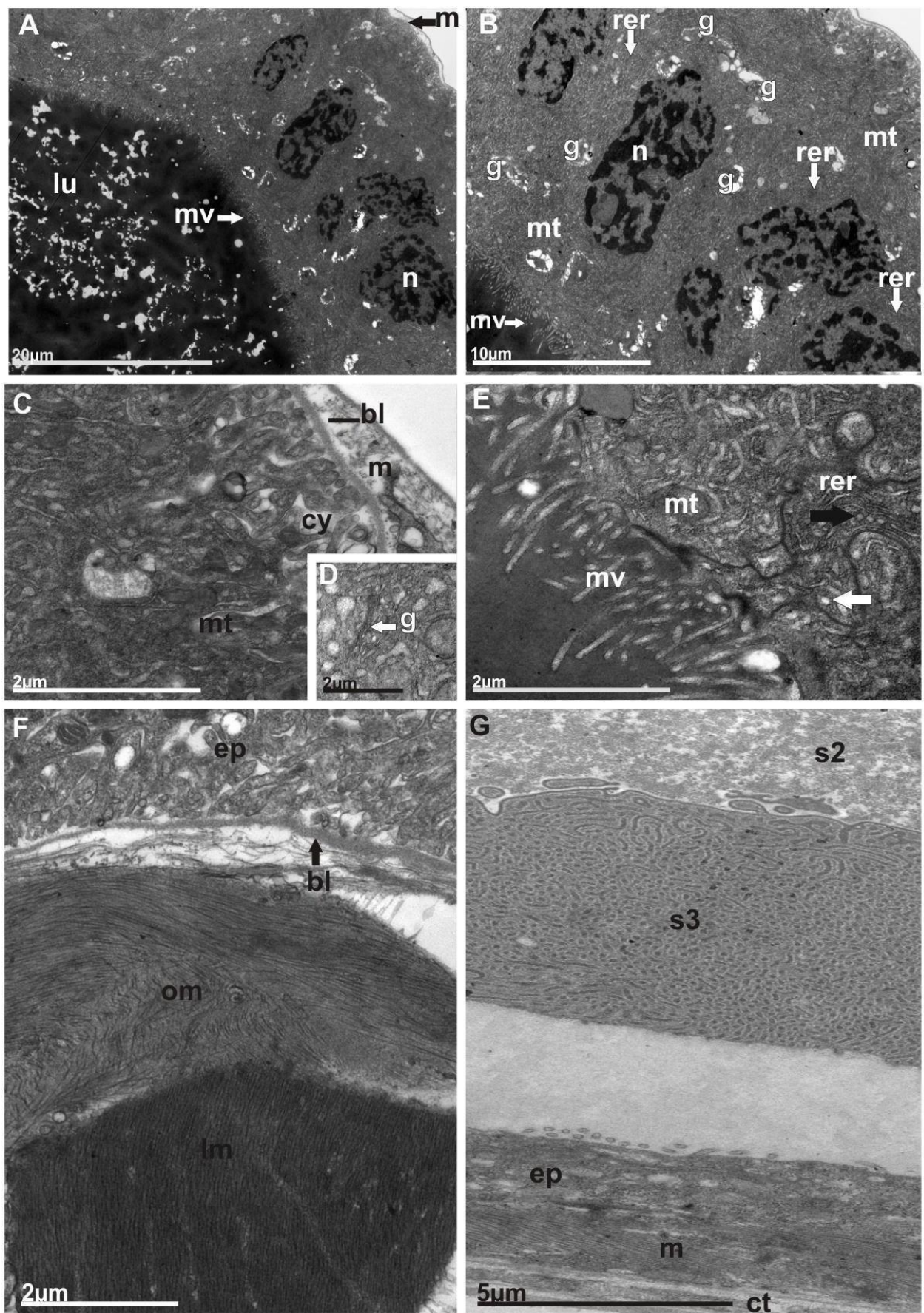


Figura 7. Ultraestrutura dos espermatóforos e secreções em Porcellanidae.

A: vista geral do vaso deferente no qual os espermatóforos estão aderidos ao cordão. **B:** detalhe do espermatóforo no vaso deferente, sob microscopia eletrônica de transmissão nota-se também os três tipos de secreção. **C:** secreção granular heterogênea tipo I, no qual os espermatozoides estão imersos. **D:** detalhe da secreção tipo I mostrando seus componentes menos eletrondenso com grânulos eletrondensos. **E:** corte transversal mostrando secreção granular. **F:** imagem geral mostrando a secreção tipo II no lúmen do vaso. **G:** secreção tipo II composta de elementos de diferentes eletrodensidades, elemento granular menos eletrondenso e granular mais eletrondenso. **H:** detalhe do material granular mais eletrondenso formando a parede da ampola do espermatóforo por aglutinação. **I:** parede da ampola totalmente formada pelo material eletrondenso e material menos eletrondenso da secreção tipo II envolvendo o espermatóforo. **J:** detalhe do pedúnculo formado pelo mesmo material eletrondenso da secreção tipo II que forma a parede da ampola, aderido a secreção tipo III pelo pé. **K:** imagem geral da secreção tipo III que forma o pé e cordão do espermatóforo. **L:** detalhe mostrando o pedúnculo e pé do espermatóforo. **M:** detalhe da secreção tipo III composta por dois elementos diferentes, um elemento superficial (seta branca) mais eletrondenso com grânulos eletronlúcidos e um componente lamelar com material externo mais eletrondenso e material interno menos eletrondenso. **N:** detalhe da secreção tipo III com material mais eletrondenso em vertical. **O:** detalhe da secreção tipo III com material mais eletrondenso na horizontal.

A: ampola; **f:** pé ; **s:** pedúnculo; **n:** núcleo; **sp:** espermatóforo; **sz:** espermatozoide; **s1:** secreção tipo I; **s2:** secreção tipo II; **s3:** secreção tipo III.

Figura A e H: *Pachycheles monilifer*; **Figura B e M:** *Porcellana sayana*; **Figura C e D:** *Petrolisthes galathinus*; **Figura E, I e J:** *Pachycheles laevidactylus*; **Figura F, G, K e L:** *Pisidia brasiliensis*; **Figura N:** *Petrolisthes armatus*; **Figura O:** *Petrolisthes granulosus*

Fig. 7

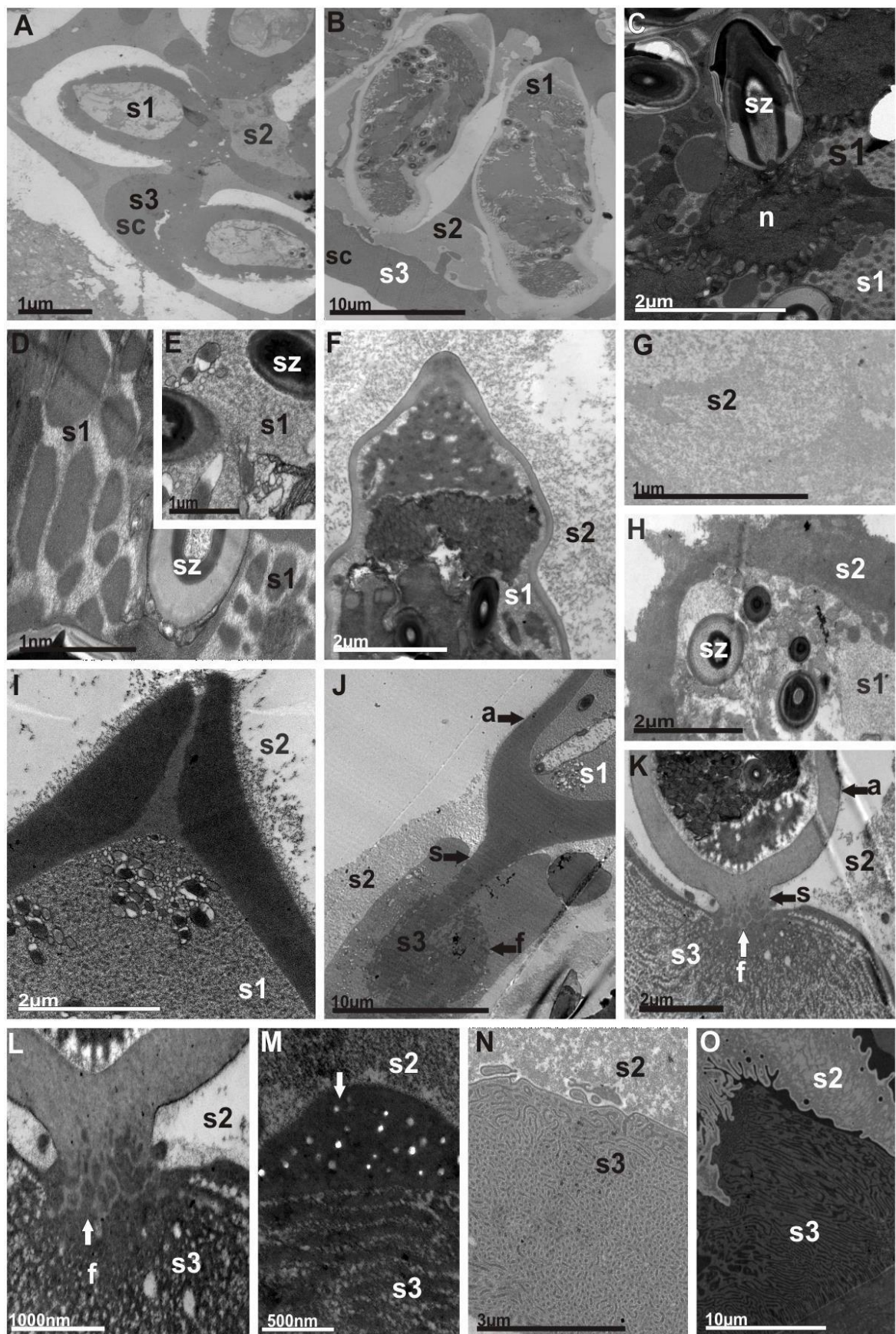


Figura 8. Morfologia dos espermátóforos visto sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) e contraste interdiferencial de fase (DIC).

A: Espermátóforo com ampola ovoide e diminuto pedúnculo (seta preta) aderido ao cordão do espermátóforo (seta branca). **B:** ao DIC, é possível nota-se ampola com parede espessa (seta branca). **C:** detalhe da ampola mostrando suas duas válvulas unidas formando a linha de ruptura (seta branca). **D:** espermátóforo com ampola em formato elipsoide e, pedúnculo diminuto (seta branca). **E:** nota-se ampola alongada com camada espessa (seta branca). **F:** detalhe da linha de ruptura aberta (seta branca) liberando espermatozoides (seta preta). **G:** ampola com detalhe da linha de ruptura fechada (seta branca) e pedúnculo diminuto (seta preta). **H:** em DIC é possível observar a ampola com as margens anterior e posterior pontiagudas. **I:** detalhe do pedúnculo diminuto (seta branca). **J:** detalhe do espermátóforo mostrando sua composição morfológica. **K:** espermátóforo visto sobre DIC. **L:** vista do vaso deferente distal com detalhe para pedúnculo diminuto do espermátóforo (seta branca). **M:** espermátóforos aderidos a secreção tipo III formando o cordão de espermátóforo (seta preta). **N:** detalhe do pedúnculo diminuto (seta branca). **O:** imagem geral do espermátóforo ressaltando pedúnculo diminuto (seta branca). **P:** nota-se cordão do espermátóforo ao DIC. **Q:** vista lateral do espermátóforo destacando pedúnculo diminuto (seta branca) e linha de ruptura (cabeça de seta). **R:** ampola com parede espessa, pedúnculo e pé visto ao DIC. **S:** imagem geral dos espermátóforos destacando a ampola e projeção tubular da ampola. **T:** detalhe da ampola mostrando a presença de linha de ruptura (seta branca). **U:** detalhe da ampola (seta preta), pedúnculo (seta branca) e pé sob DIC. **V:** detalhe mostrando pé, pedúnculo e ampola em microscopia eletrônica de transmissão. **Figura W:** Início da formação da projeção tubular da ampola (seta branca) em *Petrolisthes armatus*. Espermátóforos aderidos ao cordão do espermátóforo (cabeça de seta branca) **X:** espermátóforos mais separados no cordão do espermátóforo (cabeça de seta branca), projeção tubular da ampola mais desenvolvida, porém não totalmente formada (seta branca). **Y:** espermátóforos totalmente formados com projeção tubular da ampola desenvolvida e alongada (seta branca).

A: ampola; **ep:** epitélio; **f:** pé; **ir:** linha de ruptura; **n:** núcleo; **s:** pedúnculo; **sc:** cordão do espermátóforo **sp:** espermátóforo; **sz:** espermatozoide; **tpa:** projeção tubular da ampola. **Figura A, B e C:** *Megalobrachium roseum*; **Figura D, E, F:** *Pachycheles monilifer*; **Figura G, H e I:** *Pachycheles riisei*; **Figura J e K:** *Pisidia brasiliensis*; **Figura L, M e N:** *Porcellana sayana*; **Figura O e P:** *Petrolisthes laevigatus*; **Figura Q e R:** *Petrolisthes granulosus*; **Figura S, T, U, V, W, X e Y:** *Petrolisthes armatus*.

Fig. 8

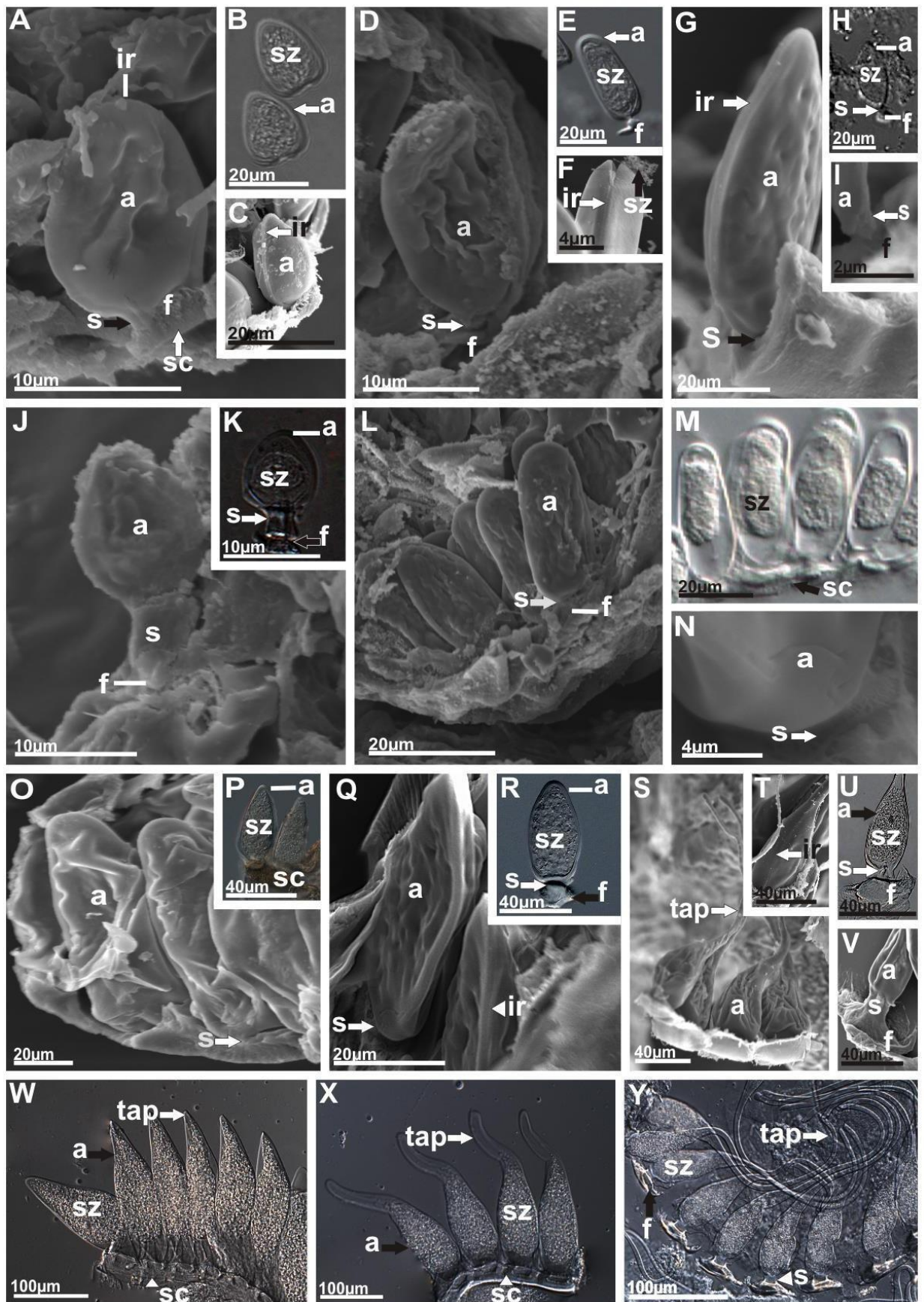


Fig. 9

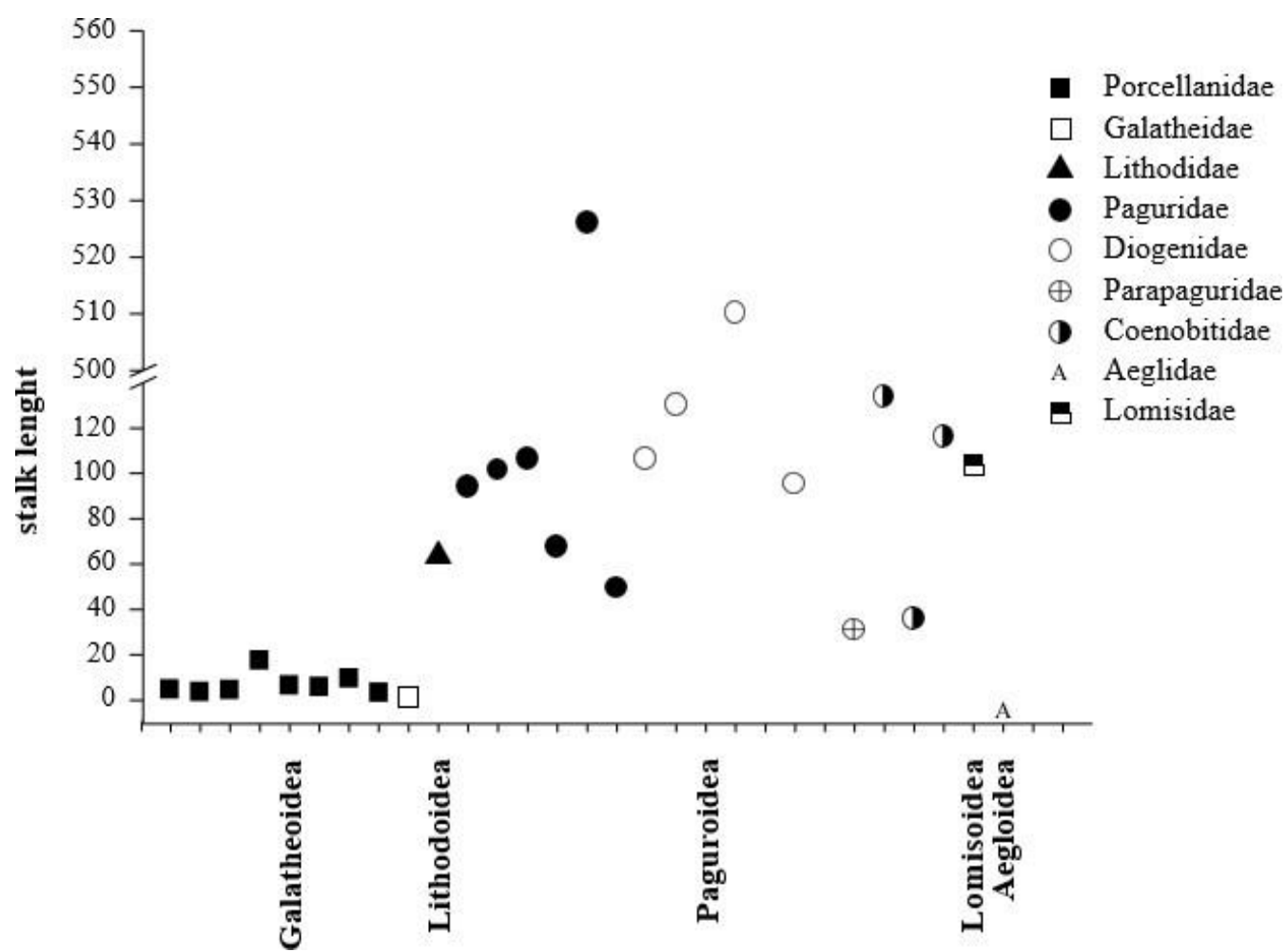


Figura 9. Comprimento do pedúnculo de diferentes superfamílias e famílias de Anomura.

A = ausência de pedúnculo.

Fig. 10

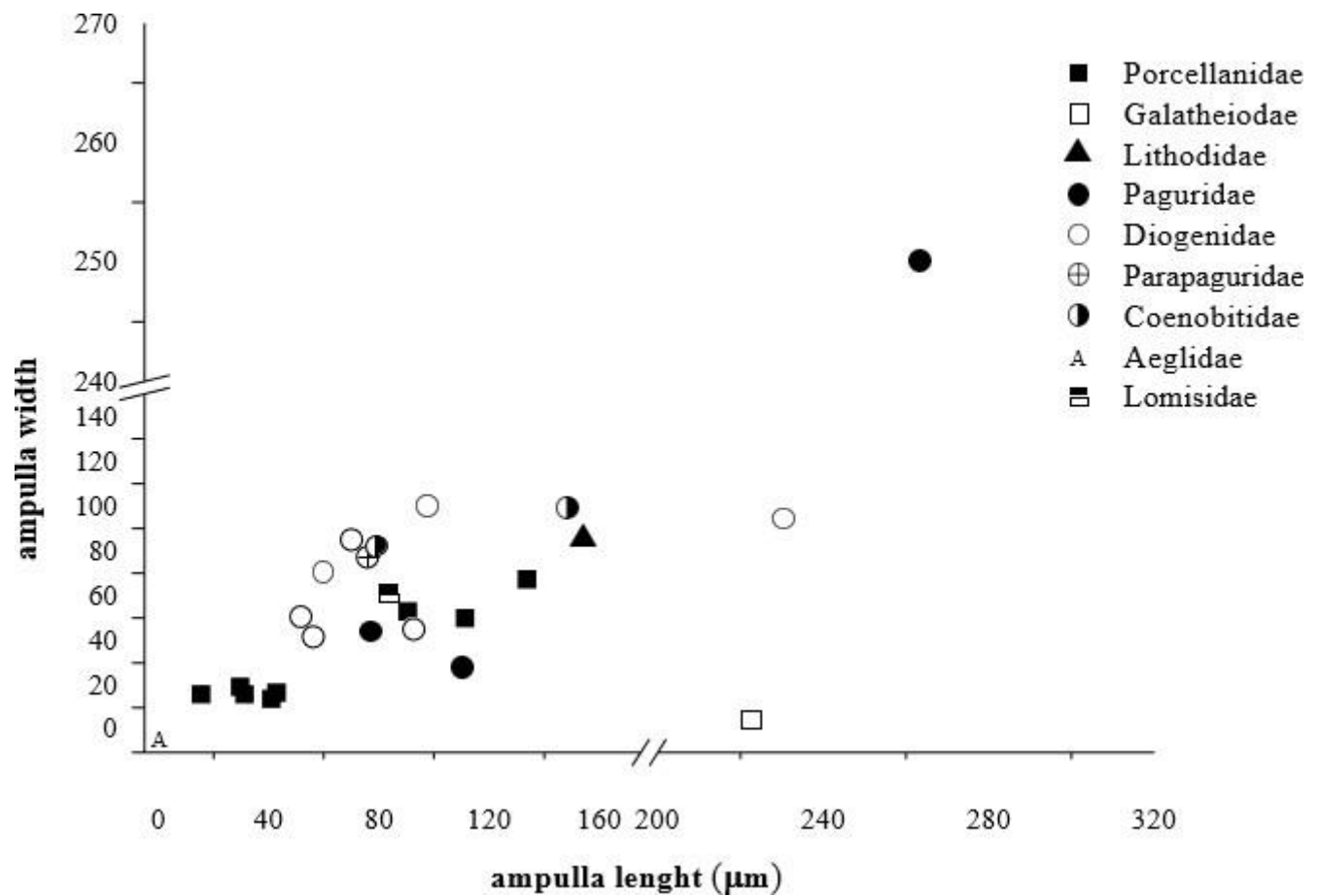


Figura 10. Comprimento plotado contra a largura da ampola nas diferentes famílias de Anomura.

A = ausência de ampola.

Tabela I. Morfologia das ampolas dos espermatóforos segundo a nomenclatura proposta por Clopton (2004).

Espécie	Formato da ampola
<i>Megalobrachium roseum</i>	Ovoide 
<i>Pachycheles monilifer</i> / <i>Porcellana sayana</i>	Elipsóide 
<i>Pachycheles riisei</i>	Fusifforme 
<i>Petrolisthes armatus</i> / <i>Petrolisthes granulosus</i> / <i>Petrolisthes laevigatus</i>	Finamente Deltóide 
<i>Pisidia brasiliensis</i>	Largamente Deltóide 

Tabela II. Média e desvio padrão das características morfológicas medidas para comparação dos espermatóforos de Anomura e classificação do comprimento do pedúnculo em Porcellanidae (n=15) e outras famílias da infraordem Anomura registradas na literatura. **CP:** comprimento do pedúnculo; **LP:** largura do pedúnculo; **CA:** comprimento da ampola; **LA:** largura da ampola; **CT:** comprimento total do espermatóforo; **RAZÃO P:** razão do pedúnculo; **RAZÃO A:** razão da ampola; **RAZÃO P/A:** razão pedúnculo sobre razão da ampola; **A.a:** ampola acessória; **PTA*:** projeção tubular da ampola.

ESPECIE	CP	LP	CA	LA	PTA*	CT	RAZAO P	RAZAO A	RAZAO P/A	A.a	CLASSIFICAÇÃO PED.	REFERENCIA
Porcellanidae												
<i>Megalobrachium roseum</i>	4,2 ± 0,36	5,54 ± 1	29,79 ± 2,36	19,14 ± 3,51	306,05 ± 10,68	33,99 ± 2,26	0,76	1,56	2,05	Ausente	Diminuto	Presente estudo
<i>Pachycheles monilifer</i>	3,01 ± 0,26	5,12 ± 0,76	42,91 ± 2,10	16,44 ± 2,04		45,93 ± 2,11	0,59	2,61	4,42	Ausente	Diminuto	Presente estudo
<i>Pachycheles riisei</i>	4 ± 0,28	3,53 ± 0,69	31,40 ± 0,78	15,69 ± 0,52		54,62 ± 0,75	1,13	2	1,77	Ausente	Diminuto	Presente estudo
<i>Petrolisthes armatus*</i>	16,73 ± 2,03	22,35 ± 2,73	133,80 ± 4,22	67,19 ± 2,64		456,58 ± 9,77	0,75	1,99	2,65	Ausente	Diminuto	Presente estudo
<i>Petrolisthes granulosos</i>	5,98 ± 0,53	9,93 ± 1,23	90,52 ± 3,91	52,84 ± 6,38		96,50 ± 3,92	0,6	1,17	1,95	Ausente	Diminuto	Presente estudo
<i>Petrolisthes laeigatus</i>	5,14 ± 0,49	14,54 ± 2,56	111,31 ± 13,58	49,88 ± 3,11		116,45 ± 13,69	0,35	2,23	6,37	Ausente	Diminuto	Presente estudo
<i>Pisidia brasiliensis</i>	8,93 ± 0,77	5,08 ± 0,57	15,62 ± 2,11	15,7 ± 1,15		24,55 ± 1,45	1,76	0,99	0,56	Ausente	Diminuto	Presente estudo
<i>Porcellana sayana</i>	2,73 ± 0,49	4,36 ± 0,95	41,14 ± 1,38	13,64 ± 1,25		43,87 ± 1,11	0,63	3,02	4,79	Ausente	Diminuto	Presente estudo
Galatheidae												
<i>Galathea intermedia</i>	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	222,5 ± 7,5	4,59 ± 0,79		223,7 ± 7,6	1,33	48,47	36,44	Ausente	Diminuto	Kronemberger <i>et al.</i> , (2004)
Lomisidea												
<i>Lomis hirta</i>	103,26	16,3	83,69	60,86		189,95	7,99	1,38	5,78	Ausente	Longo	Tudge (1997c) n=1
Lithodidae												
<i>Lithodes maja</i>	63 ± 15	47,5 ± 2,5	154,5 ± 57,5	85 ± 12		217,5 ± 72,5	1,33	1,82	1,37	Presente	Curto	Tudge (1998)
Paguridae												
<i>Pagurus brevidactylus</i>	93,57 ± 17,33	5,59 ± 1,41	110,89 ± 18,86	27,92 ± 5,86		179,62 ± 28,02	16,74	3,97	0,24	Presente	Curto	Fantucci & Mantelatto (2011)
<i>Pagurus criniticornis</i>	101,05 ± 1,97	5,96 ± 1,57	110,7 ± 31,17	28,09 ± 7,46		189,5 ± 36,62	16,95	3,94	0,23	Presente	Longo	Fantucci & Mantelatto (2011)
<i>Pagurus hirtimanus</i>	106 ± 6	53 ± 3	284 ± 4	152,14 ± 2,14		390 ± 10	2	1,87	0,94	Presente	Longo	Tudge (1996)
<i>Pagurus pollicaris</i>	67,31 ± 9,6	33,75 ± 3,75	77,5 ± 2,5	43,75 ± 3,75		144, 81 ± 12,12	1,99	1,77	0,89	Presente	Curto	Tudge (1996)
<i>Pagurus emerita</i>	49,2 ± 6,5	6,5 ± 1,4	92,6 ± 7,2	45,2 ± 7,3		133,47 ± 8,88	7,57	2,05	0,27	Ausente	Curto	Tirelli <i>et al.</i> , (2010)
<i>Petrochirus diogenes</i>	524,9 ± 154,9	48,5 ± 16,07	263,53 ± 65,75	250 ± 65,4		728,3 ± 201,3	6,56	1,05	0,16	Ausente	Longo	Buranelli & Mantelatto (2012)
Diogenidae												
<i>Calcinus minutus</i>	106,25 ± 10,1	16,8 ± 5,27	51,5 ± 1,5	50,5 ± 0,5		157,75 ± 11,6	6,32	1,02	0,16	Ausente	Longo	Tudge, (1991)
<i>Calcinus latens</i>	130 ± 45	25 ± 11	89,80 ± 17,8	84,30 ± 18,6		201 ± 58	11	0,86	0,08	Ausente	Longo	Tudge, (1991)
<i>Calcinus tibicen</i>	218,5 ± 10,5	25 ± 4,17	97,92 ± 14,59	99,99 ± 4,17		316,41 ± 4,09	8,74	0,98	0,11	Ausente	Longo	Amadio e Mantelatto (2009)
<i>Dardanus lagopodes</i>	570 ± 29,44	25,96 ± 5,44	70 ± 4,90	79,67 ± 2,87		640 ± 26,28	5,42	1,71	0,32	Ausente	Longo	Tudge (1991)
<i>Dardanus insignis</i>	489,9 ± 193,42	26,63 ± 10,9	230,43 ± 93,77	94,24 ± 37,72		720,53 ± 286,05	18,4	2,45	0,13	Ausente	Longo	Tudge (1991)
Parapaguridae												
<i>Sympagurus sp.</i>	30,5 ± 1,5	53 ± 3	76 ± 15	77,5 ± 19,5		106,5 ± 16,5	0,58	0,98	1,69	Presente	Curto	Tudge (1996)
Coenobitidae												
<i>Coenobita perlatus</i>	133,23 ± 43,23	44,075 ± 11,48	79 ± 18	78 ± 20,1		209,23 ± 28,23	3,02	0,98	0,32	Ausente	Longo	Tudge (1991)
<i>Coenobita rugosus</i>	35,28 ± 3,28	15,45 ± 1,15	148,5 ± 1,5	99 ± 1		183,78 ± 178	2,28	1,5	0,66	Ausente	Curto	Tudge (1991)
<i>Coenobita brevimanus</i>	115,5 ± 3,35	33,25 ± 5,55	176 ± 4	106,5 ± 3,5		294,5 ± 7	3,35	1,72	0,51	Ausente	Longo	Tudge (1991)

Discussão

O sistema reprodutor masculino de Porcellanidae localizado no cefalotórax é composto por um par de testículos conectados a um par de vasa deferentia como já observado para outros Decapoda (Matthews, 1953; McLaughlin, 1983; Krol et al., 1992; Amadio e Mantelatto, 2009; Zara et al., 2012). Por sua vez, o sistema reprodutor masculino não mostra diferenças anatômicas macroscópicas, semelhantes ao sistema reprodutor descrito para algumas espécies de ermitões (Mouchet, 1931; Matthews, 1953, 1956; Manjón-Cabeza e Garcia Raso, 2000; Scelzo et al., 2004; Tirelli et al., 2006b, 2007, 2008; Amadio e Mantelatto, 2009; Mantelatto et al., 2009).

Em Porcellanidae o testículo foi classificado histologicamente como do tipo lobular. As células germinativas no interior dos ácinos estão do mesmo estágio de desenvolvimento (Nagao e Munehara (2003). A espermatogênese das espécies aqui analisadas apresenta as mesmas características histológicas encontradas em outros Decapoda descritos na literatura (Garcia e Silva, 2006; Castilho et al., 2008; Santos et al., 2009; Zara et al., 2012; Tiseo et al., 2014). A categorização das espermátides em estágios (inicial, médio e tardio) pelo aumento da vesícula acrossomal, bem como o formato do núcleo, seguiu o modelo proposto para caranguejos, tendo em vista a similaridade histológica do espermatozoide (Zara et al., 2012; Nascimento e Zara, 2013; Tiseo et al., 2014). Nas diferentes fases das espermátides, modificações semelhantes principalmente em relação a polarização do núcleo, ocorrem nos Anomura *Diogenes pugilator* (Roux, 1829) e *Aegla platensis* Schmitt, 1942, em Astacidea *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758) e Axiidea *Callichirus major* (Say, 1818) descritas na literatura (Manjon-Cabeza e Raso, 2000; Sokolowicz et al., 2007, Rottlant et al., 2012 e Souza et al., 2018). O vaso deferente de Porcellanidae, macroscopicamente apresenta-se como um túbulo simples, dnovelado e sem diferença morfológica significativa, o que parece ser o padrão encontrado para Anomura de acordo com o que foi observado em literatura (Buranelli et al., 2014).

Nas espécies aqui estudadas o vaso deferente é constituído por três camadas: uma camada externa conjuntiva, uma camada muscular intermediária e o epitélio interno, seguindo o padrão de Decapoda (Hinsch e Walker, 1974; Kooda-Cisco e Talbot, 1986; Ro et al., 1990; Benhalima e Moriyasu, 2000; Simeó et al., 2009). A musculatura observada nas espécies de Porcellanidae, com a distribuição das

fibras longitudinais, helicoidais e outras fibras, mais externas, circular, auxiliam significativamente na formação dos espermatóforos e na transferência do fluido seminal, por meio das contrações seguindo o padrão proposto para *Anomura* (Mouchet, 1931; Tudge, 1991). Em *Porcellanidae*, as células da camada epitelial ao longo do vaso deferente apresentaram o mesmo padrão, tipicamente secretor de glicoproteínas. A lâmina basal possui inúmeras invaginações com muitas mitocôndrias, indicativo de absorção de compostos da hemolinfa, os quais serão essenciais para a formação do fluido seminal, assim como observado em glândulas produtoras de seda, para a produção das proteínas fibroína e sericina (Zara e Caetano, 2002). Além disso, o citoplasma é preenchido com uma grande quantidade de RER e complexo de Golgi, produzindo pequenas vesículas secretoras, e fluido seminal, com a mesma característica em todas as regiões, o que também foi observado para caranguejos *Podotremata* (Garcia-Bento et al., 2018). Este tipo de característica ultraestrutural das células do vaso deferente segue o padrão geral de *Decapoda* (Hinsch, 1974; Kooda-Cisco e Talbot, 1986; Ro et al., 1990; Garcia-Bento et al., 2018).

Em relação a histoquímica e histologia do vaso deferente bem como a formação dos espermatóforos tripartidos, não foram observadas diferenças nas regiões em *Porcellanidae*. Nas espécies aqui estudadas, a formação do espermatóforo mostra o mesmo padrão: Na PVD os espermatozoides estão embebidos em uma secreção basófila tipo I glicoproteica positiva para polissacarídeos neutros e ácidos, que compacta os espermatozoides formando uma longa massa espermática. Ultraestruturalmente esta secreção é composta por dois elementos granulares com diferentes eletrondensidades. Ainda na PVD, a massa espermática é envolvida por uma outra secreção tipo II fortemente positiva para proteínas, positiva para polissacarídeos neutros e ácidos. Vista sob TEM, esta secreção é composta por uma substância granular fortemente eletrondensa e outra menos eletrondensa. Este mesmo padrão foi descrito para o *Anomura Pleuroncodes planipes* Stimpson, 1860 (Hinsch, 1991).

Na MVD e DVD não foram observadas diferenças significativas. Em *Porcellanidae* na MVD, a parede do espermatóforo começa a ser formada por aglutinação do material mais eletrondenso da secreção tipo II, e o componente menos eletrondenso desta mesma secreção com o auxílio de contrações musculares, começa a separar e moldar os espermatóforos. Ainda nesta região,

ocorre a secreção acidófila nomeada neste estudo de tipo III formando o cordão que adere os espermatóforos através do pé. Os espermatóforos por sua vez têm sua formação concluída na DVD, no qual encontram-se totalmente separados com ampola, pedúnculo e pé bem definidos. Dentro de Anomura, espécies descritas na literatura, bem como *Pleuroncodes planipes*, *Pagurus excavatus* (Herbst, 1791), *Pagurus prideaux* *Paguristes eremita*, (Linnaeus, 1767), *Dardanus insignis* (de Saussure, 1857); *Calcinus tubularis* (Linnaeus, 1767) e *Galathea intermedia* apresentaram o mesmo padrão de formação dos espermatóforos observado nos Porcellanidae (Mouchet, 1931; Hinsch, 1991; Kronenberger et al., 2004; Tirelli et al., 2006, 2010; Buranelli et al., 2014).

Em Anomura, os espermatóforos geralmente são pedunculados (Subramoniam, 1993; Tudge, 1999b) e podem ser divididos em três grandes regiões: ampola, pedúnculo de comprimento variável, e um pé (Tudge, 1991, 1999a; Subramoniam, 1993). Entretanto, em algumas espécies, além da ampola principal, nota-se o surgimento de uma ampola acessória, que muitas vezes é encontrada próximo ou ao lado do pedúnculo. Esta ampola acessória, é formada pela mesma parede da ampola principal, podendo ou não conter espermatozoides, porém sua função ainda não é totalmente conhecida (Tudge, 1999).

Tudge, (1991, 1997c) propõem a utilização dos espermatóforos como caráter para separar famílias de ermitões. Seguindo a filogenia a partir de inferência bayesiana proposta Bracken-Grissom et al., (2013), a infraordem Anomura está dividida em dois clados, sendo um formado pela superfamília Hippoidea Latreille, 1825 e o outro pelas superfamílias Aegloidea Dana, 1852, Lomisoidea Bouvier, 1895, Chirostyloidea Ortmann, 1892, Galatheaidea Samouelle, 1819, Paguroidea Latreille, 1802 e Lithodoidea Samouelle, 1819 (Bracken- Grissom et al., 2013).

Dentro do clado composto pelas superfamílias Aegloidea, Lomisoidea, Chirostyloidea, Galatheaidea, Paguroidea e Lithodoidea os espermatóforos seguem o padrão típico, pedunculado, tripartido e separados uns dos outros (Mouchet, 1931; Tudge 1995a,b, 1997, 1999b; Kronenberger et al., 2004). Ainda dentro deste grupo, notam-se dois clados. O primeiro clado é formado pelas superfamílias Galatheaidea, Chirostyloidea, Lomisoidea e Aegloidea sendo grupo irmão do segundo clado formado por Lithodoidea e Paguroidea. (Bracken-Grissom, et al., 2013). No primeiro clado, apenas os espermatóforos de Limosoidea e Galatheaidea são conhecidos. A superfamília Galatheaidea é um grupo

monofilético, formada por Munidopsidae que tem seu espermatóforo desconhecido, Munididae, Galatheididae e Porcellanidae.

Os espermatóforos dos porcelanideos aqui estudados, seguem o padrão clássico pedunculado tripartido, com ausência de ampola acessória, como descrito para a maioria dos Anomura (Mouchet, 1931; Tudge 1995a, b, 1999b, 1997). Porém diferente do que foi visto em outras superfamílias, o espermatóforo de Porcellanidae é formado por um pedúnculo diminuto, sendo esta a mesma morfologia descrita para o Galatheididae *Galathea intermedia* e para o Munididae *Pleuroncodes planipes* (Hinsch, 1991; Kronenberger et al., 2004). *Pleuroncodes planipes* teve seu espermatóforo descrito como massas espermáticas individuais em ultraestrutura (Hinsch, 1991). Além disso, por meio da análise das imagens nota-se que as massas espermáticas têm uma cápsula, caracterizando a ampola. Adicionalmente, e apesar de não ter sido possível realizar a mensuração do pedúnculo, devido à ausência da barra de escala, em uma das fotos com um aumento de 7.000 vezes, foi possível observar o pedúnculo completo, além da base da ampola, na mesma imagem, permitindo classificar o pedúnculo como diminuto, assim como em Porcellanidae. (Hinsch, 1991). Portanto, o pedúnculo diminuto é um carácter compartilhado dentro de Galatheoidea.

Em Lomisidae, na espécie *Lomis hirta* (Lamarck, 1818), pesar da imensa semelhança morfológica com os caranguejos porcelana, seu espermatóforo é bastante diferente de Porcellanidae, sendo constituído por um longo pedúnculo, ampola simples, e ausência de ampola acessória.

No outro clado, dentro da superfamília Lithodoidea, a espécie *Lithodes maja* (Linnaeus, 1758) possui o espermatóforo tripartido com pedúnculo classificado como curto neste presente estudo, e presença de ampola acessória (Tudge et al., 1998). Paguroidea é composta pelas famílias Parapaguridae, Paguridae, Coenobitidae e Diogenidae (Bracken-Grissom, et al., 2013). Em Parapaguridae, o que se sabe da morfologia dos espermatóforos resume-se na espécie *Sympagurus* sp. Smith, 1883, no qual os espermatóforos também apresentam pedúnculo curto e presença de ampola acessória (Tudge, 1991).

Nas famílias Paguridae e Coenobitidae, as espécies descritas em literatura não mostram padrão ou características na morfologia dos espermatóforos que permitam separar as famílias e gêneros. Em Paguroidea, as espécies *Pagurus pollicaris* Say, 1817, e *Pagurus brevidactylus* (Stimpson, 1859) possuem

espermatozóides com curto pedúnculo e apresentam ampola acessória, característica compartilhada com as famílias Lithodidae e Parapaguridae (Tudge, 1991; Tudge et al., 1998; Fantucci e Mantelatto, 2011). A espécie *Pagurus emerita* apresenta também espermatozóide com pedúnculo curto, porém com ausência de ampola acessória (Tirelli, et al., 2010). Em contrapartida, nas espécies *Pagurus criniticornis* (Dana, 1852) e *Pagurus hirtimanus* White, 1847 o espermatozóide possui um longo pedúnculo e ambas possuem ampola acessória (Tudge, 1996; Fantucci e Mantelatto, 2011). Para *Petrochirus diogenes* (Linnaeus, 1758), o espermatozóide foi classificado com pedúnculo longo, porém com ausência de ampola acessória (Buranelli e Mantelatto, 2012). Na família Coenobitidae, de maneira geral, as espécies apresentam espermatozóides com ausência de ampola acessória, porém o tamanho do pedúnculo é variável. Em *Coenobita perlatus* H. Milne Edwards, 1837 e *Coenobita breviamnus* Dana, 1852, os espermatozóides possuem pedúnculo longo, enquanto na espécie *Coenobita rugosus* H. Milne Edwards, 1837, o espermatozóide é composto por um pedúnculo classificado como curto (Tudge, 1991).

Em geral, os Diogenidae possuem espermatozóides com pedúnculo alongado e se destacam por possuírem grande variedade de formas e tamanho da ampola, porém com ausência total de ampola acessória (Tudge, 1991). Em *Dardanus insignis* (de Saussure, 1857) *Calcinus latens* (Randall, 1840), *Calcinus minutus* Buitendijk, 1937, *Calcinus tibicen* Herbst, 1791, os espermatozóides seguem o padrão visto para outros Anomura, contendo uma ampola simples, presa a um longo e estreito pedúnculo fixado a um pedestal (Tudge, 1991; Amadio e Mantelatto, 2009). Em contrapartida, *Loxopagurus loxochelis* (Moreira, 1901) e *Clibanarius corallinus* (H. Milne Edwards, 1848) possuem espermatozóides onde o pedúnculo não é penetrado totalmente na ampola, estes são anexados apenas na base da ampola (Tudge, 1991; Scelzo et al., 2004). Outra variação em relação a ampola dentro desta família ocorre na espécie *Dardanus lagopodes* (Forskål, 1775), onde seu espermatozóide é composto por duas ampolas separadas, ambas com paredes distintas que compartilham um mesmo pedúnculo, por isso não são consideradas ampolas acessórias (Tudge, 1991). Uma exceção dentro de Diogenidae ocorre para a espécie *Clibanarius vittatus* (Bosc, 1802) que foi considerado não pedunculado por Hess e Bauer (2002), porém através das imagens de histologia e microscopia eletrônica de varredura do trabalho de

Sant'anna et al., (2012), claramente pode-se observar a continuidade da ampola formando uma estrutura que contém as mesmas características do pedúnculo.

Por fim, uma característica única ocorre em Aegloidea, que é o único grupo que possui grandes diferenças no empacotamento espermático. Espécies pertencentes a esta superfamília possuem o vaso deferente com epitélio delgado e espermatozoides livres no fluido seminal, em todas as regiões, portanto o espermatóforo está ausente (Sokolowicz et al., 2007; Subramoniam, 2017). Esta característica pode estar relacionada com a transferência espermática, neste grupo único, que conquistou água doce e é exclusivo da América do Sul. Assim, devido aos seus ovócitos são grandes e ricos em vitelo (Sokolowicz et al., 2007; Subramoniam, 2017) a ausência de espermatóforo pode ser uma adaptação para prevenir a poliespermia e a perda de espermatozoides. Esta mesma proposta é levantada para os caranguejos de água doce, os quais compartilham ausência de espermatóforos, ovócitos grandes e desenvolvimento direto (Guinot, et al., 1977; Klaus et al., 2009) sendo, portanto, características que ocorreram independentemente em animais que conquistaram água doce.

Em conclusão, quando comparamos a morfologia do espermatóforo de Porcellanidae do presente estudo, com os espermatóforos das demais famílias de Anomura, seguindo a filogenia proposta Bracken-Grissom et al. (2013), percebemos que o espermatóforo tripartido é uma plesiomorfia em Anomura, (Tudge, 1997c) sendo o pedúnculo diminuto é uma sinapomorfia de Galatheaidea. O pedúnculo longo, por sua vez, é uma homoplasia, ocorrendo em Lithodidae, Paguridae, Diogenidae, Coenobitidae e Lomisidae. A ampola simples é uma homoplasia, uma vez que, é observada em Galatheaidea, Lomisoidea e Diogenidae. Em Aegloidea observa-se uma autopomorfia, sendo que nesta família não ocorre formação de espermatóforo. Desta maneira, os espermatóforos não podem ser considerados como caráter seguro para separação de família, gênero e espécies em Anomura. Assim, o sistema reprodutor masculino da família Porcellanidae, aqui pela primeira vez descrito, tem como padrão ser: 1) simplificado, 2) sem regiões anatômicas distintas, 3) com fluido seminal complexo, 4) espermatóforos moldados por contrações musculares, 5) aderidos a um cordão gelatinoso protéico e 6) separados, uns dos outros devido a ação da secreção tipo II (proteica e com polissacarídeos neutros e ácidos), sendo estas as características previsíveis a serem encontradas em futuros estudos para esta família e,

provavelmente, para a maioria dos Anomura.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela bolsa de mestrado pelo programa de Pós-graduação em Aquicultura concedido a BPC. Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) Ciências do Mar CIMAR II # 1989/2014 e a Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP JP#2005/04707-5 e Biota Intercrusta #2018/13685-5) pelo auxílio financeiro para as coletas. Ao Laboratório IML pelo suporte físico e material. Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP - Campus Jaboticabal. Agradecimentos adicionais a Márcia F. Mataqueiro e a Dra. Cláudia Fiorillo pelo suporte técnico, a Camila Assugeni leitura e sugestões neste trabalho; a Isabela Ribeiro Rocha de Moraes e Douglas Alves por terem coletado e doado *Pa. riisei* para este trabalho. Este estudo foi conduzido de acordo com as leis brasileiras (Licença Permanente FJZ - MMA SisBio # 34587-1).

Referências:

- Amadio, L. M., Mantelatto, F. L. (2009). Description of the Male Reproductive System of the Hermit Crab *Calcinus Tibicen* (Decapoda: Anomura). *Journal of Crustacean Biology*, 29, 466-475.
- Assugeni, C. D. O., Magalhães, T., Bolaños, J. A., Tudge, C. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. (2017). Ultrastructure of spermatozoa of spider crabs, family Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura): Integrative analyses based on morphological and molecular data. *Journal of morphology*, 278, 1628-1646.
- Benhalima, K., Moriyasu, M. (2000). Structure and function of the posterior vas deferens of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Invertebrate Reproduction and Development*, 37, 11-23.
- Berry, P. F., Heydorn, A. E. F. (1970). A comparison of the spermatophoric masses and mechanisms of fertilization in Southern African spiny lobsters (Palinuridae). *Oceanographic Research Institute*, 25, 1-18.
- Bracken-Grissom, H. D., Cannon, M. E., Cabezas, P., Feldmann, R. M., Schweitzer, C. E., Ahyong, S. T., Felder, D. L., Lemaitre, R., Crandall, K. A. (2013). A comprehensive and integrative reconstruction of evolutionary history for Anomura (Crustacea: Decapoda). *BMC Evolutionary Biology*, 13, 128.
- Buranelli, R. C., Mantelatto, F. L. (2012). Reproductive apparatus of the male giant hermit crab *Petrochirus diogenes* (Anomura, Diogenidae): morphology and phylogenetic implications. *Aquatic Biology*, 16, 241-251.
- Buranelli, R.C., Zara, F.J., Mantelatto F.L. (2014). Male reproductive system of the red brocade hermit crab *Dardanus insignis* (Diogenidae) and its relationship to other family members. *Zoomorphology*, 133, 127-137.
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. (2016). Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology*, 135, 67-81.
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J., (2017). Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod Structure & Development*, 46, 588-600.
- 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 (Stockholm)*, 89, 157-161.
- Clopton, R. E. (2004). Standard nomenclature and metrics of plane shapes for use in Gregarine taxonomy. *Comparative Parasitology*, 71, 130-140.
- Diez, Y. L., Lira, C. (2017). Systematics and biogeography of Cuban porcelain crabs (Decapoda: Anomura). *Zootaxa*, 4216, 441-456.
- Erkan, M., Tunali, Y., Sancar-Bas, S. (2009). Male reproductive system morphology and spermatophore formation in *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (Decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 29, 42-50.
- Fantucci, M. Z, Mantelatto, F. L., (2011). Male reproductive apparatus and spermatophore morphology of the hermit crabs *Pagurus brevidactylus* and *P. criniticornis* (Anomura, Paguridae). *Journal of Morphology*, 272, 1271-1280.
- Felgenhauer, B. E. (1992). Internal anatomy of the Decapoda: an overview. *Microscopic anatomy of invertebrates*, 10, 45-75.
- Felgenhauer, B. E., Abele, L. G. (1991). Morphological diversity of decapod spermatozoa. *Crustacean sexual biology*, 322-341.
- Ferreira, L. A. A., Tavares, M. (2017). A new species of *Pachycheles* (Crustacea: Anomura). *Zootaxa*, 4299, 546-560.
- Garcia Bento, M. A., Greco, L. S. L., Zara, F. J. (2019). Seminal fluid production and sperm packaging in dromiid crabs (Brachyura, Podotremata). *Zoology*, 132, 17-30.
- Garcia, T. M., Silva, J. R. F. (2006). Testis and vas deferens morphology *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *Journal of Crustacean Biology*, 9, 266-277.
- González Gordillo, J. I., Vela, M. J. (2016). Larval descriptions of the family Porcellanidae: A worldwide annotated compilation of the literature (Crustacea, Decapoda). *Zookeys*, 564, 47-70.
- González Pisani, X., Rubilar, T., Dupré, E. (2009). Embryonic development of *Pachycheles chubutensis* (Decapoda: Anomura). *Journal of The Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89, 1-8.
- Guinot, D., Jamieson, B. G. M., Tudge, C. C. (1997). Ultrastructure and relationships of spermatozoa of the freshwater crabs *Potamon fluviatile* and *Potamon ibericum* (Crustacea, Brachyura, Potamidae). *Journal of Zoology*, 241, 229-244.

- Hamon M. (1939). La constitution chimique des spermatophores de Crustacés supérieurs du groupe des pagurides. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 130, 1312-1315.
- Hamon, M. (1937). Les mécanismes produisant la déhiscence des spermatophores d'*Eupagurus prideauxi* Leach. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 204, 1504-1506.
- Hess, G. S., Bauer, R. T. (2002). Spermatophore transfer in the hermit crab *Clibanarius vittatus* (Crustacea, Anomura, Diogenidae). *Journal of Morphology*, 253, 166-175.
- Hiller, A., Kraus, H., Marc, A., Werding, B. (2006) The *Petrolisthes galathinus* complex: species boundaries based on color pattern, morphology and molecules, and evolutionary interrelationships between this complex and other Porcellanidae (Crustacea: Decapoda: Anomura). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40, 547-569.
- 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. (1991). Ultrastructure of the sperm and spermatophores of the anomuran crab *Pleuroncodes planipes*. *Journal of Crustacean biology*, 11, 17-22.
- Hinsch, G. W., Walker, M. H. (1974). The vas deferens of the spider crab, *Libinia emarginata*. *Journal of Morphology*, 143, 1-19.
- Hobbs Jr, H. H., Harvey, M. C., Hobbs III, H. H. (2007). A comparative study of functional morphology of the male reproductive systems in the Astacidea with emphasis on the freshwater crayfishes (Crustacea: Decapoda). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 624, 1-69.
- Jamieson, B. G. M. (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, B. G. M. (1999). Spermatozoal phylogeny of the Vertebrata. *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*, 303-331.
- Jamieson, B. G. M., e Tudge, C. C. (1990). Dorippids are Heterotremata: evidence from ultrastructure of the spermatozoa of *Neodorippe astuta* (Dorippidae) and

- Portunus pelagicus* (Portunidae) Brachyura: Decapoda. *Marine Biology*, 106, 347-354.
- Jamieson, B. G., Guinot, D., Richer de Forges, B. (1995). Phylogeny of the Brachyura (Crustacea, Decapoda): evidence from spermatozoal ultrastructure. *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*, 166, 265-283.
- Johnson, D. S. (1970). The Galatheidea (Crustacea: Decapoda) of Singapore and adjacent waters. *Bulletin of the National Museum (Singapore)*, 35, 1-44.
- Junqueira, L. C. U., Junqueira, L. M. M. S. (1983). Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. 1.ed. Instituto de Ciências Biomédicas e Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. *Editora Santos*, 2, 123.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative on high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 27, 137-138.
- 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.
- Kooda-Cisco, M., Talbot, P. (1986). Ultrastructure and role of the lobster vas deferens in spermatophore formation: the proximal segment. *Journal of Morphology*. 188, 91- 103.
- Krol, R. M., Hawkins, W. E., Overstreet, R. M. (1992). nReproductive components Microscopic anatomy of invertebrates, *Wiley-Liss*, 10, 295-344.
- Kronenberger, K., Brandis, D., Türkay, M., Storch, V. (2004). Functional morphology of the reproductive system of *Galathea intermedia* (Decapoda: Anomura). *Journal of Morphology*, 262, 500-516.
- Leone, I. C., Mantelatto, F. L. (2015). Maternal investment in egg production: Substrate- and population- specific effects on offspring performance of the symbiotic crab *Pachycheles monilifer* (Anomura). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 464, 18-25.
- Litulo C., Abreu D., Tudge C. C. (2006). Reproductive biology of *Calcinus laevimanus* (Randall,1840) (Anomura: Diogenidae) from Inhaca Island, southern Mozambique. *Crustacean Research*, 6, 57-66.
- López Greco, L. S. L., Rodríguez, E. M., Hernández, G., Bolaños, J. (2002). Effects of copper on hatching of larvae and prezoa survival of *Petrolisthes galathinus* (Porcellanidae): Assays with ovigerous females and isolated eggs.

Environmental Research, 90, 40-46.

- López Greco, L. S., Lopez, G. C., Rodriguez, E. M. (1999). Morphology of spermatheca in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Graspidae, Sesarminae). *Journal of Zoology*, 249, 490-493.
- Lopez Greco, L. S., Vazquez, F., Rodriguez, E. M. (2007). Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater 'red claw'crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). *Acta Zoologica*, 88, 223-229.
- López Greco, L. (2013). Functional anatomy of the reproductive system. In: Functional Morphology and Diversity. Edited by Les Watling and Martin Thiel. *Oxford University Press*, 413-450.
- Manjón-Cabeza, M. E., Raso, J. E. G. (2000). Morphological reproductive aspects of males of *Diogenes pugilator* (Roux, 1829) (Crustacea, Decapoda, Anomura) from southern Spain. *Sarsia*, 85, 195-202.
- Mantelatto F.L., Scelzo M.A., Tudge C. C. (2009). Morphological and morphometric appraisal of the spermatophore of the southern hermit crab *Isocheles sawayai* Forest and Saint Laurent, 1968 (Anomura: Diogenidae), with comments on gonopores in both sexes. *Zoologischer Anzeiger*, 248, 1-8.
- Mantelatto, F. L., Miranda, I. (2016). Avaliação do caranguejo porcelanídeo *Minyocerus angustus* (Dana, 1852) (Decapoda: Porcellanidae). *Livro vermelho dos crustáceos do Brasil: avaliação 2010-2014*.
- Mantelatto, F. L., Robles, R., Felder, D. L. (2007). Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus *Portunus* (Crustacea, Brachyura, Portunidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 150, 211-220.
- 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 *Decapod Crustacean Phylogenetics*, 17, 554-562.
- Matthews, D. C. (1953). The development of the pedunculate spermatophores of a hermit crab, *Dardanus asper* (De Haan). *Pacific Science* 7, 255-267.
- Matthews, D. C. (1954). The Origin and Developmerit of the Spermatophoric Mass of a Nephropsid Lobster, *Enoplometopus occidentalis* (Randall).
- Matthews, D. C. (1956). The origin of the spermatophoric mass of the sand crab,

- Hippa pacifica*. *Journal of Cell Science*, 38, 257-268.
- Matthews, D. C. (1956). The probable method of fertilization in the terrestrial hermit crabs based on a comparative study of spermatophores. *Pacific Science*, 10, 303- 309.
- Matthews, D. C. (1957). Further evidences of anomuran nonpedunculate spermatophores. *Pacific Science*, 11, 380-385.
- Minagawa, M., Chiu, J.-R., Kudo, M., Takashima, F., (1994). Male reproductive biology of the red frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands. *Marine Biology*, 118, 393-401.
- Mouchet S. (1931). Spermatophores des Crustacés Décapodes Anomures et Brachyours et castration parasitaire chez quelques *Pagures*. *Annales de la Station Océanographique de Salammô*, 6, 1-203.
- Nagao, J., Munehara, H. (2003). Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Fisheries Science*, 69, 1200-1208.
- Nascimento, F. A., Zara, F. J. (2013). Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* (Brachyura: Portunidae). *Nauplius*, 21, 161-167.
- Osawa, M. (1995). Larval development of four *Petrolisthes* species (Decapoda: Anomura: Porcellanidae) under laboratory conditions, with comments on the larvae of the genus. *Crustacean Research*, 24, 157-187.
- Reed, J. K., Gore, R. H., Scotto, L. E., Wilson, K. A. (1982). Community composition, structure, areal and trophic relationships of decapods associated with shallowwater and deep-water *Oculina varicosa* coral reefs. Studies on decapod crustacea from the Indian River region of Florida, XXIV. *Bulletin of Marine Science*, 32, 761-786.
- Ro, S., Talbot, P., Trujillo, J. L., Lawrence, A. L. (1990). Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1-3. *Journal of Crustacean Biology*, 10, 455-468.
- Rodríguez, I. T., Hernández, G., Felder, D. L. (2005) Review of the Western Atlantic Porcellanidae (Crustacea: Decapoda: Anomura) with new records, systematic observations, and comments on biogeography. *Caribbean Journal of Science*, 41, 544-582.
- Rotllant, G., Chiva, M., Durfort, M., Ribes, E., (2012). Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Astacidea). *Journal of Morphology*. 273, 572–585.

- Sant'Anna, B. S., Turra, A., Zara, F. J. (2012). Reproductive migration and population dynamics of the blue crab *Callinectes danae* in an estuary in southeastern Brazil. *Marine Biology Research*, 8, 354-362.
- Santos, C. M., Lima, G. V., Nascimento, A. A., Sales, A., Oshiro, L. M. Y. (2009). Histological and histochemical analysis of the gonadal development of males and females of *Armases rubripes* (Rathbun, 1897) (Crustacea, Brachyura, Sesarmidae). *Brazilian Journal of Biology*, 69, 161-169.
- Santos, N. M., Mantelatto, F. L. (2011). Reproductive system of the male hermit crab *Clibanarius sclopetarius*: gonopore, spermatophore, and spermatozoa morphologies. *Aquatic Biology* 12, 271– 280.
- Scelzo, M. A. (1982). Observaciones sobre la presencia y distribución de crustáceos de la familia Porcellanidae (Decapoda: Anomura) en aguas Venezolanas y Mar Caribe. *Zoología Neotropical*, 2, 1129-1146.
- Scelzo, M. A. (1983). Anomuran porcellanid crabs from Margarita and Cubagua Islands, Venezuela. *Association for Bahá'í Studies Bulletin*, 30, 1-80.
- Scelzo, M. A., Medina, A., Tudge C. C. (2006). Spermatozoal ultrastructure of the hermit crab *Loxopagurus loxochelis* (Moreira, 1901) (Decapoda: Anomura: Diogenidae) from the southwestern Atlantic. *Crustacean Research*, 6, 1-11.
- Scholtz, G., Richter, S. (1995). Phylogenetic systematics of the reptantian Decapoda (Crustacea, Malacostraca). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 113, 289-328.
- Schubart, C. D., Cuesta, J. A., Felder, D. L. (2002). Glyptograpsidae, a new brachyuran family from central America: larval and adult morphology, and a molecular phylogeny of the Grapsoidea. *Journal of Crustacean Biology*, 22, 28-44.
- 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.
- Sokolowicz, C. C., López Greco, L. S., Gonçalves, R., Bond-Buckup, G. (2007). The gonads of *Aegla platensis* Schmitt (Decapoda, Anomura, Aeglidae): a macroscopic and histological perspective. *Acta Zoologica*, 88, 71-79.
- Souza T. L., Braga A. A., López Greco L. S., Nunes E.T. (2018). Functional morphology of the male reproductive system in *Callichirus major* (Crustacea: Decapoda: Axiidea): Evidence of oocytes in the gonad. *Acta Zool*, 99, 32-41.

- Stillman, J. H., Somero, G. N. A (2000). Comparative analysis of the upper thermal tolerance limits of eastern Pacific porcelain crabs, genus *Petrolisthes*: influences of latitude, vertical zonation, acclimatation, and phylogeny. *Physiological and Biochemical Zoology*, 73, 200-208.
- Subramoniam, T. (1984). Spermatophore formation in two intertidal crabs *Albunea symnista* and *Emerita asiatica* (Decapoda: Anomura). *The Biological Bulletin*, 166, 78-95.
- Subramoniam, T. (1993) Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans. Advances in marine biology. *Academic Press*, 29, 129-214.
- Subramoniam, T. (2017). Sexual biology and reproduction in crustaceans. *Academic Press*, Chap. 12, 325-368.
- Tirelli, T., Campantico, E., Pessani, D., Tudge, C. C. (2006). Description of the male reproductive apparatus of the hermit crab *Calcinus tubularis* (Decapoda: Anomura: Diogenidae). *Biology of the Anomura II Crustacean Research*, 6, 13-21.
- Tirelli, T., Pessani, D., Silvestro, D., Tudge, C. C. (2008). Reproductive biology of Mediterranean hermit crabs: fine structure of spermatophores and spermatozoa of *Diogenes pugilator* (Decapoda: Anomura) and its bearing on a sperm phylogeny of Diogenidae. *Journal of Crustacean Biology*, 28, 534-542.
- Tirelli, T., Silvestro, D., Pessani, D., Tudge, C. C. (2010). Description of the male reproductive system of *Paguristes eremita* (Anomura, Diogenidae) and its placement in a phylogeny of diogenid species based on spermatozoal and spermatophore ultrastructure. *A Journal of Comparative Zoology*, 248, 299-312.
- 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.
- Tudge, C. C. (1991). Spermatophore diversity within and among the hermit crab families, Coenobitidae, Diogenidae, and Paguridae (Paguroidea, Anomura, Decapoda). *The Biological Bulletin*, 181, 238-247.
- Tudge, C. C. (1991). Spermatophore diversity within and among the hermit crab families, Coenobitidae, Diogenidae, and Paguridae (Paguroidea, Anomura, Decapoda). *Biology Bulletin*, 181, 238-247.
- Tudge, C. C. (1992). Comparative ultrastructure of hermit crab spermatozoa

- (Decapoda: Anomura: Paguroidea). *Journal of Crustacean Biology*, 12, 397-409.
- Tudge, C. C. (1995). Ultrastructure and phylogeny of the spermatozoa of the Infraorders Thalassinidea and Anomura (Decapoda, Crustacea). *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle. Serie A, Zoologie*, 166, 251-263.
- Tudge, C. C. (1997). Phylogeny of the Anomura (Decapoda, Crustacea): Spermatozoa and spermatophore morphological evidence. *Contributions to Zoology*, 67, 125-141.
- Tudge, C. C. (1999). Spermatophore morphology in the hermit crab families Paguridae and Parapaguridae (Paguroidea, Anomura, Decapoda). *Invertebrate Reproduction e Development*, 35, 203-214.
- Tudge, C. C. (2009). Sperm morphology and its bearing on decapod phylogeny. In: Martin, J. W., Crandall K. A., Felder, D. L. (Eds) Decapod crustacean phylogenetics. *Crustacean issues 18*. Taylor and Francis/CRC Press.
- Tudge, C. C. (2016). Spermatozoal morphology and its bearing on decapod phylogeny. In *Decapod crustacean phylogenetics*. CRC Press. 113-132.
- Tudge, C. C., Jamieson, B. G. M. (1996a). Spermatophore and spermatozoal morphology in the Porcellanidae. I. *Aliaporcellana suluensis* and *Pisidia longicornis* (Decapoda: Anomura: Porcellanidae). *Crustacean Research*, 25, 73-85.
- Tudge, C. C., Jamieson, B. G. M. (1996b). Spermatophore and spermatozoal morphology in the Porcellanidae. II. The genera *Petrolisthes* and *Polyonyx* (Decapoda: Anomura). *Journal of Crustacean Biology*, 16, 535-546.
- Tudge, C. C., Jamieson, B. G. M., Sandberg, L., Erséus, C. (1998). Ultrastructure of the mature spermatozoon of the king crab *Lithodes maja* (Lithodidae, Anomura, Decapoda): further confirmation of a lithodid-pagurid relationship. *Invertebrate Biology*, 57-66.
- Tudge, C. C., Jamieson, Barrie G. M. (1996). Spermatophore and spermatozoal morphology in the Porcellanidae. I. *Aliaporcellana suluensis* and *Pisidia longicornis* (Decapoda: Anomura: Porcellanidae). *Crustacean Research*, 16, 73-85.
- Tudge, C. C., Lemaitre, R (2006). Studies of male sexual tubes in hermit crabs (Crustacea, Decapoda, Anomura, Paguroidea). II. Morphology of the sexual tube

- in the land hermit crabs, *Coenobita perlatus* and *C. clypeatus* (Coenobitidae). *Crustacean Research*, 6, 121-131.
- Veloso, V. G., Buckup, L., Bond-Buckup, G. (1999). Família Porcellanidae (caranguejos anomuros marinhos). *Os crustáceos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 504, 398-405.
- Veloso, V. G., Melo, G. A. S. (1993). Taxonomia e distribuição da família Porcellanidae (Crustacea: Decapoda: Anomura) no litoral brasileiro. *Iheringia, Série Zoologia*, 75, 171-186.
- Wolfe, J. M., Breinholt, J. W., Crandall, K. A., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., Timm, L. E., Siddall, M. E., Bracken-Grissom, H. D. (2019). A phylogenomic framework, evolutionary timeline and genomic resources for comparative studies of decapod crustaceans. *Proceedings of the Royal Society B*, 286, 2-10.
- Yaikin, J., Quiñones, R. A., González, R. R. (2002). Aerobic respiration rate and anaerobic enzymatic activity of *Petrolisthes laevigatus* (Anomura, Porcellanidae) under laboratory conditions. *Journal of Crustacean Biology*, 22, 345-352.
- Zara, F. J., Caetano, F. H. (2002). Ultrastructure of the salivary glands of *Pachycondyla Neoponera villosa* (Fabricius) (Formicidae: Ponerinae): functional changes during the last larval instar. *Cytologia*, 67, 267-280.
- 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.

Capítulo 2

Caracterização ultraestrutural do espermatozoide em caranguejos porcelana comparado a outros Anomura.

Resumo

Neste trabalho foi realizado a descrição comparativa da ultraestrutura dos espermatozoides de sete espécies de Porcellanidae e, por meio da filogenia propomos a evolução dos caracteres espermáticos em Galatheaidea. Todos os caranguejos porcelana estudados mostraram um conjunto particular de caracteres em relação a morfologia da vesícula acrossomal, que varia de oblongo-elíptico, sendo mais longa do que larga. Os caracteres que diferenciam os Porcellanidae dos outros Galatheaidea são opérculo centralmente perfurado, a presença do cone perforatorial eletrondenso e anel perforatorial posterior na base da vesícula acrossomal. Dentro de Porcellanidae o clado formado por *Pisidia* e *Porcellana* (*Pisidia brasiliensis* e *Porcellana sayana*), foi separado dos outros gêneros pela presença de “ombro” na região apical do acrossoma, formado pelo material subopercular, que se estende até a região média. A ausência do botão apical é um carácter ancestral da família, sendo a sua presença uma autapomorfia para *Pisidia*. *Porcellana sayana* e *Megalobrachium roseum* possuem o cone perforatorial se estendendo até a abertura opercular. *Petrolisthes*, tem como característica exclusiva a estrutura pela primeira vez descrita como anel tubular, eletrondenso. Assim, a ultraestrutura do espermatozoide mostra-se como ferramenta importante para estudos filogenéticos e, com os dados disponíveis, pode-se presumir que o espermatozoide do ancestral Porcellanidae apresentava: 1) opérculo centralmente perfurado, 2) sem botão apical, 3) com cone perforatorial, e 4) anel perforatorial na base do acrossoma. O restante dos caracteres da vesícula acrossomal excêntrica, com camadas concêntricas e câmara perforatorial são características compartilhadas com os Galatheaidea e outros Anomura.

Palavras-chave: evolução; filogenia; microscopia eletrônica de transmissão; morfologia; Porcellanidae.

Abstract

In this work, a comparative description of the spermatozoa ultrastructure of seven species of Porcellanidae is carried out and, through phylogeny, we propose the evolution of sperm characters in Galatheaidea. All porcelain crabs studied show a particular character set in relation to the acrosomal vesicle morphology, which varies from oblong-elliptical, being longer than wide. The characters that differentiate Porcellanidae from other Galatheaidea are centrally perforated operculum, the presence of the electrondense perforatorial cone and posterior perforatorial ring at the base of the acrosomal vesicle. Within Porcellanidae, the clade formed by *Pisidia* and *Porcellana* (*Pisidia brasiliensis* and *Porcellana sayana*) was separated from the other genera by the presence of a "shoulder" in the apical region of the acrosome, formed by the subopercular material, which extends to the middle region. The absence of the apical button is an ancestral character of the family, and its presence is an autopomorphy for *Pisidia*. *Porcellana sayana* and *Megalobrachium roseum* have the perforatorial cone extending to the opercular opening. *Petrolisthes*, has as its exclusive feature the structure for the first described as a tubular, electrondense ring. Thus, the sperm ultrastructure is an important tool for phylogenetic studies and, with the available data, it can be assumed that sperm from the ancestor Porcellanidae presented: 1) centrally perforated operculum, 2) without apical button, 3) with perforatorial cone, and 4) perforatorial ring at the base of the acrosome. The rest of the characters of the eccentric acrosomal vesicle, with concentric layers and perforatorial chamber are characteristics shared with the Galatheaidea and other Anomura.

Key-words: evolution; phylogeny; transmission electronic microscopy; morphology; Porcellanidae.

Introdução

Os Porcellanidae Haworth, 1825, conhecidos popularmente como caranguejos porcelana, são pertencentes a infraordem Anomura com aproximadamente 30 gêneros distribuídos em todo o mundo (Veloso et al., 1999; Mantelatto e Miranda, 2016). Este grupo exerce um papel de grande importância ecológica, uma vez que são filtradores e únicos entre os representantes da superfamília Galatheaidea Samouelle, 1819, a servirem como elo entre a matéria orgânica particulada e os níveis tróficos superiores no ecossistema intermareal e intertidal (Veloso e Melo, 1993; Veloso et al., 1999).

A infraordem Anomura, grupo irmão de Brachyura, é formada por dois grandes clados. (Bracken-Grissom et al., 2013; Wolf et al., 2019) O primeiro clado, é composto pela superfamília Hippoidea, enquanto o segundo, engloba as superfamílias: Aegloidea, Lomidoidea, Chirostyloidea, Galatheaidea, Paguroidea e Lithodoidea. Porcellanidae, pertence a superfamília Galatheaide, que por sua vez, é um grupo monofilético. Apesar de Anomura ser um táxon válido, as relações de parentesco entre as famílias e gêneros são conflitantes nas filogenias existentes, sendo assim objeto de investigações constantes em nível morfológico e molecular (Tudge, 1997c). Análises filogenéticas e morfológicas de larvas, bem como moleculares de representantes adultos de Anomura mostram que as relações de parentesco entre os Anomura ainda não estão totalmente estabelecidas, evidenciando grande complexidade (McLaughlin, 1983b; Scholtz e Richter, 1995).

A ultraestrutura dos espermatozoides e espermatóforos vem sendo utilizada como uma importante ferramenta para a resolução de empasses taxonômicos e relações filogenéticas em crustáceos decápodes (Jamieson, 1994; Tudge, 1995, 1996a, b, 1997c, 2009; Camargo et al., 2016, 2017; Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2019).

Recentemente, a ultraestrutura dos espermatozoides vem sendo integrada à matrizes de dados moleculares, com o intuito de reconstruir o caráter ancestral a partir de árvores geradas pelo mapeamento de caracteres, aumentando a confiança das hipóteses evolutivas e possibilitando maior entendimento dos caracteres compartilhados entre os grupos mais proximamente relacionados (Tudge 2009; Camargo et al., 2016, 2017; Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018).

A ultraestrutura dos espermatozoides em Anomura é semelhante à encontrada em Brachyura, entretanto, a principal diferença está relacionada a

composição e zonação da vesícula acrossomal (Tudge, 1992, 1995). Em Anomura, a ultraestrutura do espermatozoide é mais conhecida nas superfamílias Lithodoidea, Paguroidea, Aegloidea, Lomisoidea, Hippoidea, (Matthews, 1956; Tudge e Jamieson, 1991; Tudge, 1991, 1995a,b, 1998; 2003; Tudge e Scheltinga, 2002; Tirelli et al., 2008, 2013; Santos e Mantelatto, 2011; Buranelli et al., 2014) sendo Galatheaidea pouco representada ainda, com algumas espécies em Munidae como *Pleuroncodes planipes* Stimpson, 1860, *Munida rugosa* (Fabricius, 1775) e *Cervimunida johni* Porter, 1903 e em Galatheidae como *Galathea intermedia* Lilljeborg, 1851, *Galathea strigosa* (Linnaeus, 1761), *Galathea squamifera* Leach, 1814 e *Allogalathea elegans* (Adams & White, 1848) descritas em literatura (Hinsch, 1991; Tudge 1995a,b; Jamieson e Tudge 2000; Kronenberg et al. 2004). Apesar da grande variedade e abundância das espécies de Porcellanidae, poucos membros desta família tiveram os espermatozoides estudados sob o ponto de vista ultraestrutural, sendo somente conhecido para *Petrolisthes armatus* (Gibbes, 1850), *Petrolisthes lamarckii* (Leach, 1820), *Polyonyx transversus* (Haswell, 1882), *Pisidia longicornis* (Linnaeus, 1767) e *Aliaporcellana suluensis* (Dana, 1852) (Tudge e Jamieson, 1996 a, b), o que não permite contar a história evolutiva destas células chave para a fertilização, para a família ou a superfamília.

Desta maneira, este trabalho descreve a ultraestrutura dos espermatozoides de *Megalobrachium roseum* (Rathbun, 1900), *Petrolisthes armatus*, *Petrolisthes galathinus* (Bosc, 1801), *Petrolisthes granulatus* (Guérin, 1835), *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835), *Pisidia brasiliensis* Haig in Rodrigues da Costa, 1968 e *Porcellana sayana* (Leach, 1820) espécies da família Porcellanidae de maneira comparativa a literatura existente, integrando o mapeamento dos caracteres morfológicos associados a uma proposta filogenética, com intuito de contar a história evolutiva dos espermatozoides em Galatheaidea.

Material e Métodos

Machos adultos (N = 5) de *Megalobrachium roseum*, *Pisidia brasiliensis*, *Porcellana sayana*, *Petrolisthes armatus* e *Petrolisthes galathinus* foram coletados nos municípios de Ubatuba (25 ° 07'385'' S / 47 ° 52'508'' W) e São Vicente, Estado de São Paulo, Brasil (23°58'52.19''S / 46°27'15.66''W). Os exemplares (N = 2) *Petrolisthes laevigatus* e *Petrolisthes granulatus* foram coletadas no município de

Valdivia (39°48'51" S/ -73° 14'45" O), Chile. Os espécimes foram coletados de acordo com as exigências do seu habitat (manual, por mergulho autônomo ou arrasto). Após as coletas os animais foram transportados vivos acondicionados em caixas de isopor com aeração.

Para descrição ultraestrutural dos espermatozoides, os animais foram anestesiados em choque térmico (- 20°C) por 10 minutos e dissecados. Pequenas porções (1mm³) do vaso deferente distal (DVD) foram fixadas por quatro horas em solução Karnovsky (2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,3) preparado com água do mar filtrada. Posteriormente, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%. A contrastação "En Bloc" foi realizada com acetato de uranila 1% e, em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (50% a 100%) e embebidas em resina Epon-Araldite. Cortes finos e ultrafinos (50-60 nm) foram obtidos em ultramicrotomo Leica UC7, coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 2% (Zana *et al.*, 2001). As amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL J1010, com aceleração dos elétrons a 80KV e as micrografias foram obtidas com câmera digital Gatan.

Para a descrição dos espermatozoides foi utilizada a nomenclatura proposta por (Tudge e Jamieson, 1996a,b). A morfologia da vesícula acrossomal e da câmara perforatorial foi baseada nas formas de gregarinas segundo Clopton (2004). Para a medida do acrossoma e da câmara perforatorial levou-se em conta a maior largura e a maior altura das estruturas. O resumo dos resultados referente a comparação da ultraestrutura dos espermatozoides de Porcellanidae com os demais Anomura obtidos neste trabalho, encontram-se no material complementar organizados na tabelas 1 e 2.

Para a caracterização morfológica dos espermatozoides, fragmentos de vaso deferente também fixados em solução de Karnovsky (1965) foram analisados sob microscopia de luz e eletrônica. Para a microscopia de luz, os vasos deferentes passaram pela montagem total, com leve esmagamento da lamínola contra a lâmina. Os espermatozoides foram analisados e fotografados no microscópio de contraste interdiferencial de fase (DIC) Zeiss Axioscope, por meio do programa Axio Vision. Para a microscopia eletrônica de varredura, as amostras após, foram

completamente secas no ponto crítico EMS 850, com CO₂ líquido. Os materiais foram aderidos aos “stubs” e recobertos por ouro (5 nm) em no metalizador Supputering SC 070 Balzer Union. As imagens foram obtidas no MEV Zeiss Evo 10, operado com voltagens variando de 10-20 kV.

Filogenia

Os cladogramas foram construídos utilizando sequências concatenadas dos genes 16S rDNA e COI mtDNA disponibilizadas na plataforma GenBank (Tabela I). O alinhamento das sequências foi realizado no Clustal/W (Thompson et al., 1994) via Bioedit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). O melhor modelo evolutivo foi encontrado seguindo o critério de AIC no software jModelTest 2 (Guindon et al., 2003), sendo o modelo GTR+G+I. A hipótese filogenética foi gerada pelo método de Máxima Verossimilhança utilizando o software RAxML-HPC2 on XSEDE (Stamatakis, 2014) via plataforma online CIPRES (Miller et al., 2010) com 1000 réplicas. A edição das árvores filogenéticas e o enraizamento via grupo externo utilizando as espécies *Atyopsis* sp. e *Solenocera* sp., foram realizados no FigTree 1.3.1 (Rambaut, 2009). Foi construída uma matriz com os dados morfológicos da ultraestrutura dos espermatozoides das espécies estudadas e disponíveis da literatura (Tudge, 1995a, b; Jamieson 1991b; Lohrmann e Rainieri, 1995; Koltzoff, 1906; Kronenberger et al., 2004; Hinsch, 1991; Tudge e Jamieson 1996a,b; Retzius, 1909). Nesta matriz, os caracteres selecionados foram o opérculo, anel perforatorial posterior, cone perforatorial denso, ápice do cone perforatorial alcançando a abertura opercular, anel tubular, ombro na região apical formado pelo material subopercular e botão apical. Para designar o estado do caráter, foram atribuídos números, sendo “opérculo” pode ser perfurado (1) ou fechado (2), o “anel perforatorial posterior” pode estar ausente (0) ou presente (1), o “cone perforatorial denso” pode estar presente (1) ou ausente (2), o “ápice do cone perforatorial” pode alcançar (1) ou não (2) a abertura opercular; e o botão apical pode estar presente (1) ou ausente (0). A matriz e a árvore gerada pela Máxima Verossimilhança foram carregadas no Mesquite v.3.04 (Maddison e Maddison, 2015) para a reconstrução da história do caráter segundo o critério de parcimônia.

Resultados

Morfologia geral do espermatozoide em MEV e DIC

Em geral, os espermatozoides de Porcellanidae chamam a atenção por serem alongados e complexos. Todas as espécies aqui estudadas e as descritas em literatura apresentam padrão em sua morfologia. São compostos por uma longa vesícula acrossomal que varia seu formato de oval a elipsoide anexada posteriormente a um volumoso núcleo globular através da região do citoplasma com três ou mais braços microtubulares longos que se estendem lateralmente a partir da região citoplasmática (Fig. 1A-F). Os espermatozoides sob MEV e DIC foram registrado apenas nas espécies *Pisidia brasiliensis* (Fig. 1A), *Petrolisthes armatus* (Fig. 1B-D) e *Porcellana sayana* (Fig. 1E e F). As espécies *Petrolisthes galathinus*, *Petrolisthes laevigatus*, *Petrolisthes granulosus* e *Megalobrachium roseum* aqui estudadas também tiveram seus espermatozoides observados sob MEV e DIC, porém, as micrografias não possuíam resolução consistente para ser usadas neste trabalho, mas foi confirmada e descrita a presença de todas essas características morfológicas dos espermatozoides por microscopia eletrônica de transmissão.

Caracterização geral das estruturas e camadas da vesícula acrossomal do espermatozoide em Porcellanidae em ultraestrutura

Em todas as espécies aqui estudadas, os espermatozoides são compostos por uma vesícula acrossomal que varia de oval a elipsóide, cuja a porção anterior foi caracterizada como a margem livre com o opérculo e a porção posterior, aquela em contato com o citoplasma. A vesícula acrossomal possui camadas concêntricas, sendo a zona interna composta pelo material subopercular, material central do cone, cone perforatorial e camada interna. Contínuo a camada interna, fazendo parte da zona interna da vesícula acrossomal, podem ocorrer anéis, sendo o anel tubular na altura média da câmara perforatorial, característico para o gênero *Petrolisthes* e o anel perforatorial posterior presente em todas as espécies de Porcellanidae estudadas. As outras camadas concêntricas formam a zona externa sendo composta pela camada externa e a camada periférica. Ao redor destas últimas camadas, na região apical do acrossoma, se nota uma ou mais camadas extra-operculares, característica das espécies *Petrolisthes armatus* e *Petrolisthes galathinus*, respectivamente. No ápice da vesícula acrossomal encontra-se o opérculo eletrondenso e perfurado, sendo que no gênero *Pisidia* nota-se a presença de um botão apical na região da perfuração opercular. Nas espécies do gênero

Petrolisthes, nota-se um anel opercular na região posterior do opérculo. O espaço subopercular está presente em todas as espécies de Porcellanidae, bem como a presença do cone perforatorial eletrondenso. A morfologia da câmara perforatorial é variável entre os gêneros, principalmente em relação ao ápice desta estrutura. Nas espécies de *Petrolisthes*, no interior da câmara perforatorial notam-se septos, que são característicos para este gênero. Na espécie *P. galathinus*, ao redor da câmara perforatorial encontram-se projeções microvilares e corrugações na camada externa do acrossoma. Todas estas características utilizadas para a descrição dos espermatozoides encontram-se sumarizadas na figura 2.

Ultraestrutura do Espermatozoides

Megalobrachium roseum

A morfologia geral da vesícula acrossomal do espermatozóide de *M. roseum* é elipsóide, com opérculo eletrondenso, espesso e perfurado centralmente (Fig. 3A). O citoplasma envolve somente a porção posterior da vesícula acrossomal (Fig. 3A). O opérculo eletrondenso dobra-se em direção a base da vesícula acrossomal (Fig. 3B). Abaixo do opérculo, compondo a zona interna, nota-se o material subopercular, o qual é alcançado pelo ápice do cone perforatorial denso e contém centralmente o material central do cone, menos eletrondenso (Fig. 3B). Na região externa do cone perforatorial denso é possível identificar a camada interna da vesícula acrossomal, a qual é eletrondensa e granular, sendo observada somente na região apical da câmara perforatorial (Fig. 3B). A morfologia da câmara perforatorial é elipsóide, com ápice marcadamente arredondado (Fig. 3A-B). Na base do acrossoma encontra-se o anel perforatorial posterior, no qual é eletrondenso, alongado e levemente dilatado. Na zona externa do acrossoma a camada externa é menos eletrondensa que a camada periférica (Fig. 3D).

Em secções transversais sequenciais desde o ápice, junto ao opérculo até a base da câmara perforatorial, junto ao citoplasma, nota-se a complexidade da longa vesícula acrossomal sendo as alturas dos cortes representada numericamente no diagrama geral da vesícula acrossomal em corte longitudinal (Fig. 4A). Em corte quase perfeitamente transversal da região apical da câmara acrossomal na altura da porção opercular (1 na figura 4A), nota-se o material central do cone que é delimitado externamente pelo cone perforatorial denso eletrondenso. A camada

interna da vesícula acrossomal é menos eletrondensa que o denso opérculo (Fig. 4B). Próximo ao ápice da câmara perforatorial (2 na figura 4A) é possível observar a forma circular desta câmara, além da presença do cone perforatorial denso sob a camada acrossomal interna (Fig. 4C). No primeiro terço basal da vesícula acrossomal (3 na figura 4A) nota-se a câmara perforatorial, o anel tubular eletrondenso como parte da zona interna o acrossomo, não mais sendo observada a camada acrossomal interna. Na zona acrossomal externa, a camada acrossomal externa apresenta algumas estrias e sobre esta, ocorre a camada acrossomal periférica (Fig. 4D). No corte transversal próximo a base da vesícula acrossomal (4 na figura 4A), a câmara perforatorial é circular e o anel perforatorial posterior mostra desenho semelhante a pétalas de uma flor pentâmera, e a zona acrossomal externa, com algumas estrias, é menos eletrondensa que a zona acrossomal periférica (Fig. 4E).

Petrolisthes armatus

Os extensos espermatozoides apresentam a vesícula acrossomal alongada, com morfologia elipsóide, sendo mais longa do que larga (Fig. 5A). Logo abaixo desta, nota-se uma estreita e longa faixa de citoplasma com várias membranas transversais, como estrias, ligando o acrossomo ao núcleo volumoso. A região posterior da vesícula acrossomal tem a mesma largura do citoplasma (Fig. 5A). Na região apical ou anterior, a vesícula acrossomal possui opérculo espesso, eletrondenso e centralmente perfurado, com formato de um domo alto, que se dobra em direção a base do acrossoma (Fig. 5B). O opérculo é mais delgado na porção anterior, tornando-se progressivamente mais espesso em direção a região do citoplasma ou posterior (Fig. 5B). Próximo à margem posterior do opérculo, nota-se lateralmente a saliência sobre a superfície acrossomal, denominada anel opercular (Fig. 5B). A zona interna do acrossomo começa abaixo da região perfurada do opérculo com o material subopercular de aspecto homogêneo e menos eletrondenso que o opérculo (Fig. 5B), o qual torna-se mais fino em direção a base do acrossoma. O ápice do cone perforatorial eletrondenso não alcança a região do material subopercular (Fig. 5B), terminando na camada interna do acrossomo, que nesta espécie possui duas regiões distintas, sendo a região ao redor do ápice do cone perforatorial menos eletrondensa e mais granular, do que a segunda região,

que envolve todo o restante do cone perforatorial que possui característica menos granular e mais eletrondensa (Fig. 5A- B). Centralmente ao cone nota-se o material central do cone com eletrondensidade similar a camada interna do acrossoma (Fig. 5B). Externamente a camada interna e abaixo do material subopercular encontra-se a zona acrossomal externa, onde a camada externa tem duas porções, sendo a apical mais eletrondensa e granular, enquanto a basal é menos eletrondensa com grânulos mais esparsos. Sobre a camada externa encontra-se a camada periférica mais eletrondensa e homogênea (Fig. 5C). Um terceiro componente da zona externa é camada extra-opercular com poucas camadas discretas, posicionada externamente ao opérculo, no terço anterior da vesícula acrossomal, não alcançando o anel tubular (Fig. 5A-C). A morfologia da câmara perforatorial é deltóide gladiado com ápice ligeiramente agudo e arredondado (Fig. 5A-C). Na região média da câmara perforatorial, a zona interna mostra o anel tubular dilatado e eletrondenso (Fig. 5C) e, próximo a base da vesícula acrossomal na zona interna, ocorre outro anel, o anel perforatorial posterior eletrondenso e estreito (Fig. 5D). Na base da câmara perforatorial ocorre um material citoplasmático mais eletrondenso e finamente granular (Fig. 5D).

A altura dos cortes transversais está representada numericamente no diagrama geral da vesícula acrossomal em secção longitudinal na figura 6A. Em secção transversal próxima ao ápice, junto ao opérculo (1 na figura 6A) é possível notar o cone perforatorial denso, eletrondenso, preenchido pelo material central do cone, as camadas interna e a externa do acrossomo menos eletrondensa, o opérculo espesso e eletrondenso, além da camada extra-opercular eletrondensa (Fig. 6B). A câmara perforatorial é circular no seu terço apical (2 na figura 6A), junto ao cone perforatorial eletrondenso (Fig 6B) tornando-se irregular, formando uma figura de estrela de cinco pontas (3 na figura 6A), os septos perforatoriais, na altura do anel tubular (Fig. 6D). Ao se aproximar da base da câmara perforatorial (4 na figura 6A), na altura do anel perforatorial posterior da zona interna, os septos da câmara perforatorial assumem a forma de “X” amplo, com ápices arredondados. Esta forma vai progressivamente tornando circular a medida em que se aproxima da base da câmara. Ainda nesta, acima do anel tubular posterior na camada interna, a zona externa mostra a camada acrossomal externa menos eletrondensa, com projeções microvilares abaixo de camada periférica (Fig. 6E).

Petrolisthes galathinus

O espermatozoide apresenta vesícula acrossomal bastante alongada com formato elipsóide (Fig. 7A). Na base da vesícula acrossomal nota-se o citoplasma que envelope toda região posterior da mesma (Fig. 7A). No ápice da vesícula acrossomal nota-se o opérculo espesso, perfurado e eletrondenso, em formato de domo arredondado, com suas margens posteriores dobrando-se em direção a base do acrossoma (Fig. 7B). Na região posterior do opérculo, observa-se o anel opercular posicionado mais próximo a região média da vesícula acrossomal (Fig. 7A-B) que em *P. armatus* (Fig. 5A-B). Ao redor de toda a estrutura opercular, a vesícula acrossomal mostra na zona externa, várias camadas extra operculares que se estendem da região anterior até a região média do alcançando o anel tubular (Fig. 7A-C). Em *P. armatus* esta camada extra opercular é única e com posição mais apical (Fig. 5A-C). Na abertura opercular e abaixo desta, nota-se o material subopercular ligeiramente eletrondenso que ocorre até a altura do anel opercular (Fig. 7B). O cone perforatorial eletrondenso estende-se anteriormente até o material subopercular, sempre preenchido com o material central do cone menos eletrondenso que o cone (Fig. 7B). A camada interna do acrossoma possui duas regiões, sendo a primeira, mais apical, com aspecto granular e menos eletrondensa que a segunda, basal, mais eletrondensa e homogênea, envolvendo a maior parte do cone perforatorial (Fig. 7A-B). Ainda na zona interna, na região média e basal da vesícula acrossomal ocorrem respectivamente o anel tubular eletrondenso, dilatado, e o anel posterior mais estreito (Fig. 7A-D). A morfologia da câmara perforatorial é deltóide com ápice mais estreito que a base (Fig. 7A-B). No interior desta estrutura, nota-se septos perforatoriais eletrondensos (Fig. 7C). A zona externa do acrossomo mostra a camada externa do com duas regiões distintas: a metade apical mais eletrondensa que a metade basal com grânulos esparsos e com projeções microvilares (Fig. 7C-D).

A secções transversais da vesícula acrossomal desde o ápice, junto ao opérculo até a base da câmara perforatorial, junto ao citoplasma estão representadas numericamente no diagrama em secção longitudinal na figura 8A. Na secção próxima à região apical da vesícula acrossomal (1 na figura 8A), observa-se na zona interna o cone perforatorial denso eletrondenso preenchido pelo material central, a camada interna granular. Além disso, nota-se o opérculo

eletrondenso e as várias e destacadas camadas extra-operculares da zona externa da vesícula acrossomal (Fig. 8B). Na altura do anel tubular da zona interna do acrossomo (2 na figura 8A), nota-se que a câmara perforatorial forma um desenho em forma de “X”, onde as reentrâncias eletrondensas são os septos perforatoriais circundado pelo anel tubular (Fig. 8B). Nesta altura, pode-se observar que, sobre o anel tubular ainda ocorre a camada acrossomal interna menos eletrondensa que o anel tubular. Na zona externa, notam-se as projeções microvilares da camada externa, delimitadas pela camada periférica mais eletrondensa (Fig. 8C). A medida em que as secções aproximam-se da base perforatorial (3 na figura 8A), a câmara perforatorial passa a apresentar mais septos perforatoriais formados pelo anel tubular, exibindo forma de uma estrela de cinco pontas (Fig. 8C). Externamente ao anel tubular da camada interna, nota-se ainda o anel perforatorial posterior menos eletrondenso em contato com a camada externa, da zona acrossomal externa (Fig. 8C). A morfologia em cruz da câmara perforatorial vai progressivamente desaparecendo, pela redução dos septos perforatoriais (Fig. 8D), a medida em que os cortes se aproximam da base da câmara perforatorial (4 na figura 8A). O anel perforatorial posterior passa ser único na margem da câmara perforatorial e poucas projeções microvilares ocorrem na camada acrossomal externa menos eletrondensa, a qual é seguida pela camada acrossomal periférica perfazendo a zona acrossomal externa (Fig. 8D).

Petrolisthes granulosus

A vesícula acrossomal do espermatozóide de *P. granulosus* mostra-se elipsóide, mais larga do que longa, com opérculo eletrondenso, delgado e perfurado centralmente (Fig. 9A). O citoplasma envolve somente a porção posterior da vesícula acrossomal (Fig. 9A). O opérculo eletrondenso se dobra em direção a região posterior da vesícula acrossomal (Fig. 9B). Abaixo do opérculo, na zona interna do acrossoma, nota-se o material subopercular de eletrondensidade similar a camada interna, o qual é alcançado pelo ápice do cone perfatorial denso, que contém o material central do cone, de mesma eletrondensidade que a camada interna do acrossoma de aspecto fibrilar (Fig. 9B). Na extremidade posterior interna do opérculo ocorre o anel subopercular eletrondenso, no material subopercular. Abaixo do anel subopercular encontra-se a zona externa do acrossomo, formado

pela camadas extra opercular, delgada, sem lamelas e menos eletrondensa, camada periférica, eletrondensa, e a camada externa, com lamelas pontilhadas mais ou menos concêntricas (Fig. 9A-C). A morfologia da câmara perforatorial é ovóide, com ápice arredondado mais estreito que a base (Fig. 9D). No interior desta estrutura nota-se os septos perforatoriais (Fig. 9D). Na região anterior da câmara perforatorial nota-se que a zona interna apresenta o anel tubular discreto, eletrondenso e, mais posteriormente, o anel perforatorial (Fig. 9D).

Os cortes transversais na região próximo ao ápice do acrossoma (1 na figura 10A) é possível notar o material central do cone preenchendo o cone perforatorial denso eletrondenso, a camada acrossomal interna menos eletrondensa, a camada acrossomal externa com lamelas pontilhadas concêntricas e a camada periférica e a margem do opérculo eletrondenso (Fig. 10B). O ápice da câmara perforatorial (2 na figura 10A) é circular e envolto pela camada interna (Fig. 10B) e a zona acrossomal externa, com a camada externa formada por lamelas pontilhadas concêntricas e a camada periférica mais eletrondensa. A morfologia da câmara perforatorial se mantém até na altura do anel tubular da zona interna (3 na figura 10A), porém a câmara torna-se mais ampla e sem septos (Fig. 10C). Na altura do anel perforatorial posterior, na zona interna (4 na figura 10A), a câmara perforatorial possui 11 septos formando uma figura de engrenagem. (Fig. 10D).

Petrolisthes laevigatus

Os espermatozoides de *P. laevigatus* possuem vesícula acrossomal bastante alongada, com morfologia variando de cilíndrica a elipsóide (Fig. 11A). Na região apical ou anterior, o acrossoma possui opérculo delgado, eletrondenso e centralmente perfurado, se dobrando em direção a região posterior do acrossoma (Fig. 11B). O opérculo possui espessura semelhante em toda sua extensão (Fig. 11B). Na região perfurada e abaixo do opérculo nota-se o material suborbercular, com aspecto homogêneo e menos eletrondenso que o opérculo (Fig. 11B). Esta região é alcançada pelo ápice do cone perforatorial, que é envolto em toda sua extensão pela camada interna do acrossoma com mesmo aspecto e eletrondensidade (Fig. 11B-C). O material central do cone possui eletrondensidade similar a camada interna do acrossoma (Fig. 11B-C). Externamente a camada interna, encontra-se a camada acrossomal externa eletronlúcida e com aspecto

granular (Fig. 11B-C). A morfologia da câmara perforatorial é ovóide com ápice mais estreito que a base e no interior desta estrutura nota-se o septo perforatorial (Fig. 11A-C). Ao redor da câmara perforatorial ocorre o anel tubular dilatado e eletrondenso (Fig. 11C), seguido pelo anel perforatorial posterior eletrondenso e estreito, mais próximo a base da câmara perforatorial (Fig. 11C).

Em cortes transversais da vesícula acrossomal, observa-se de forma mais didática a organização do conteúdo acrossomal, sendo que a altura dos mesmos está representada numericamente na figura 12A. A secção próxima à região apical (1 na figura 12A) exibe o material central do cone que é circundado pelo cone perforatorial denso, a camada acrossomal interna menos eletrondensa, a camada acrossomal externa eletrólúcida e granular, o material subopercular e o opérculo eletrondenso (Fig. 12B). Na altura da câmara perforatorial (2 na figura 12A), observa-se a câmara perforatorial central com formato circular, a camada acrossomal interna eletrondensa, circundada pela camada acrossomal externa eletrólúcida, sob a camada periférica (Fig. 12C). A medida em que os cortes se aproximam da base da vesícula acrossomal (números 3 e 4 em 12A), nota-se o anel perforatorial posterior que contém sob seu conteúdo pequenos fragmentos do anel tubular eletrondenso principalmente ao redor da câmara, a camada acrossomal externa eletrólúcida e camada a periférica (Fig. 12D). Nota-se o anel tubular presente na camada interna, e a câmara perforatorial com 10 septos. (Fig. 12D-E).

Pisidia brasiliensis

A vesícula acrossomal é consideravelmente alongada, com formato variando de elíptico a oblongo, com o ápice ligeiramente mais largo do que a base (Fig. 13A). No ápice da vesícula acrossomal pode-se observar o opérculo curto e espesso, perfurado centralmente, e neste local nota-se o botão apical de aspecto granular e de mesma eletrondensidade que o opérculo (Fig. 13A-B). O ápice do cone perforatorial eletrondenso atinge o material subopercular (Fig. 13B). Abaixo do opérculo este material subopercular da zona interna estende-se lateralmente para formar “ombro” da região anterior do acrossoma (Fig. 13A-B). Ainda na zona interna, a camada interna da vesícula acrossomal envolve todo o cone perforatorial com o material central do cone menos eletrondenso (Fig. 13A-B). A camada interna

progride posteriormente até a base da vesícula acrossomal, recobrando o anel perforatorial posterior (Fig. 13B-D). A zona externa tem camada externa estreita e reticular, enquanto que a camada periférica é muito delgada e eletrondensa (Fig. 13A, C e D). A zona externa penetra o material subopercular na altura do ombro, ficando assim, a zona externa sobreposta por um componente da zona interna (Fig. 13A). A câmara perforatorial possui morfologia deltoide com ápice mais afilado (Fig. 13C). Na base desta estrutura nota-se o anel perforatorial posterior, eletrondenso e levemente dilatado (Fig. 13D). O citoplasma forma uma faixa estreita, com a mesma largura.

Na região apical, abaixo do opérculo e junto ao ápice da câmara perforatorial (1 na figura 14A), a secção transversal exibe o cone perforatorial eletrondenso que é preenchido internamente pelo material central do cone, a camada acrossomal interna mais eletrondensa que a externa, o material subopercular e pequenos fragmentos operculares eletrondensos (Fig. 14B). Em corte próximo ao ápice perforatorial (2 na figura 14A) nota-se que este apresenta forma arredondada e é seguido pelo cone perforatorial denso (Fig. 14C). Nesta altura observa-se ainda a camada acrossomal interna menos eletrondensa que o cone e a camada externa menos eletrondensa que a zona acrossomal periférica. À dois terços do início da câmara perforatorial (indicado por 3 na figura 14A) é possível notar a câmara perforatorial com grânulos eletrondensos, o anel perforatorial posterior e anterior a camada interna. A zona acrossomal externa é reticulada e a periférica delgada (Fig. 14D). Na base da câmara perforatorial (4 na figura 14A) a zona interna tem o anel perforatorial posterior eletrondenso envolto pela camada interna. Zona acrossomal externa tem a camada externa reticulada e a periférica delgada e eletrondensa (Fig. 14E).

Porcellana sayana

O espermatozoide desta espécie possui morfologia elíptica (Fig. 15A). Na região anterior da vesícula acrossomal pode-se observar o opérculo curto, espesso, eletrondenso e perfurado centralmente (Fig. 15B). Centralmente a abertura do opérculo é atingida pelo cone perforatorial eletrondenso, sendo interior a esta estrutura o material central do cone de mesma eletrondensidade que este (Fig. 15B). Ao redor de toda extensão do cone perforatorial nota-se a camada interna de

aspecto homogêneo na região anterior e mais granular em direção a região posterior recobrando o anel perforatorial posterior até a sua base (Fig. 15B-C). Nas laterais do ápice do cone perforatorial e da camada interna, estendendo-se até a região média do acrossoma, nota-se o material subopercular dilatado lateralmente o que caracteriza-se pela morfologia de “ombro” (Fig. 15A-B). Mergulhado no interior do material do ombro, o qual faz parte da zona interna, encontra-se a zona externa, com suas camadas externa e periférica. A camada externa é menos eletrondensa que a estreita camada periférica e, também a camada interna (Fig 15B). A câmara perforatorial possui morfologia deltoide com ápice arredondado, sendo penetrado em sua base pela projeção central da camada periférica do acrossoma (Fig. 15C). Na base desta estrutura observa-se o anel perforatorial posterior, eletrondenso e levemente dilatado. A zona externa tem camada acrossomal externa menos eletrondensa e a camada periférica é delgada e mais eletrondensa (Fig. 15D).

As secções transversais na região apical, abaixo do opérculo e junto ao ápice da câmara perforatorial (1 na fig. 16A) mostraram na zona interna com o cone perforatorial preenchido pelo material central do cone, a camada interna com dois materiais com diferente eletrondensidade. A zona externa mostra a camada externa menos eletrondensa que a delgada camada periférica. Ambas encontram-se envoltas pelo material subopercular do “ombro” menos eletrondenso, o qual é constituinte da zona interna (Fig. 16B-C). Todas estas camadas podem ser observadas em cortes mais basais na altura do ápice acrossomal (indicados por 1 e 2 na figura 16A). Nos cortes mais basais em direção ao citoplasma do espermatozoide (3 na figura 16A), nota-se o anel perforatorial posterior recoberto pela camada interna, sendo ambos circundados pelas camadas que constituem a zona externa (Fig 16D). Próximo a base da câmara perforatorial (indicado por 4 na figura 16A), é possível notar o anel perforatorial posterior eletrondenso em contato com a câmara perforatorial. Sobre o anel encontra-se a camada interna, mostrando que esta é contínua do polo apical ao basal da vesícula acrossomal. (Fig. 16E).

Dados moleculares

A árvore filogenética foi gerada por Máxima Verossimilhança (Likelihood), utilizando sequências dos genes 16S rDNA e COI mtDNA que mostrou a monofília

da superfamília Galatheoidea com valores de suporte de clado expressos em bootstrap. Observou-se a formação de dois clados dentro de Galatheoidea. A família Porcellanidae constitui um clado, sendo um grupo monofilético. As famílias Galatheidae, Munidopsidae e Munididae constituem o outro clado, sendo que Munidopsidae representa um grupo monofilético e as famílias Galatheidae e Munididae, apresentaram-se como parafiléticas (Fig. 17).

Reconstrução da história de caracteres

Com o mapeamento dos caracteres nota-se que, Porcellanidae, possui três caracteres exclusivos, que os diferenciam dos outros Galatheoidea conhecidos na literatura: opérculo perfurado (Fig. 18), “cone perforatorial denso” (Fig. 19) e “anel perforatorial posterior” (Fig. 20). Dentro da família Porcellanidae, os espermatozoides de alguns gêneros e espécies apresentaram características exclusivas e algumas características compartilhadas. O cone perforatorial estendendo-se até a abertura opercular foi carácter compartilhado somente por *M. roseum* e *Po. sayana* (Fig. 21). O carácter “extensão do material subopercular formando um ombro”, foi observado apenas em *Po. sayana*, *Pi. brasiliensis* e *Pi. longicornis* (Fig. 22). Além disso, o gênero *Pisidia* apresenta como característica exclusiva, a presença do botão apical (Fig. 23), sendo o mesmo para o carácter “anel tubular” de *Petrolisthes* (Fig. 24).

Figura 1. Espermatozoides microscopia eletrônica de varredura (MEV) e contraste interdiferencial de fase (DIC). **A:** morfologia geral do espermatozoide sob MEV destacando grande vesícula acrossomal excêntrica. **B:** espermatozoides visto sob DIC, nota-se os braços microtubulares. **C:** detalhe do espermatozoide em MEV, nota-se os braços microtubulares. **D:** detalhe do espermatozoide sob DIC mostrando longa vesícula acrossomal no polo apical, sempre saliente ao núcleo por meio de uma região citoplasmática e braços microtubulares. **E:** espermatozoide visto sob MEV com longa vesícula acrossomal, nota-se no apice da vesícula uma linha levemente marcada (seta branca) formada pelo “ombro” e volumoso núcleo. **F:** detalhe em DIC mostrando espermatozoide com alongada vesícula acrossomal saliente ao núcleo volumoso por meio do citoplasma.

AV: vesícula acrossomal; **CY:** citoplasma; **MA:** braços microtubulares; **N:** núcleo;

Figura A: *Pisidia brasiliensis*; **Figura B, C e D:** *Petrolisthes armatus*; **Figura E e F:** *Porcellana sayana*

Fig.1

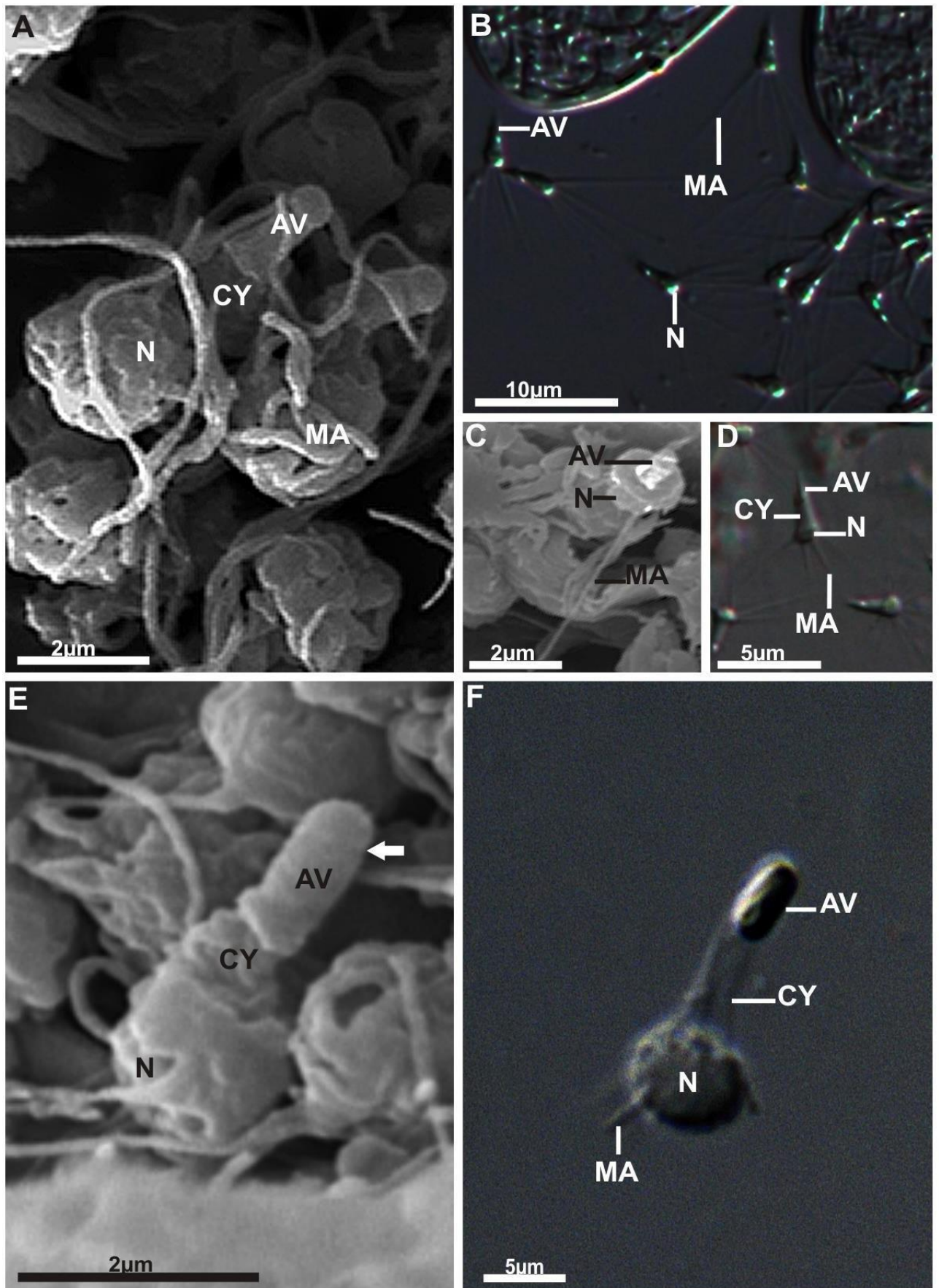
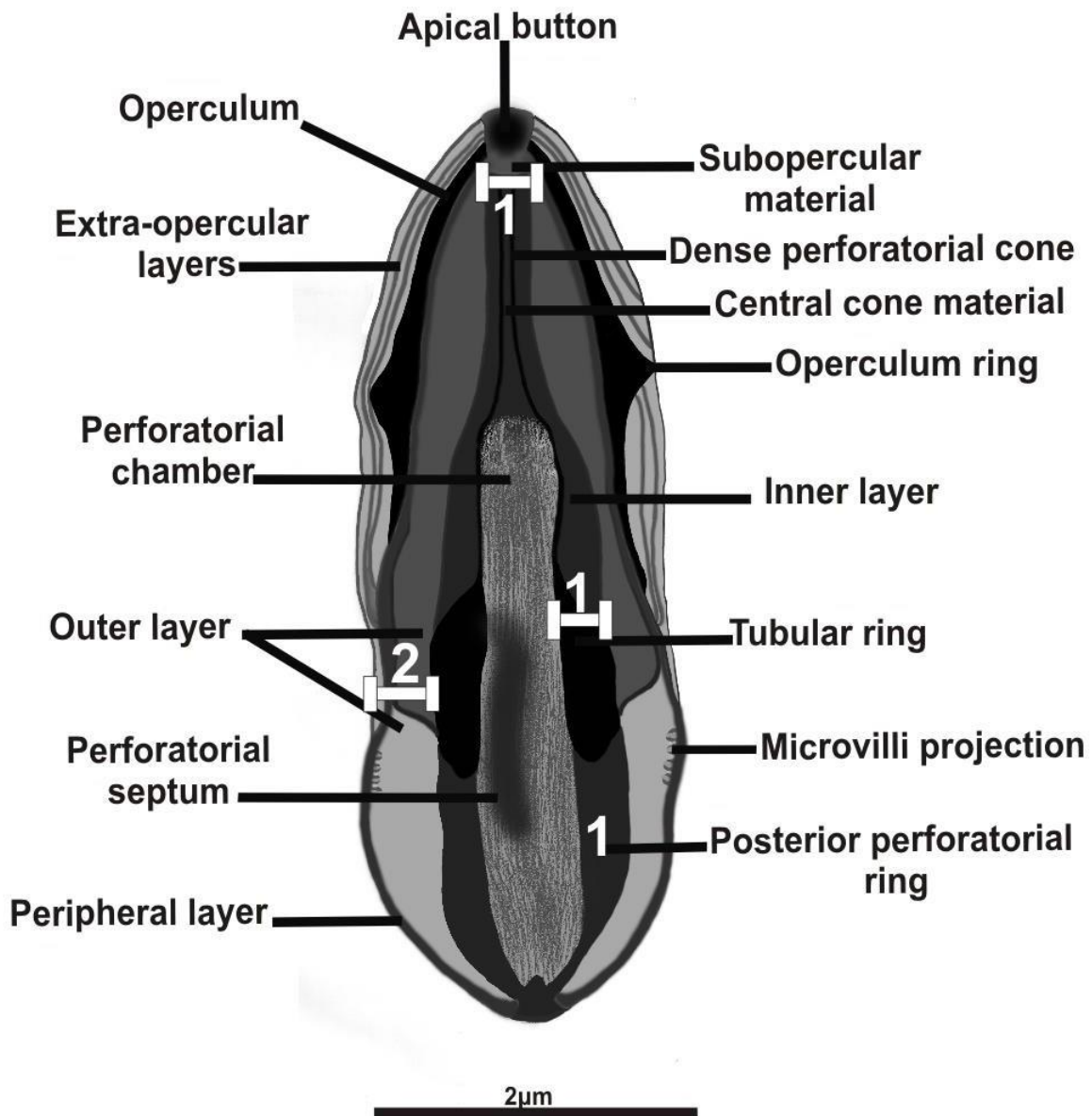


Figura 2. Diagrama geral das estruturas e zonas utilizadas para a descrição de vesícula acrossomal em Porcellanidae. A vesícula acrossomal, abaixo do opérculo com ou sem botão opercular, está dividida em zonas acrossomais: interna e externa. A zona acrossomal interna é formada pelo material subopercular, material central do cone, cone perforatorial denso, camada interna, anel tubular e ou anel tubular posterior. A zona interna é centralmente marcada pela presença da câmara perforatorial. A zona acrossomal externa é formada pela camada externa, periférica e camadas extra operculares. **AB:** botão apical; **CCM:** material central do cone; **CY:** citoplasma; **DPC:** cone perforatorial denso; **EOL:** camada extra opercular; **IL:** camada interna; **MVP:** projeção de microvilosidade; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **OR:** anel opercular; **P:** câmara perforatorial; **PL:** camada periférica; **PPR:** anel posterior do perforatório; **PS:** septo perforatorial; **SM:** material subopercular; **TR:** anel tubular;

Fig. 2



Key:
 1- Internal acrossome zone = Subopercular material + central cone material + dense perforatorial cone + inner layer + tubular ring + posterior perforatorial ring.
 2- External acrossome zone = outer layer + peripheral layer + extra-opercular layers.

Figura 3. Espermatozoide de *Megalobrachium roseum* em corte longitudinal.

A: morfologia geral da vesícula acrossomal elipsóide do espermatozoide de *M. roseum* com opérculo eletrondenso, espesso e perfurado centralmente. **B:** detalhe do opérculo eletrondenso e do material subopercular. O cone perforatorial estende-se até a abertura do opérculo, e está preenchido com material central do cone. Externo ao cone perforatorial denso nota-se a camada interna do acrossoma ocorrendo somente na região apical da câmara perforatorial. **C:** detalhe da câmara perforatorial e do anel perforatorial posterior, ambos parede da zona acrossomal interna. **D:** na base da vesícula acrossomal, o anel perforatorial posterior torna-se mais estreito. Na mesma imagem nota-se ainda a camada externa do acrossoma, menos eletrondensa que a camada periférica, compondo a zona acrossomal externa.

CCM: material central do cone; **DPC:** cone perforatorial denso; **IL:** camada interna; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório; **PL:** camada periférica; **PPR:** anel posterior do perforatório; **SM:** material subopercular.

Fig. 3

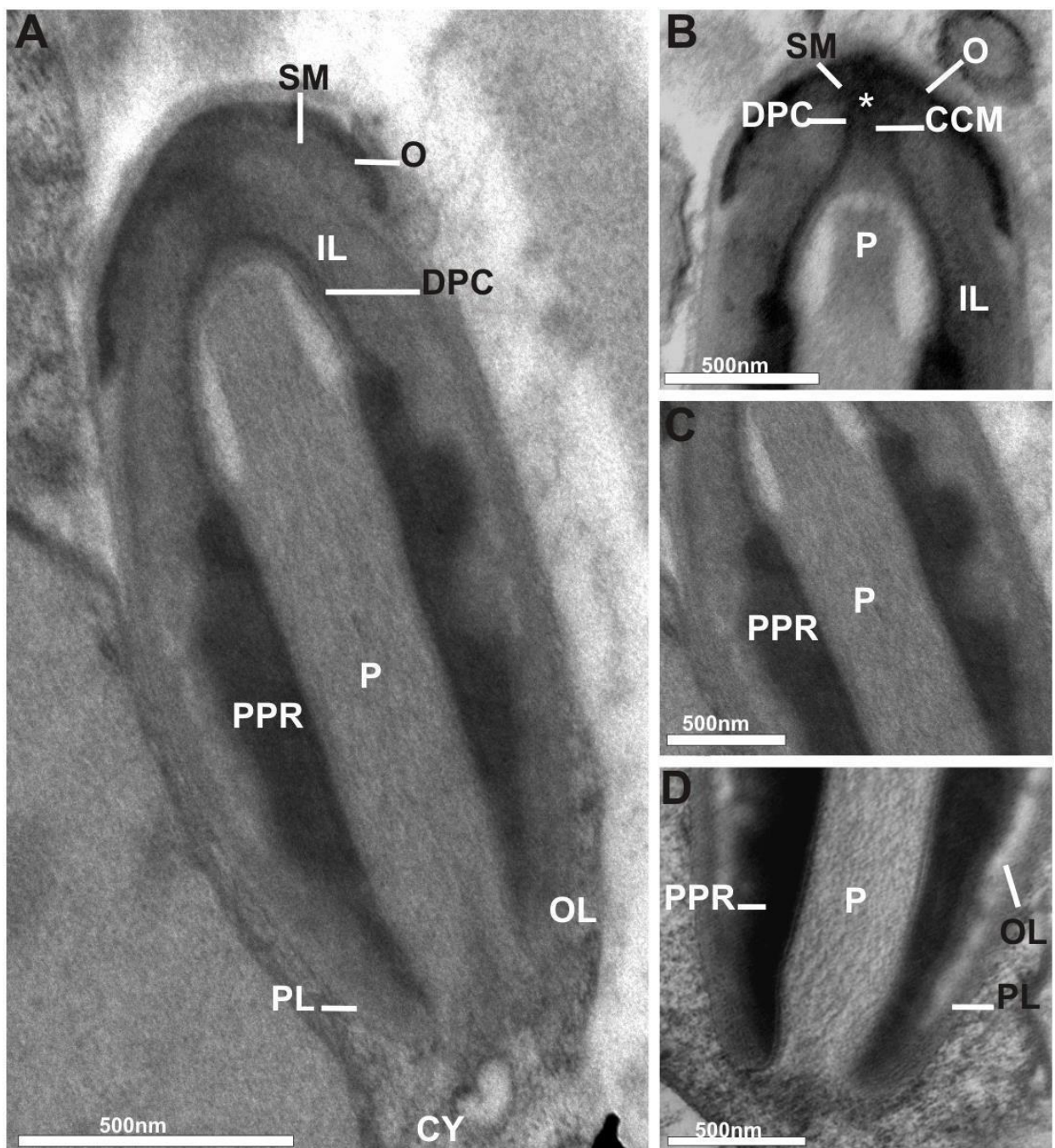


Figura 4. Secções transversais sequenciais da vesícula acrossomal de *Megalobrachium roseum*. **A:** diagrama geral da vesícula acrossomal em secção longitudinal com as posições dos cortes transversais números 1, 2, 3 e 4 mostradas nas figuras B, C, D e E, respectivamente. **B:** secção transversal, ligeiramente oblíqua, abaixo do ápice da vesícula acrossomal mostrando o material central do cone, delimitado externamente pelo cone perforatorial denso eletrondenso, a camada interna do acrossoma é menos eletrondensa que o opérculo eletrondenso. **C:** câmara perforatorial arredondada em secção próxima ao ápice. Nota-se ainda o cone perforatorial denso e a camada acrossomal interna. **D:** aspecto do anel tubular eletrondenso nos três quartos basais da câmara perforatorial. A camada acrossomal interna sob a camada acrossomal externa menos eletrondensa que a periférica, sendo ambas constituintes da zona externa da vesícula acrossomal. **E:** próximo à base perforatorial a câmara perforatorial mostra-se arredondada. Nota-se também o anel perforatorial posterior, que faz parte da zona acrossomal interna, com desenho semelhante a pétalas de uma flor pentâmera. Na zona externa, a camada acrossomal externa apresenta algumas estrias, sendo menos eletrondensa que a camada acrossomal periférica

CCM: material central do cone; **CY:** citoplasma; **DPC:** cone perforatorial denso; **IL:** camada interna; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório ; **PL:** camada periférica; **PPR:** anel posterior do perforatório; **TR:** anel tubular.

Fig. 4

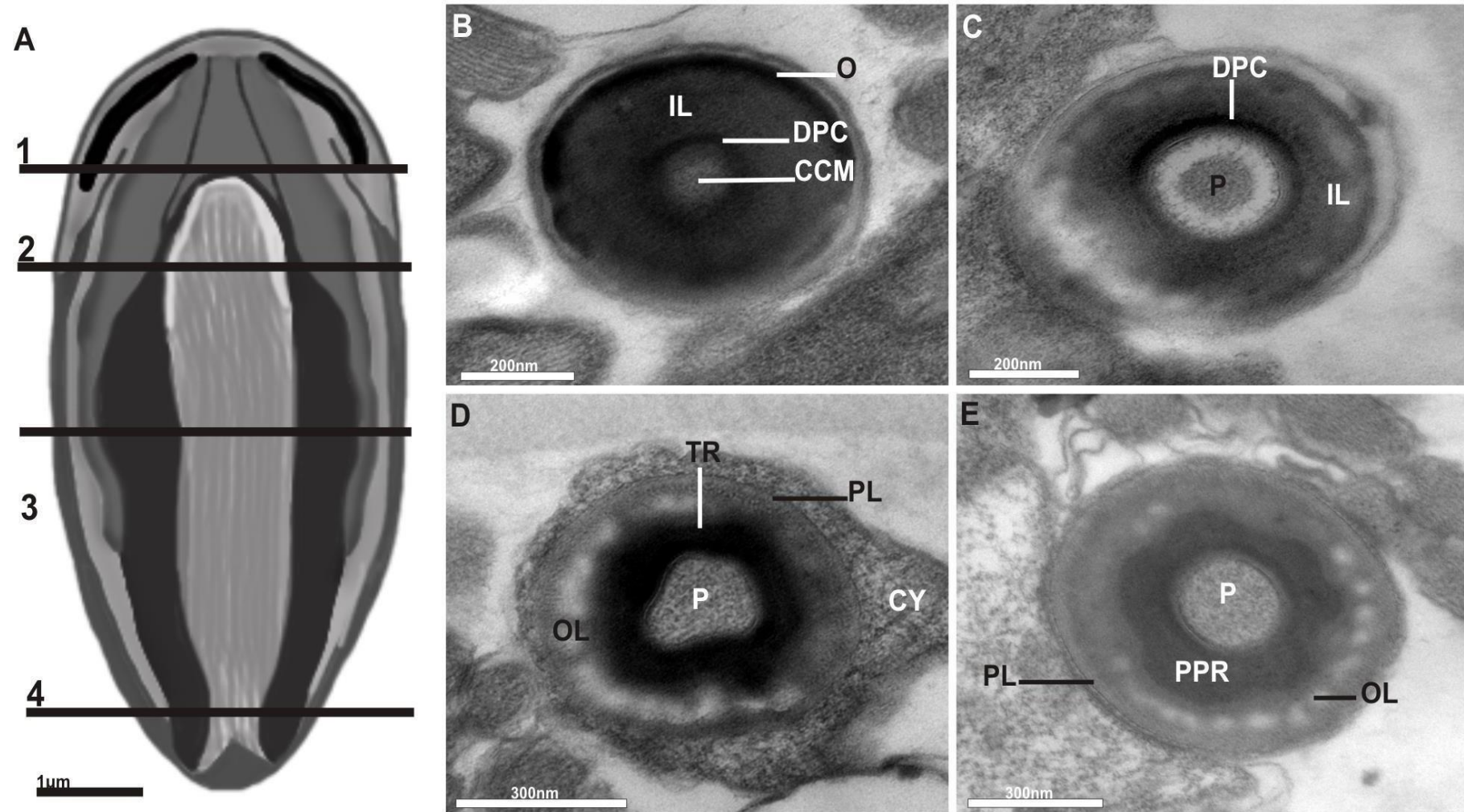


Figura 5. Espermatozoide de *Petrolisthes armatus*. A: corte longitudinal do espermatozoide mostrando a grande e longa vesícula acrossomal. Abaixo da vesícula nota-se uma delgada estreita e longa faixa citoplasma com membranas formando estrias transversais sobre núcleo em vista parcial. O acrossoma possui opérculo espesso, eletrondenso e centralmente perfurado. A zona externa da vesícula acrossomal mostra poucas camadas extra operculares concentradas no pólo apical. A camada periférica tem eletrondensidade homogênea e a camada externa com diferentes eletrondensidade. **B:** detalhe do ápice mostrando a zona externa com poucas e discretas camadas extra operculares. Na zona interna a região perfurada, abaixo do opérculo com o material suporbercular. O ápice do cone perforatorial eletrondenso não se estende até abertura do opérculo. **C:** centralmente ao cone nota-se o material central do cone, externamente encontra-se a camada interna do acrossomo. Na região média da câmara perforatorial nota-se na camada interna do acrossomo o anel tubular dilatado, o qual é eletrondenso. A zona acrossomal externa mostra a camada acrossomal externa, com diferentes eletrondensidades e a camada periférica mais eletrondensa e homogênea. **D:** base da vesícula acrossomal, mostrando na zona interna o anel perforatorial posterior mais estreito e menos eletrondenso que o tubular. A zona externa mostra camada acrossomal externa menos eletrondensa e com grânulos esparsos, sendo a camada periférica homogênea e mais eletrondensa. No citoplasma ocorrem membranas celulares paralelas e um material citoplasmático granular e eletrondenso penetrando na câmara perforatorial. **CCM:** material central do cone; **CY:** citoplasma; **DPC:** cone perforatorial denso; **EOL:** camada extra opercular; **IL:** camada interna; **O:** opérculo; **OR:** anel opercular; **OL:** camada externa; **P:** perforatório ; **PL:** camada periférica; **PPR:** anel posterior do perforatório; **SM:** material subopercular; **TR:** anel tubular.

Fig. 5

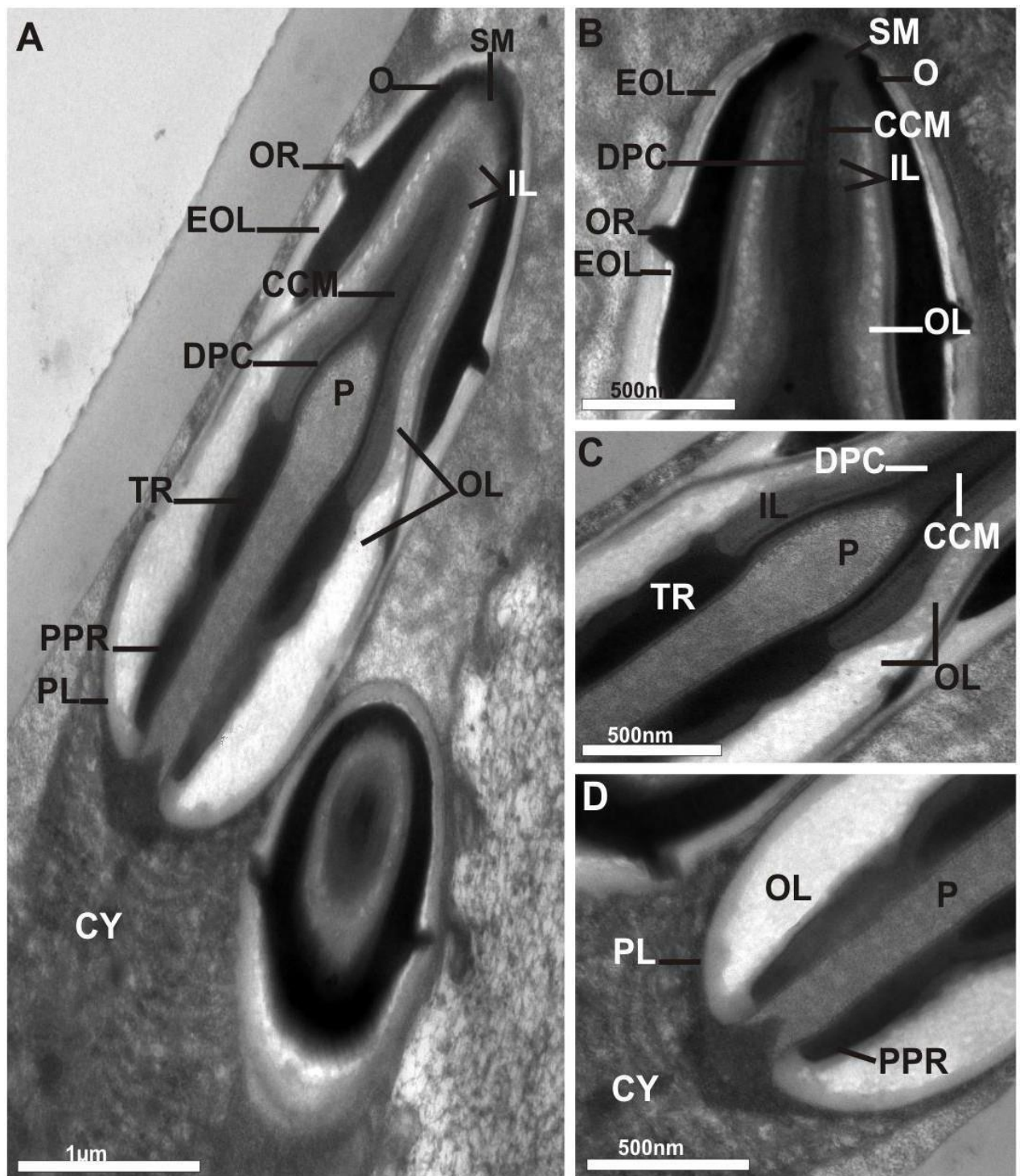


Figura 6. Cortes transversais da vesícula acrossomal de *Petrolisthes armatus*.

A: Diagrama geral da vesícula acrossomal em secção longitudinal com os planos de corte (1, 2, 3 e 4) representados nas secções transversais das figuras B, C, D e E, respectivamente. **B:** próximo ao ápice da vesícula acrossomal, nota-se na zona interna o cone perforatorial eletrondenso preenchido pelo material central do cone e a camada interna. A zona acrossomal tem a camada externa menos eletrondensa e o opérculo eletrondenso recobre a camada periférica. Nota-se ainda na zona externa a camada extra-opercular eletrólúcida. **C:** câmara perforatorial arredondada seguida externamente pelo cone perforatorial denso, camada acrossomal interna e camada acrossomal externa e periférica da zona acrossomal externa. **D:** câmara perforatorial em forma de estrela de cinco pontas. Observe na zona interna o anel tubular. Na zona externa nota-se a camada acrossomal externa menos eletrondensa e finamente granular que a camada periférica. **E:** câmara acrossomal que passa a ter morfologia de cruz a medida em que a secção se aproxima da base da vesícula acrossomal, onde ocorre o anel perforatorial posterior na zona interna. A zona externa apresenta algumas projeções microvilares (seta) e abaixo da camada periférica.

CCM: material central do cone; **DPC:** cone perforatorial denso; **EOL:** camada extra opercular; **IL:** camada interna; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório; **PPR:** anel posterior do perforatório; **PL:** camada periférica; **TR:** anel tubular.

Fig. 6

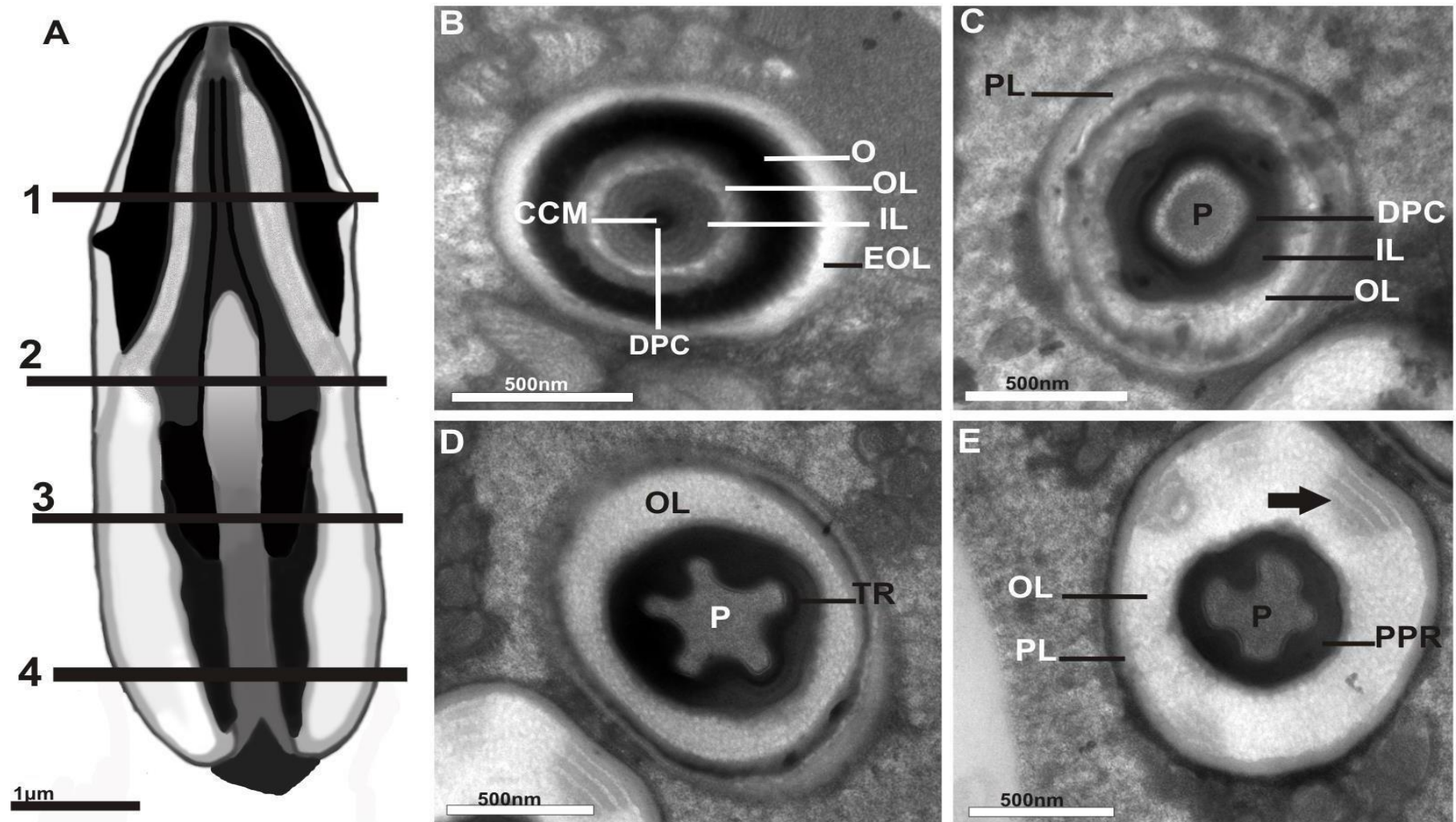


Figura 7. Espermatozoide de *Petrolisthes galathinus* em secção longitudinal

A: vista geral do espermatozoide, nota-se vesícula acrossomal bastante alongada e na base desta nota-se o citoplasma alongado. No ápice da vesícula nota-se o opérculo espesso, perfurado e eletrondenso, juntamente com o anel opercular. Ao redor de toda estrutura opercular, a vesícula acrossomal mostra na zona externa, várias camadas extra operculares que se estendem até quase a metade posterior do acrossoma, terminando no anel tubular. **B:** detalhe do ápice da vesícula acrossomal, nota-se abaixo do opérculo na zona interna, o material subopercular que ocorre até a altura do anel opercular. O cone perforatorial eletrondenso estende-se anteriormente até o material subopercular, preenchido pelo material central do cone. A camada interna do acrossoma possui duas regiões. **C:** detalhe da câmara perforatorial, nota-se em sua região média da vesícula acrossomal, o anel tubular dilatado na zona interna. A câmara perforatorial na altura deste anel apresenta septos perforatoriais. A zona externa mostra a camada externa do acrossoma com projeções microvilares no terço posterior da vesícula acrossomal. **D:** na base do perforatório observa-se na zona interna o anel perforatorial posterior eletrondenso e a câmara perforatorial não mostra septos nos cortes longitudinais. A zona externa mostra a camada externa do acrossoma poucas projeções microvilares e a camada periférica é homogeneamente eletrondensa.

CCM: material central do cone; **CY:** citoplasma; **DPC:** cone perforatorial denso; **EOL:** camada extra opercular; **IL:** camada interna; **MVP:** projeção de microvilosidade; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **OR:** anel opercular; **P:** perforatório; **PPR:** anel posterior do perforatório; **PL:** camada periférica; **PS:** septo perforatorial; **SM:** material subopercular; **TR:** anel tubular.

Fig. 7

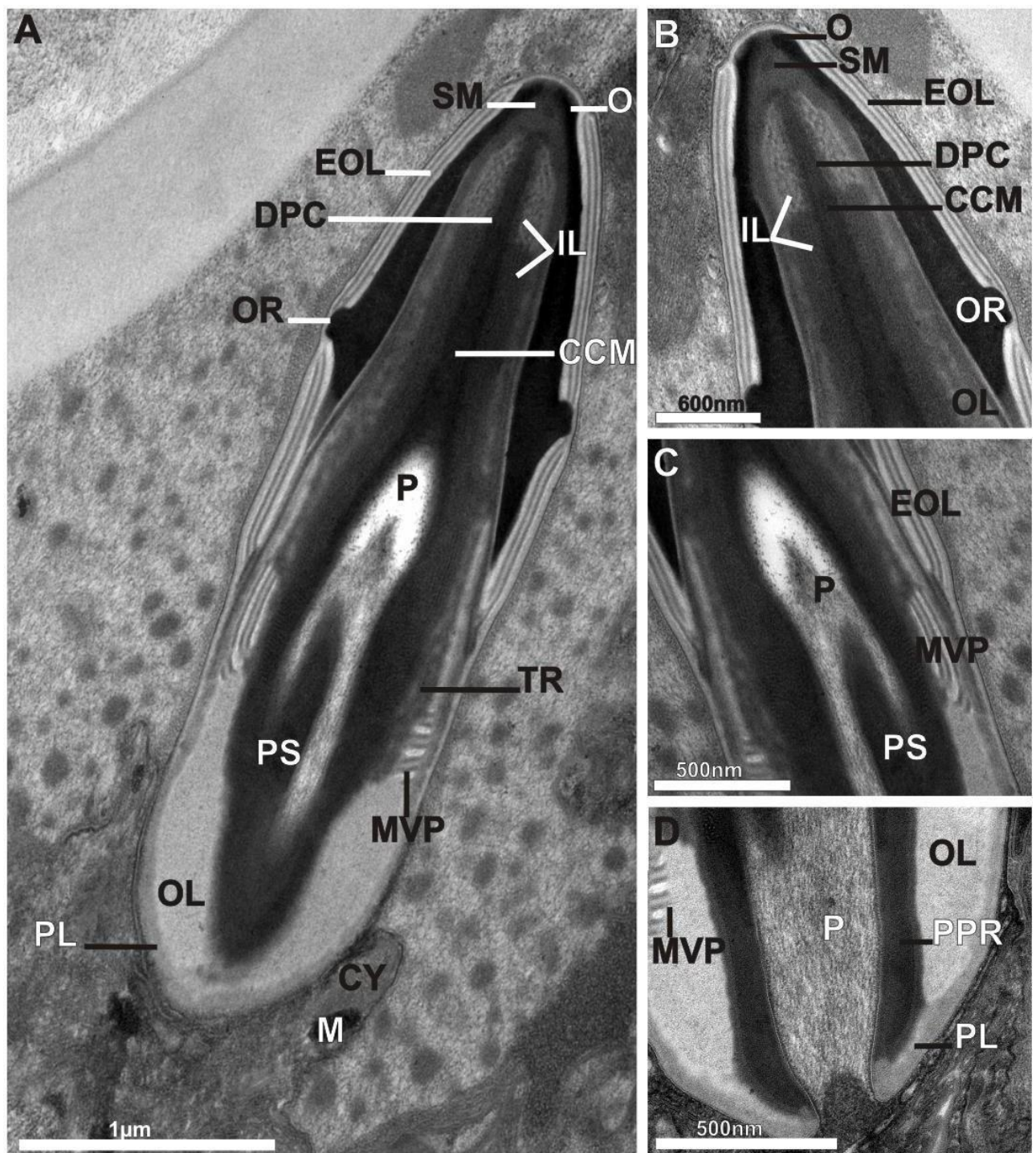


Figura 8. Cortes transversais da vesícula acrossomal de *Petrolisthes galactinus*. **A:** Diagrama geral da vesícula acrossomal em secção longitudinal para demonstrar as alturas dos cortes transversais. Os números 1, 2, 3 e 4 representam as alturas das secções mostradas nas figuras B, C, D e E, respectivamente. **B:** Em secção próxima ao ápice da vesícula acrossomal, observe o cone perforatorial denso, o material central do cone, a camada interna eletrondensa, o opérculo eletrondenso e as camada extra-opercular. **C:** Em corte próximo ao ápice da câmara perforatorial nota-se têm forma semelhante à cruz. Observe ainda o anel tubular, a camada interna e a zona extra-opercular lamelada. **D:** Corte levemente oblíquo, mostrando os septos formando a figura de estrela da câmara perforatorial, os anéis tubular e o perforatorial posterior parcialmente sobrepostos, na zona interna. A zona externa a camada acrossomal externa menos eletrondensa que a periférica e camada extra-opercular como efeito oblíquo. **E:** Secção próxima à base da vesícula acrossomal exibindo a câmara perforatorial, o anel perforatorial posterior, a camada acrossomal externa, como projeções microvilares (seta) e a periférica.

CCM: material central do cone; **DPC:** cone perforatorial denso; **EOL:** camada extra opercular; **IN:** camada interna; **O:** opérculo; **OZ:** zona externa; **P:** perforatório ; **PPR:** anel posterior do perforatório ; **PZ:** zona periférica; **TR:** anel tubular.

Fig. 8

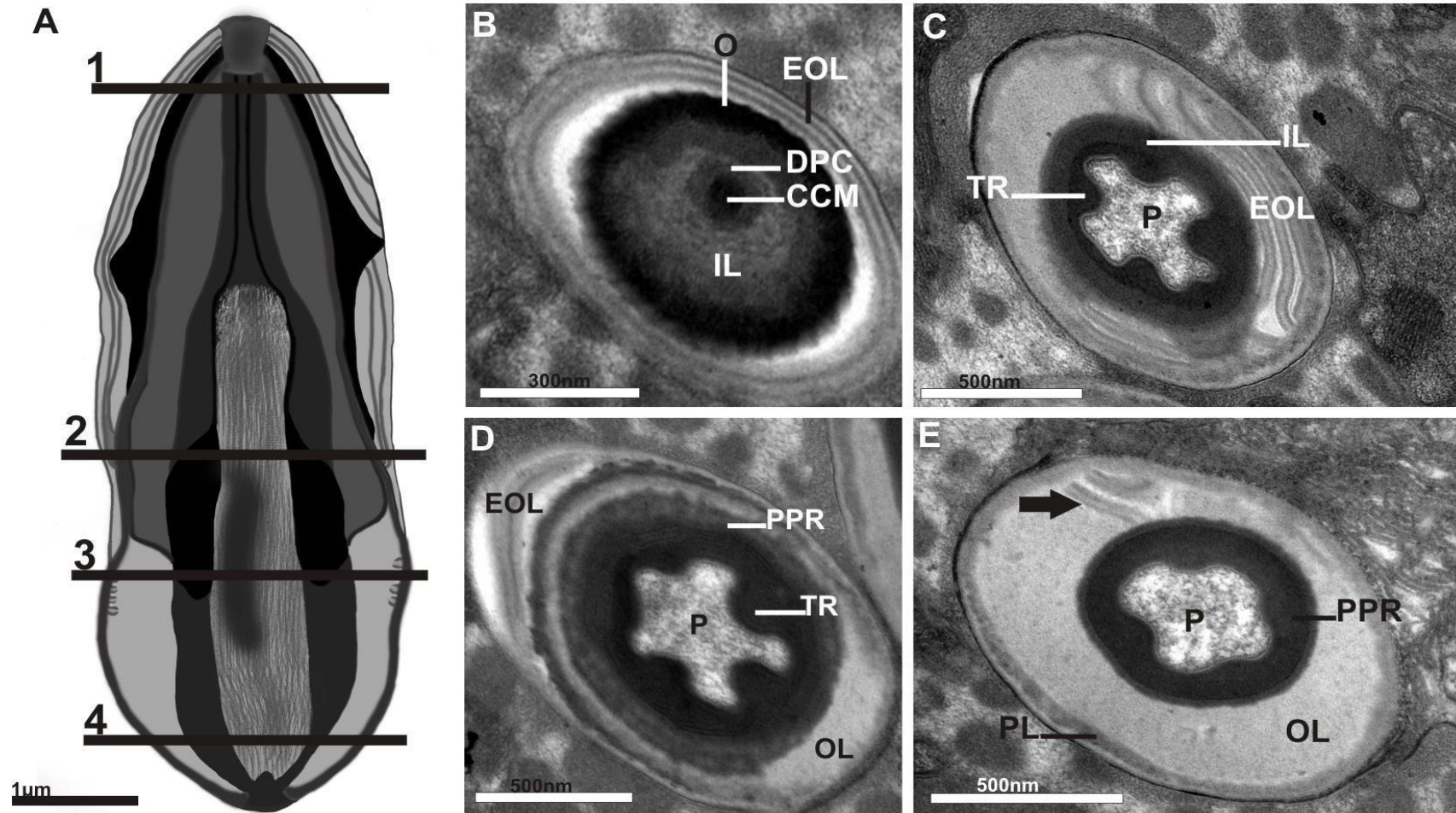


Figura 9. Espermatozoide de *Petrolisthes granulosus* em corte longitudinal.

A: vista geral com o acrossoma do espermatozóide de *P. granulosus* mostra-se elipsóide e perfurado centralmente. Na região anterior pode-se observar a camada extra opercular delgada e sem lamelas **B:** opérculo perfurado com o o material subopercular alcançado pelo ápice do cone perfatorial denso, que contém o material central do cone na zona interna. Nota-se ainda a camada extra opercular delgada sobre a camada periférica e a externa levemente reticulada. **C:** detalhe do anel subopercular eletrondenso na extremidade interna do opérculo, no material subopercular e abaixo deste, a camada extra opercular menos eletrondensa. **D:** No interior da câmara perforatorial notam-se osseptos perforatoriais. Na região anterior da câmara perforatorial, a zona interna do acrossomo porta o anel tubular e, na base da câmara o anel perforatorial. Nota-se a camada externa reticulada e camada periférica eletrondensa na zona externa.

CCM: material central do cone; **CY:** citoplasma; **DPC:** cone perforatorial denso; **EOL:** camada extra opercular; **IL:** camada interna; **MVP:** projeção de microvilosidade; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório; **PPR:** anel posterior do perforatório; **PS:** septo perforatorial; **PL:** camada periférica; **SM:** material subopercular; **SR:** anel subopercular; **TR:** anel tubular.

Fig. 9

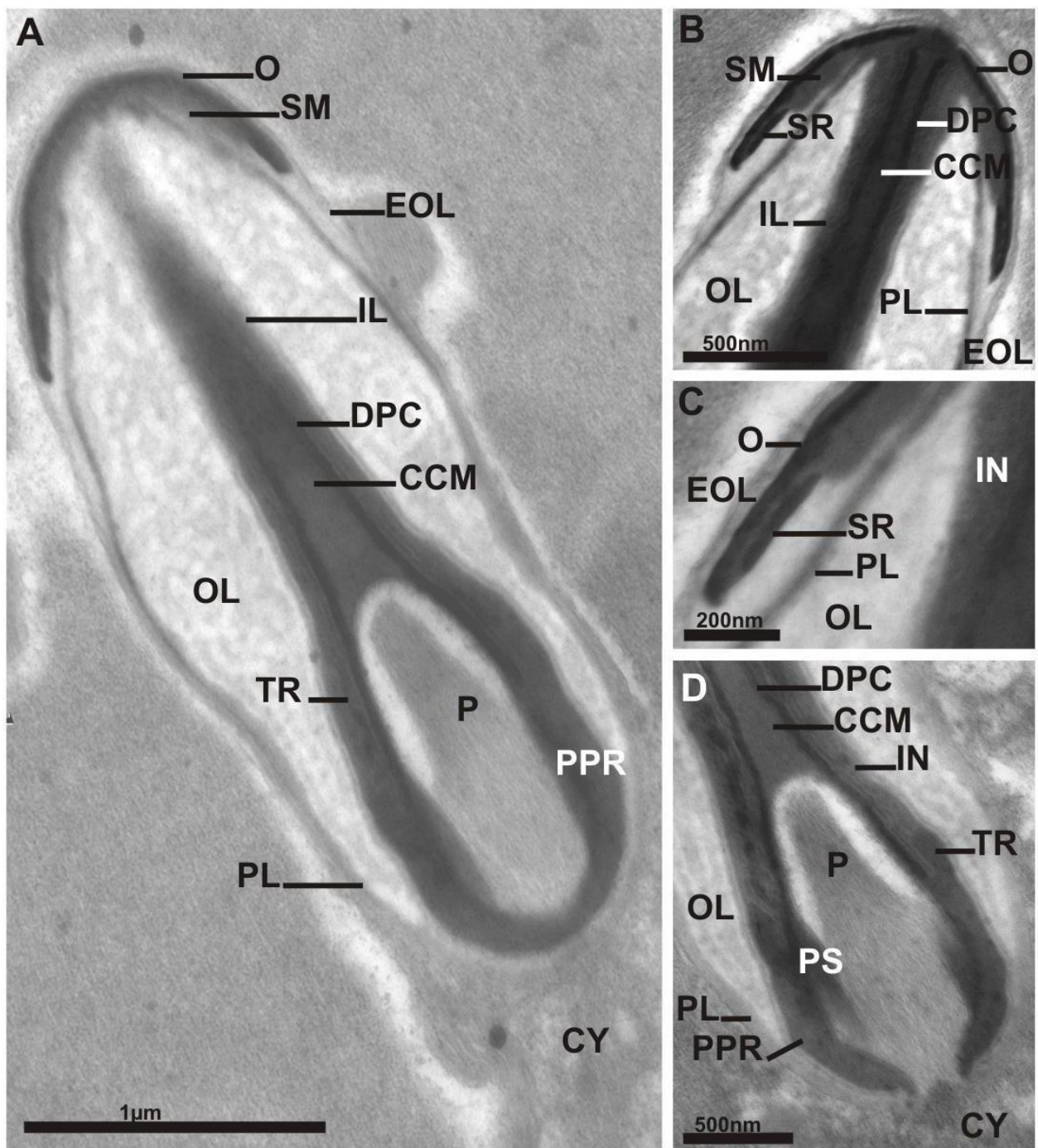


Figura 10. Cortes transversais da vesícula acrossomal de *Petrolisthes granulosus*. **A:** diagrama em secção longitudinal para demonstrar as alturas dos cortes transversais na vesícula acrossomal secções mostradas nas figuras B, C, D e E, respectivamente. **B:** em secção próxima ao ápice da vesícula acrossomal, observa-se o cone perforatorial posterior, o material central do cone, a camada interna, a zona acrossomal externa e o opérculo eletrondenso. **C:** ápice da câmara perforatorial mostrando a camada interna eletrondensa e homogênea. Na zona externa, a camada acrossomal externa mostra as lamelas pontilhadas concêntricas e a camada periférica mais eletrondensa e homogênea. **D:** câmara perforatorial ainda circular na altura do anel tubular da zona interna. **E:** base da câmara perforatorial com os vários septos perforatoriais, lembrando uma engrenagem formados pelo anel perforatorial posterior da zona interna. Note a camada acrossomal externa ainda apresenta lamelas pontilhas das concêntricas e a camada periférica homogeneamente mais eletrondensa, ambas formando a zona externa do acrossomo.

CCM: material central do cone; **DPC:** cone perforatorial denso; **IL:** camada interna; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório ; **PPR:** anel posterior do perforatório ; **PL:** camada periférica; **TR:** anel tubular.

Fig. 10

A

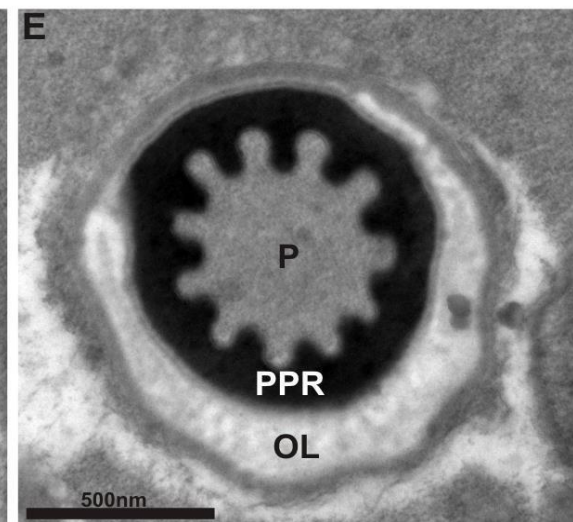
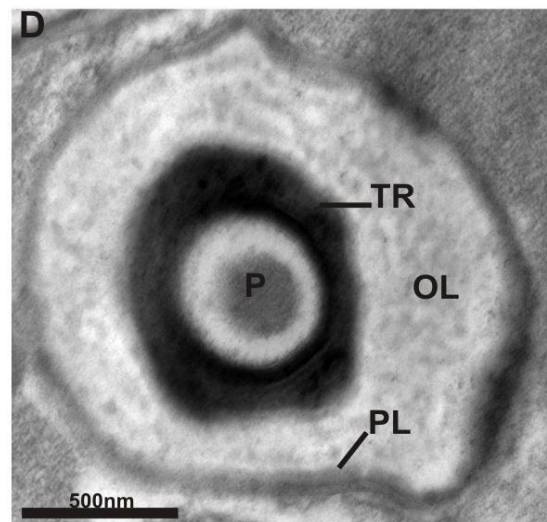
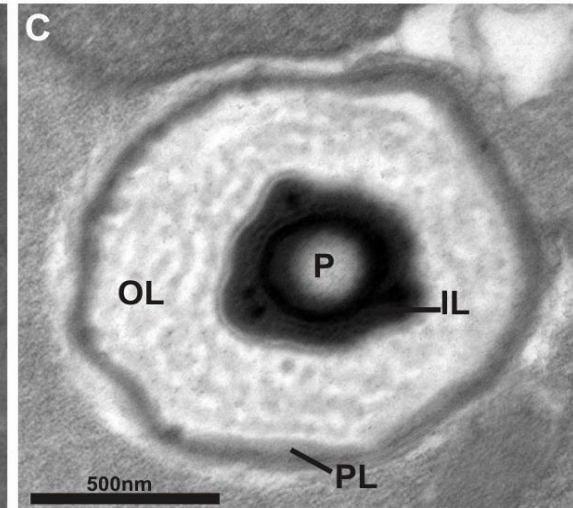
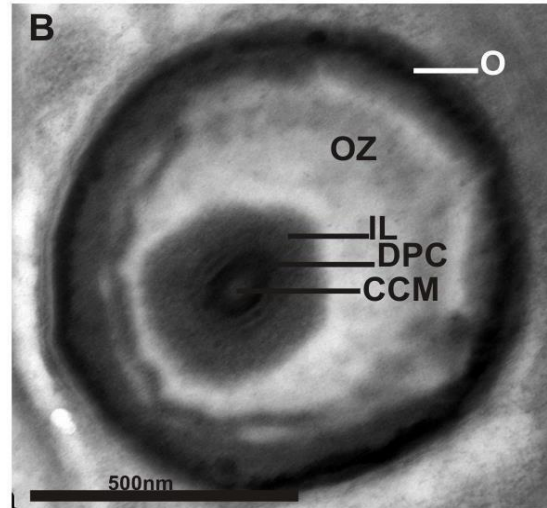
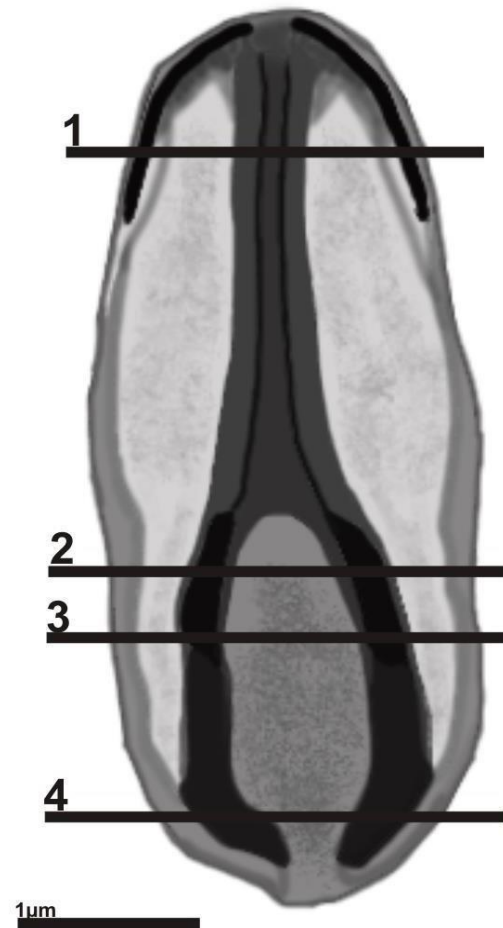


Figura 11. Espermatozoide de *Petrolisthes laevigatus* em corte longitudinal.

A: vista geral com dos espermatozoides com vesícula acrossomal bastante alongada. Nota-se na região apical, opérculo delgado e centralmente perfurado. **B:** abaixo do opérculo nota-se a o material suporbercular, esta região é alcançada pelo ápice do cone perforatorial, que é envolto em toda sua extensão pela camada interna do acrossoma. **C:** externamente a camada interna encontra-se a camada acrossomal externa. Nota-se no interior da câmara perforatorial nota-se o septo perforatorial. Ao redor da câmara perforatorial ocorre o anel tubular dilatado seguido pelo anel perforatorial posterior estreito, mais próximo a base do perforatório .

CCM: material central do cone; **CY:** citoplasma; **DPC:** cone perforatorial denso; **IL:** camada interna; **MVP:** projeção de microvilosidade; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório ; **PPR:** anel posterior do perforatório ; **PS:** septo perforatorial; **PL:** camada periférica; **SM:** material subopercular.

Fig. 11

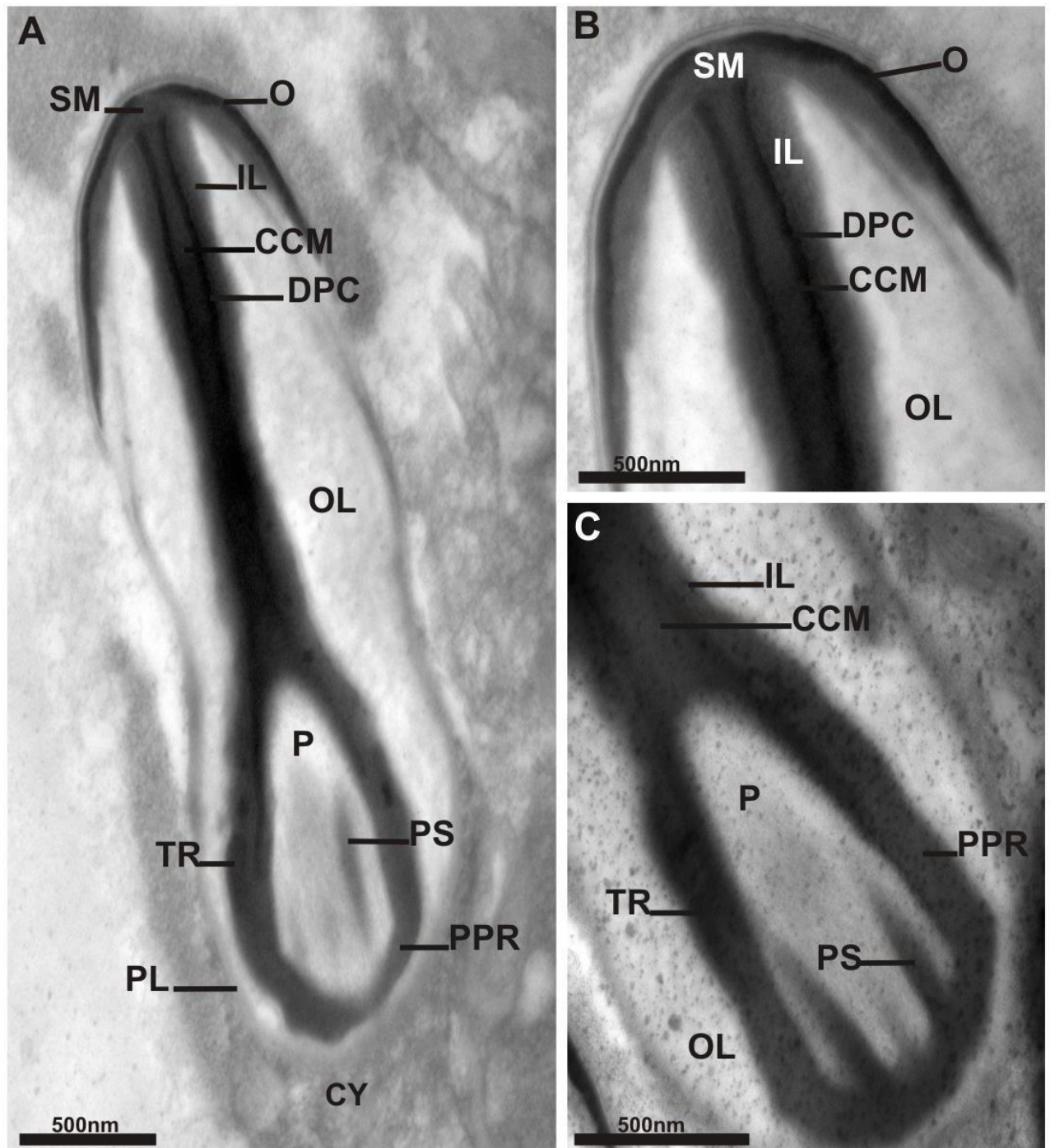


Figura 12. Cortes transversais da vesícula acrossomal de *Petrolisthes laevigatus*. **A:** Diagrama geral da vesícula acrossomal em secção longitudinal para demonstrar as alturas dos cortes transversais. Os números 1, 2, 3 e 4 representam as alturas das secções mostradas nas figuras B, C, D e E, respectivamente. **B:** em secção próxima ao ápice da vesícula acrossomal note o cone perforatorial denso, o material central do cone, a camada acrossomal interna, o material subopercular e a camada acrossomal externa. **C:** ápice da câmara perforatorial com formato circular em contato com a camada interna do acrossomo, circundada pela camada acrossomal externa, sob a camada periférica. **D:** seção na altura do anel perforatorial na zona interna. O anel tubular apresenta materiais mais eletrondensos, principalmente ao redor da câmara. Na camada externa, nota-se a lamelas concêntricas como linhas pontilhadas. **E:** Note o anel tubular na camada interna e os 10 septos perforatoriais da câmara perforatorial.

CCM: material central do cone; **DPC:** cone perforatorial denso; **IL:** camada interna; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório ; **PPR:** anel posterior do perforatório ; **PL:** camada periférica; **SM:** material subopercular.

Fig. 12

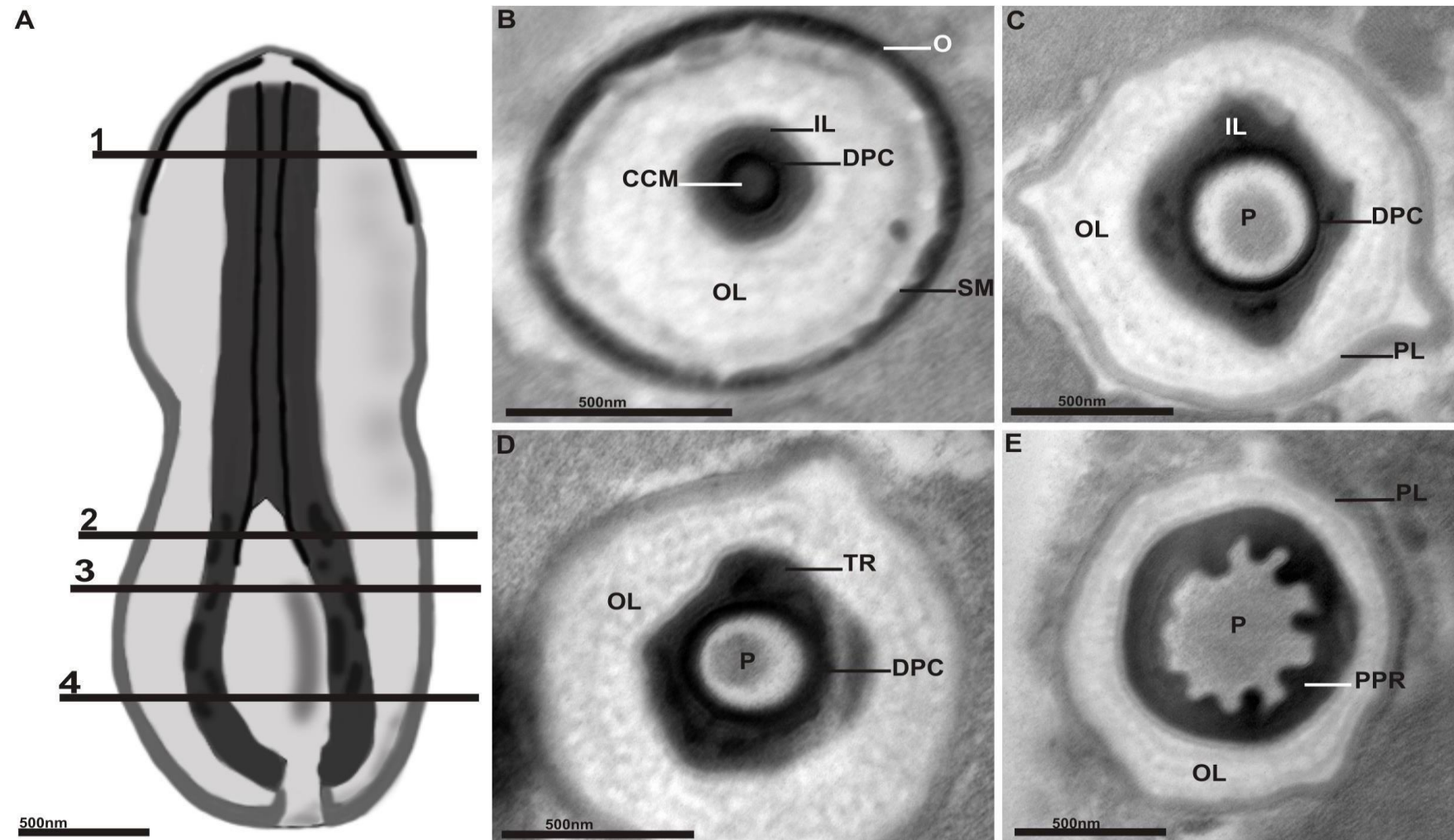


Figura 13. Espermatozoide de *Pisidia brasiliensis* em secção longitudinal. A:

Vista geral do espermatozoide com a vesícula acrossomal consideravelmente alongada e ápice ligeiramente mais largo do que a base. O material subopercular da camada interna torna-se expandido, formando o “ombro”, com a zona externa do acrossoma formada pela camada externa reticular e a delgada camada periférica invadindo a área subopercular (seta). **B:** No ápice da vesícula acrossomal observa-se o opérculo curto e espesso, perfurado centralmente, portando neste local o botão apical. Abaixo do opérculo a zona interna mostra o material subopercular que se estende lateralmente na vesícula acrossomal, formando o “ombro” típico da região anterior da vesícula acrossomal. A camada interna do acrossoma envolve todo o cone perforatorial. **C:** Detalhe da câmara perforatorial com a camada média contínua e que recobre todo o outro componente da zona interna, o anel perforatorial posterior levemente dilatado. **D:** Na base da vesícula acrossomal nota-se a zona interna sobre o anel perforatorial posterior. O citoplasma forma uma faixa estreita e com muitas membranas celulares e um material finamente granular penetra a câmara perforatorial (seta).

AB: botão apical; **CCM:** material central do cone; **CY:** citoplasma; **DPC:** cone perforatorial denso; **IL:** camada interna; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório; **PPR:** anel posterior do perforatório ; **PL:** camada periférica; **SM:** material subopercular.

Fig. 13

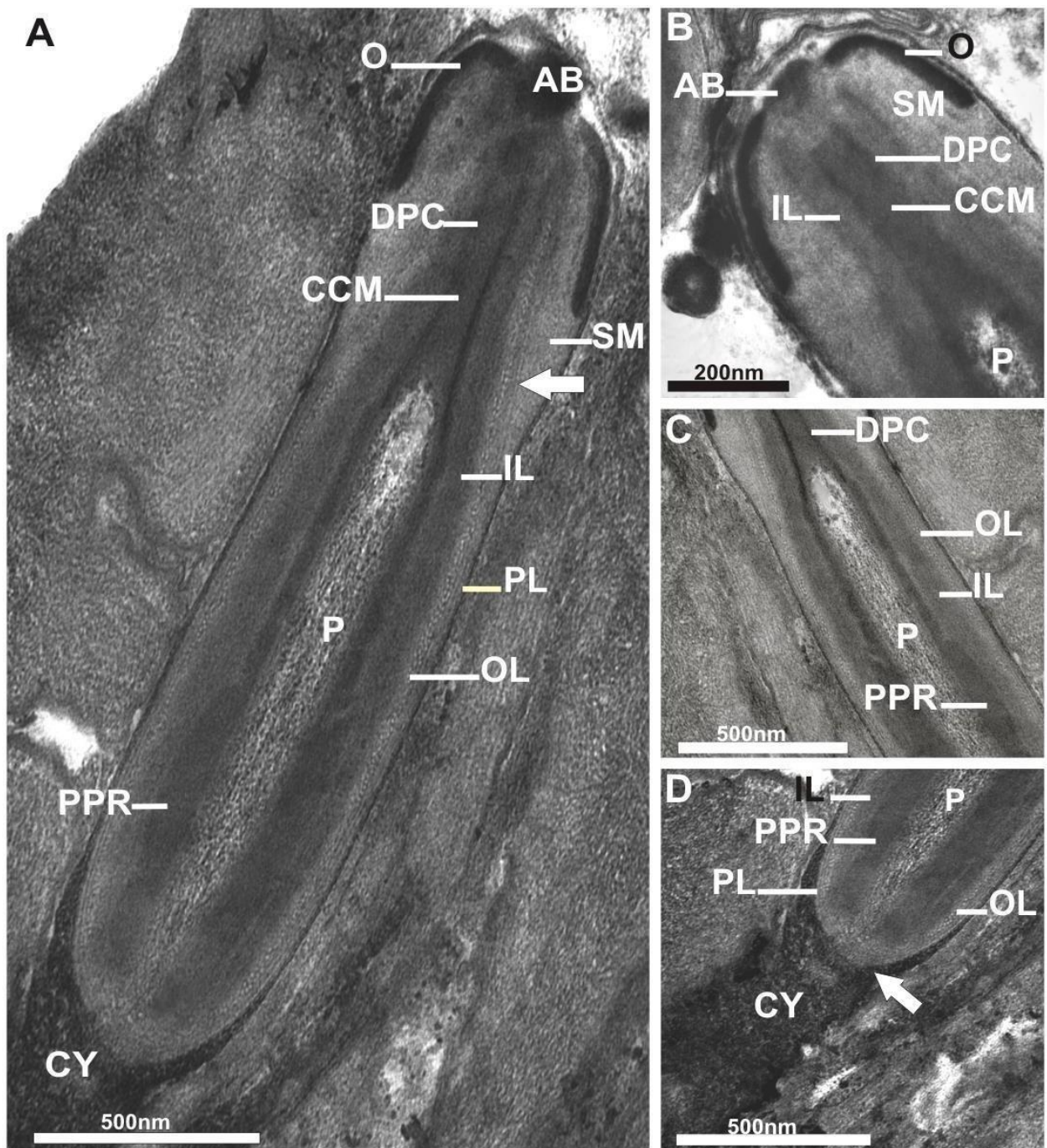


Figura 14. Cortes transversais da vesícula acrossomal de *Pisidia brasiliensis*.

A: Diagrama geral da vesícula acrossomal em secção longitudinal para demonstrar as alturas dos cortes transversais. Os números 1, 2, 3 e 4 representam as alturas das secções mostradas nas figuras B, C, D e E, respectivamente. **B:** em corte próximo ao ápice da vesícula acrossomal com o cone perforatorial posterior preenchido pelo material central, a camada acrossomal interna, o material subopercular, a zona acrossomal externa e fragmentos do opérculo. **C:** ápice da câmara perforatorial arredondada com o cone perforatorial posterior circundando a camada acrossomal interna está em contato com a zona acrossomal externa, formada pelas camadas externa e periférica delgada e eletrondensa. Uma camada adicional, o material subacrossomal do ombro envolve a zona externa. **D:** câmara perforatorial arredondada e anel perforatorial posterior eletrondenso. **E:** detalhe da base da vesícula acrossomal mostrando a parte posterior e estrita do anel perforatorial posterior, circundado pelas camadas interna, externa e periférica.

CCM: material central do cone; **DPC:** cone perforatorial denso; **IL:** camada interna; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório; **PPR:** anel posterior do perforatório; **PL:** camada periférica; **SM:** material subopercular.

Fig. 14

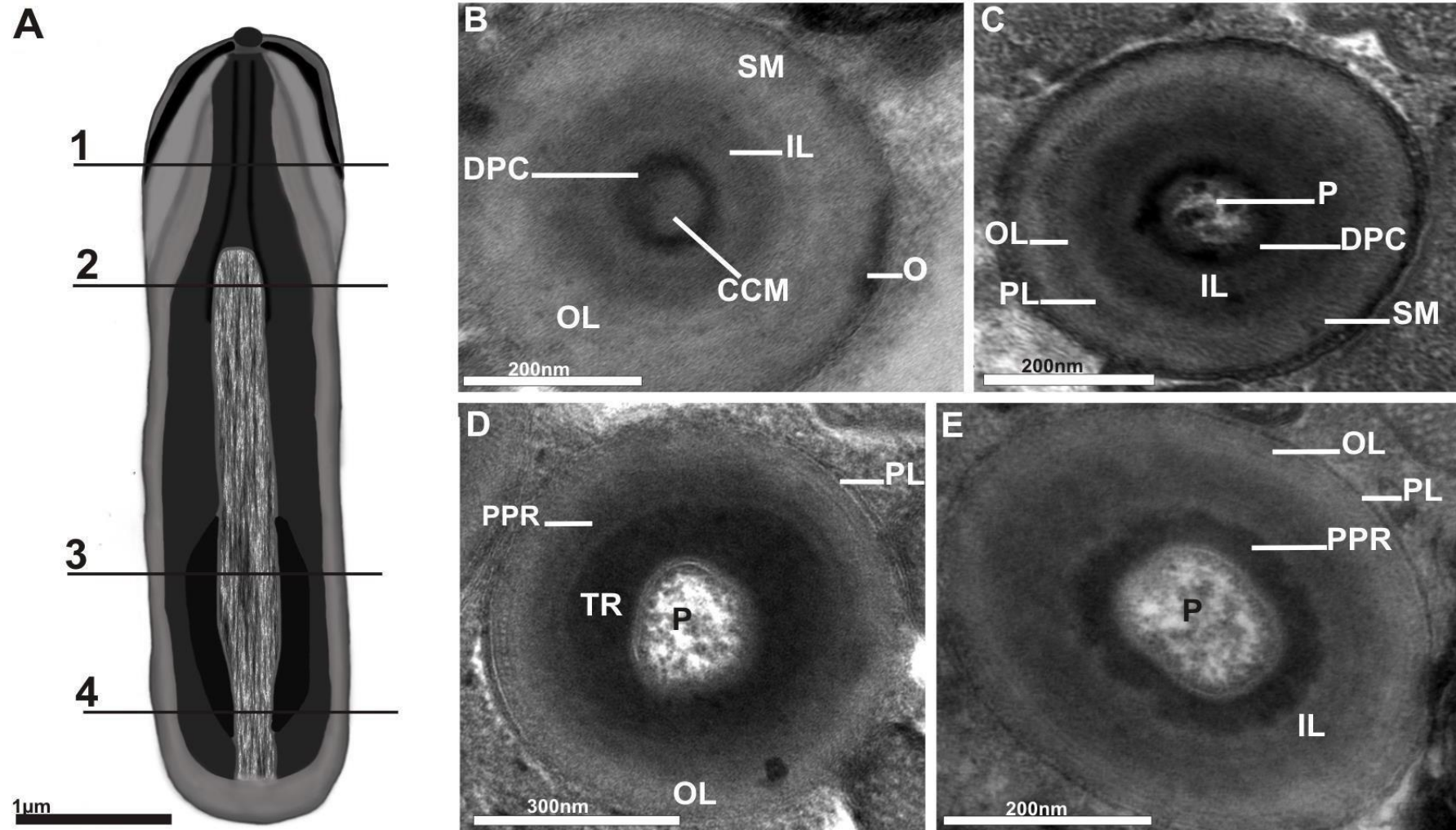


Figura 15. Espermatozoide de *Porcellana sayana* em corte longitudinal. A: vista geral do espermatozoide com morfologia elíptica com citoplasma estreito e longo preenchido por membranas celulares. Na região anterior da vesícula acrossomal nota-se opérculo curto, espesso, e perfurado centralmente. **B:** Nota-se o cone perforatorial se estendendo até a abertura do opérculo. Ao redor de toda extensão do cone perforatorial nota-se a camada interna. Estendendo-se até a região média do acrossoma, nota-se o material subopercular, que caracteriza-se pela morfologia de ombro conferida a região anterior da vesícula acrossomal. **C:** Câmara perforatorial com morfologia deltoide. Na base desta estrutura observa-se o anel perforatorial posterior, eletrondenso e levemente dilatado. **D:** Detalhe da base da vesícula acrossomal, nota-se camada externa menos eletrondensa circunda toda a camada interna do acrossoma.

CCM: material central do cone; **CY:** citoplasma; **DPC:** cone perforatorial denso; **IL:** camada interna; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório; **PPR:** anel posterior do perforatório; **PL:** camada periférica; **SM:** material subopercular.

Fig. 15

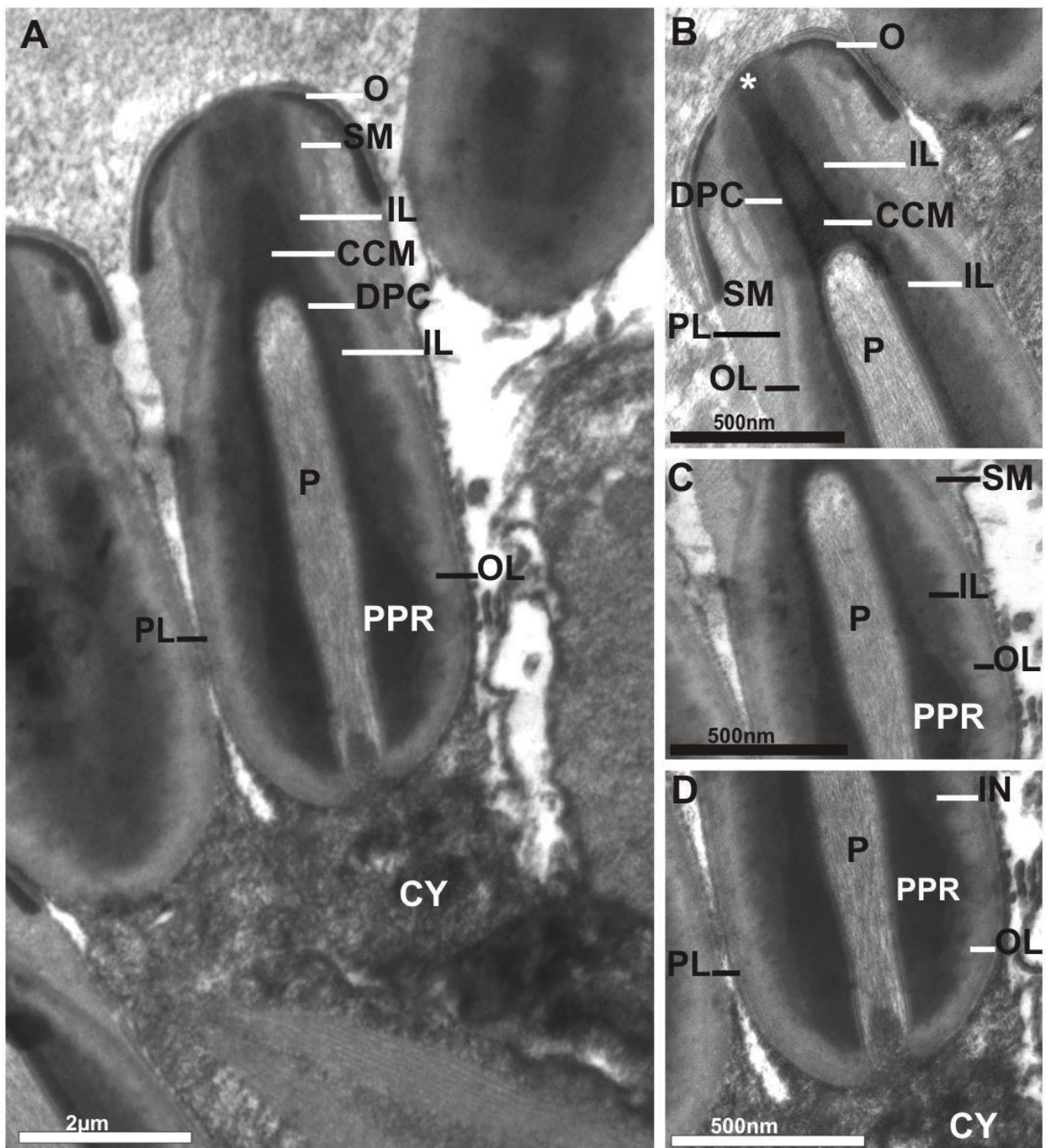


Figura 16. Cortes transversais da vesícula acrossomal de *Porcellana sayana*.

A: Diagrama geral da vesícula acrossomal em secção longitudinal para demonstrar as alturas dos cortes transversais. Os números 1, 2, 3 e 4 representam as alturas das secções mostradas nas figuras B, C, D e E, respectivamente. **B e C:** Em cortes próximos ao ápice da vesícula acrossomal, observe o cone perforatorial denso, o material central do cone, a camada acrossomal, o material subopercular, a zona acrossomal externa e o opérculo eletrondenso. **D:** Base da vesícula acrossomal com a câmara perforatorial arredondada, anel perforatorial posterior recoberto pela camada acrossomal interna e a zona externa, formada pelas camadas acrossomais externa e a delgada periférica. **E:** Próximo a base da câmara perforatorial nota-se o anel perforatorial posterior eletrondenso. Sobre o anel observa-se a camada interna contínua do polo apical ao basal da vesícula acrossomal.

CCM: material central do cone; **DPC:** cone perforatorial denso; **IL:** camada interna; **O:** opérculo; **OL:** camada externa; **P:** perforatório; **PPR:** anel posterior do perforatório; **PL:** camada periférica; **SM:** material subopercular.

Fig. 16

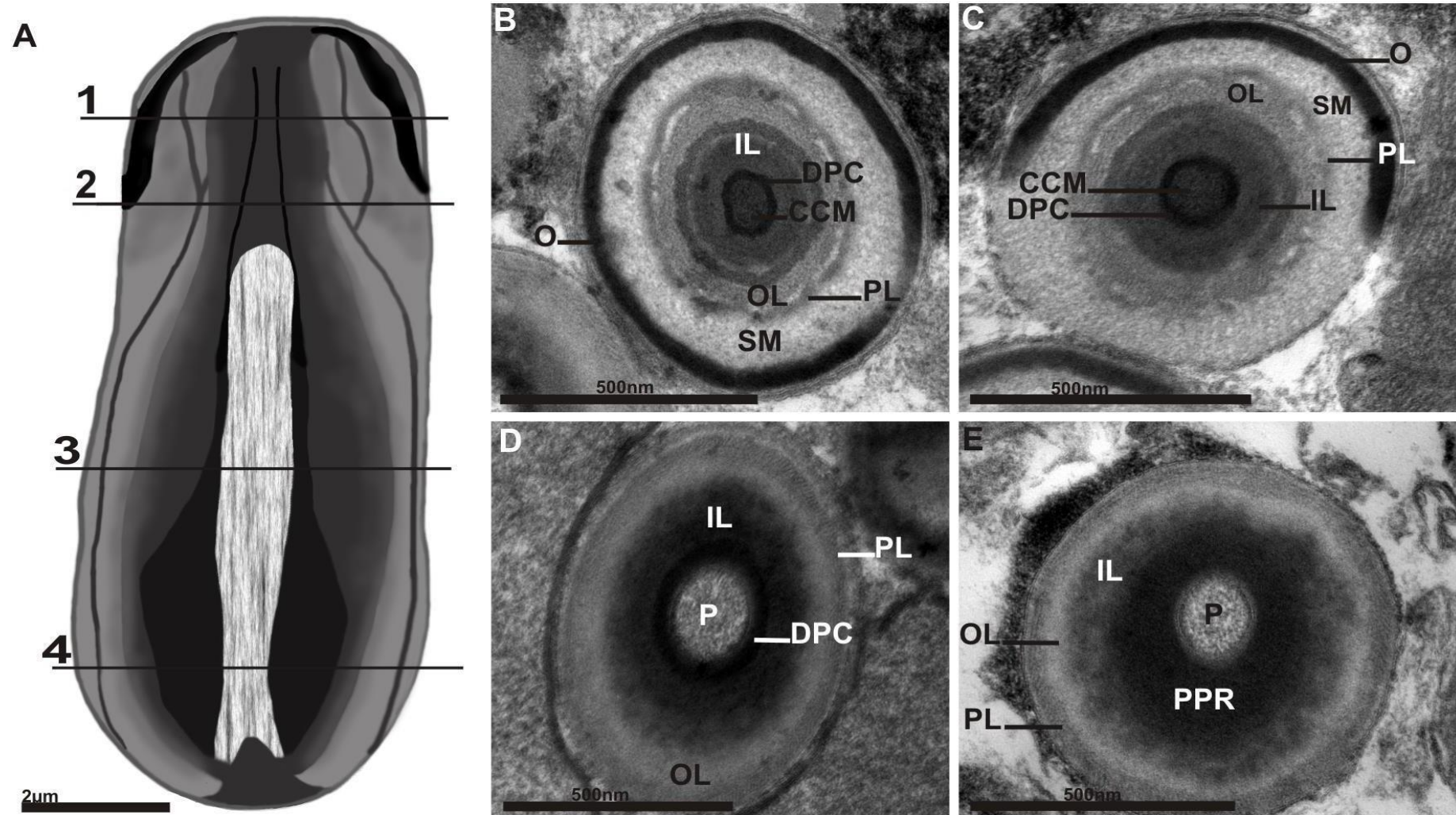


Figura 17. Filograma de Galattheoidea obtido por Máxima Verossimilhança dos genes 16s rDNA e COI mtDNA. O suporte do clado é expresso em bootstrap (0 a 100). Os clados estão representados pelas cores. A cor roxa, representa Munidopsidae, Munididae em verde, a cor laranja engloba Galatheidae, e Porcellanidae está representado na cor rosa.

Fig. 17

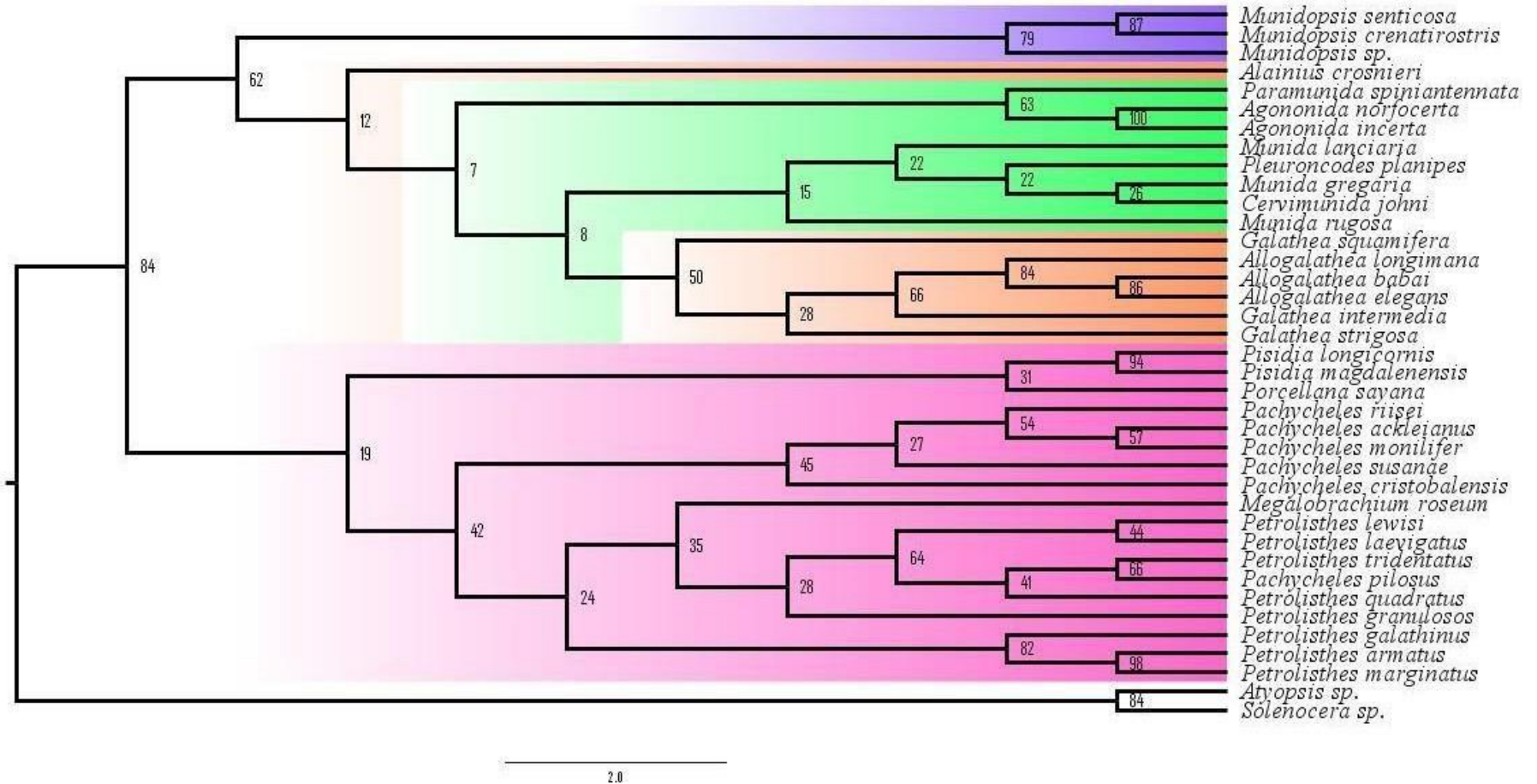


Figura 18. Mapeamento do caráter “opérculo” em Galattheoidea. A partir da reconstrução do estado ancestral, uma vez que verde está classificado como perfurado e vermelho como fechado, nota-se que a sinapomorfia de Porcellanidae é apresentar o opérculo perfurado. O opérculo fechado foi observado no clado formado em Munidopsidae, Munididae e Galatheidae.

Diagrama do espermatozoide de *Petrolisthes armatus* representando Porcellanidae e *Munida sp.* (modificado de Tudge, 1995) representando o restante dos Galattheoidea.

Fig. 18

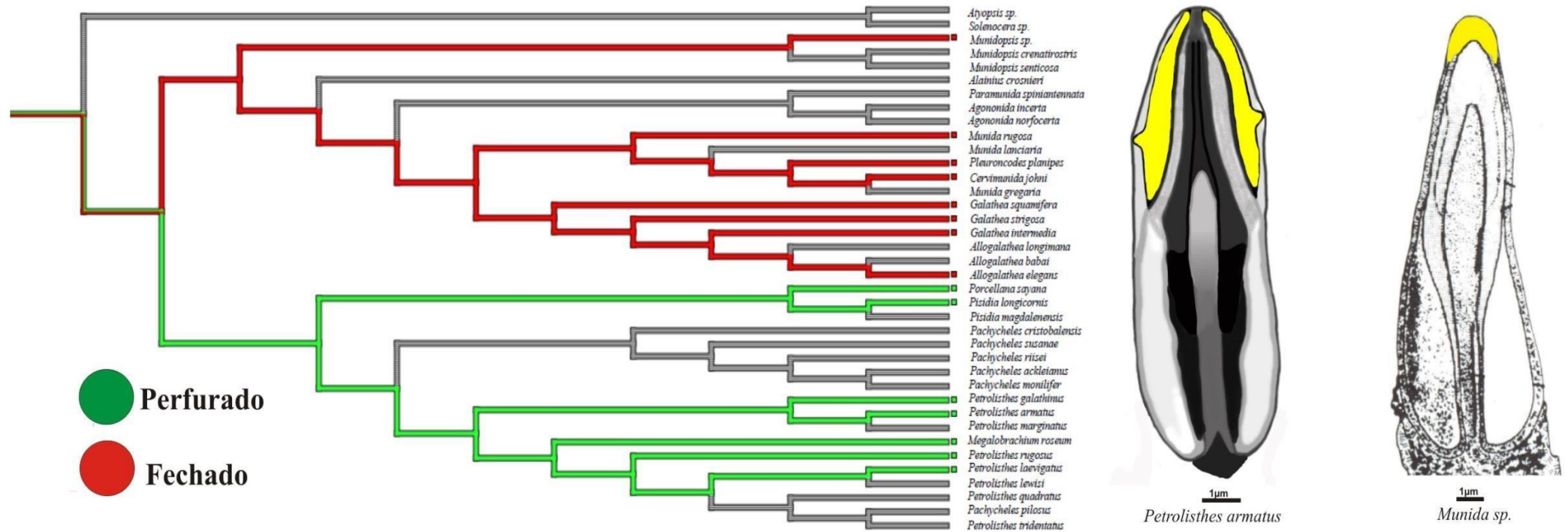
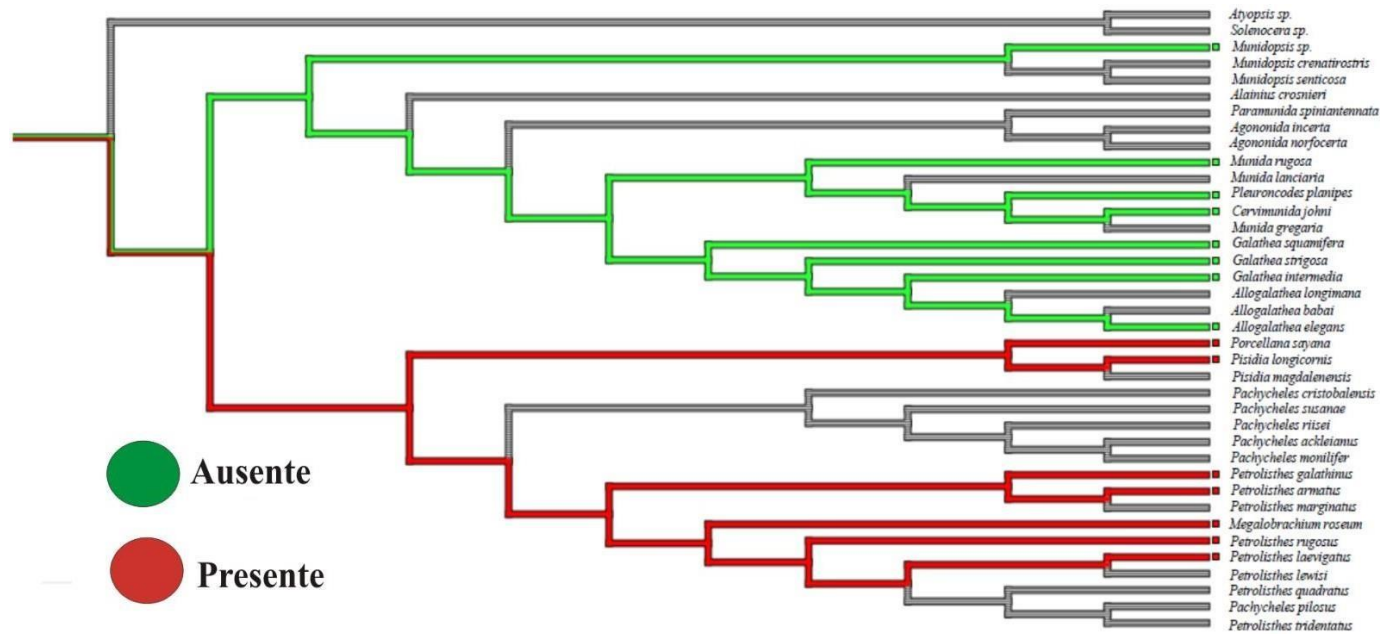


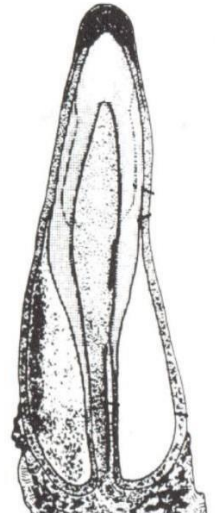
Figura 19. Mapeamento do caráter “cone perforatorial” em Galattheoidea. Nesta filogenia, com a reconstrução de estado ancestral, sendo que em verde o cone perforatorial é ausente, e em vermelho classificado como presente, nota-se que este caráter só ocorre na família, sendo uma sinapomorfia do grupo.

Diagrama do espermatozoide de *Petrolisthes armatus* representando Porcellanidae e *Munida sp.* (modificado de Tudge, 1995) representando o restante dos Galattheoidea.

Fig. 19



Petrolisthes armatus



Munida sp.

Figura 20. Mapeamento do caráter “anel posterior do perforatório” em Galattheoidea. Com a reconstrução deste caráter, sendo que, em verde este é classificado ausente, e rosa presente, nota-se que ocorre sinapomorfia em Porcellanidae devido à presença desta estrutura ocorrer apenas nesta família. Diagrama do espermatozoide de *Petrolisthes armatus* representando Porcellanidae e *Munida sp.* (modificado de Tudge, 1995) representando o restante dos Galattheoidea.

Fig. 20

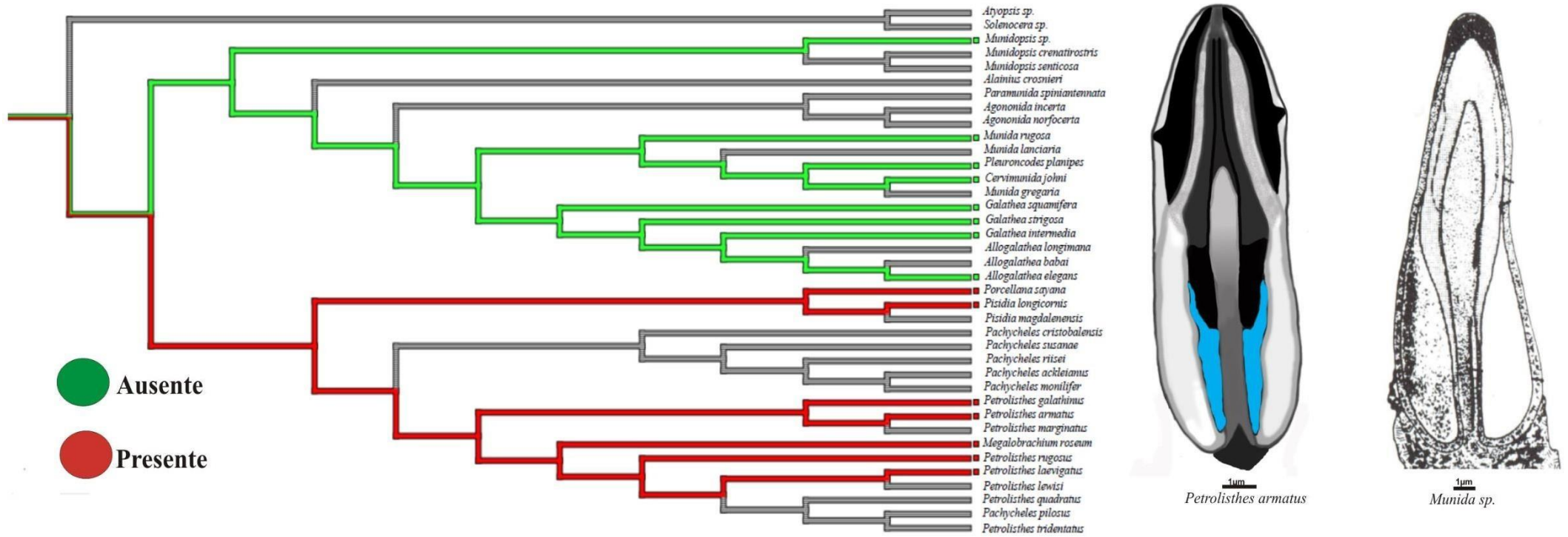
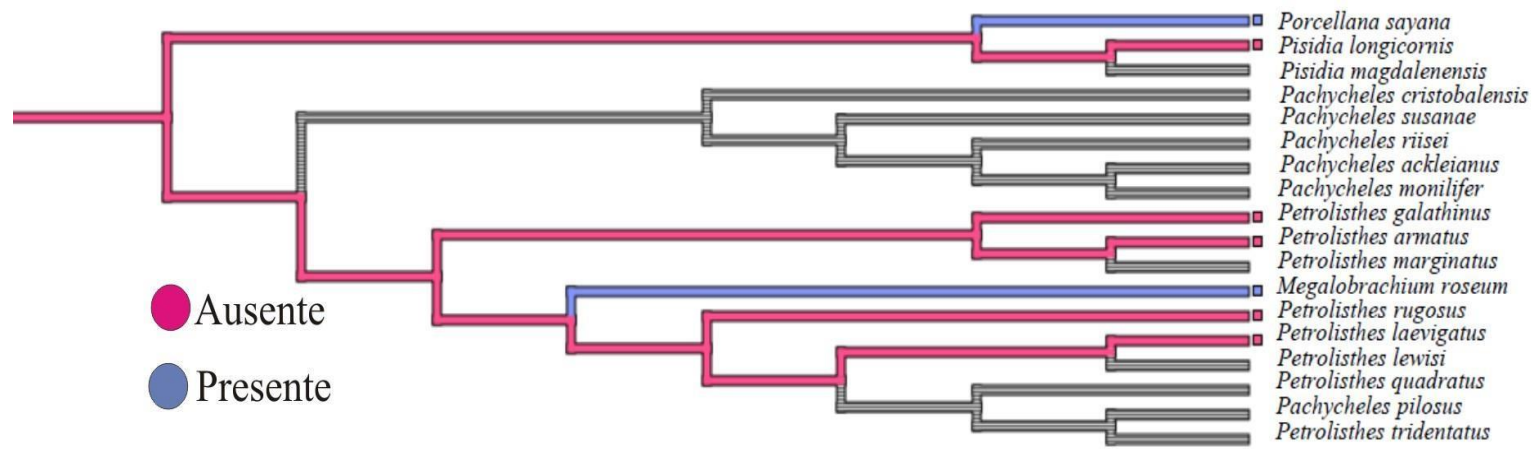


Figura 21. Mapeamento do caráter “Cone perforatorial estendendo-se até o opérculo” em Porcellanidae. Com a reconstrução do caráter, dentro do clado que engloba Porcellanidae, representando em azul a ausência e em rosa a presença, nota-se que o cone perforatorial estendido até o opérculo é uma homoplasia apenas entre os gêneros *Porcellana* e *Megalobrachium*.

Fig. 21



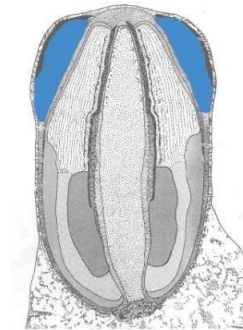
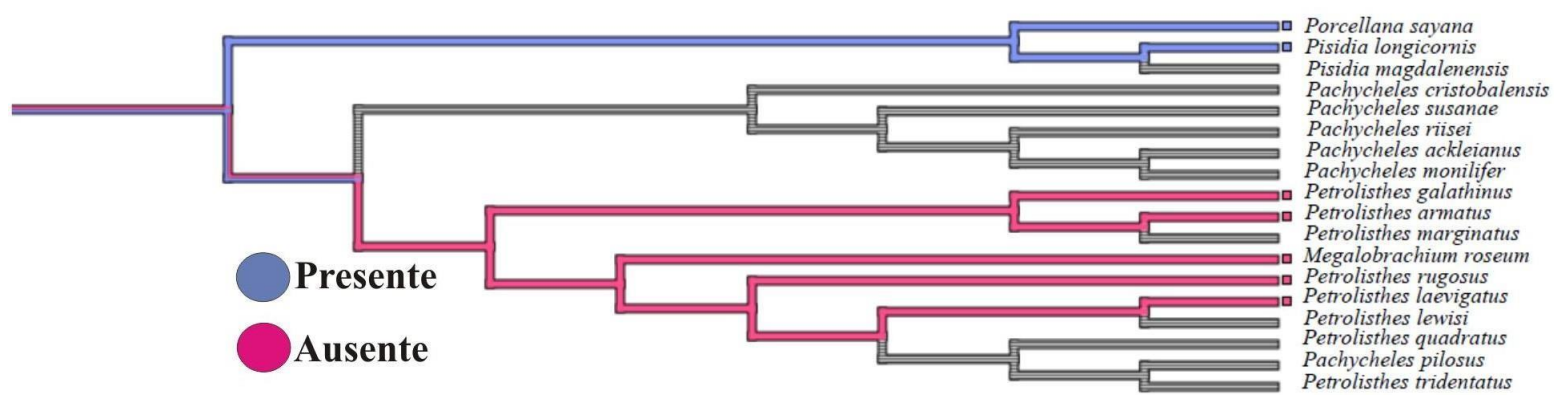
Porcellana sayana



Megalobrachium roseum

Figura 22. Mapeamento do caráter “extensão do material subopercular formando um ombro” em Porcellanidae. Neste cladograma, com a reconstrução do caráter, sendo azul ausente e rosa presente, nota-se uma característica compartilhada apenas entre os gêneros *Porcellana* e *Pisidia*. Diagrama de *Pisidia longicornis* adaptado de Tudge e Jamienson, 1996a.

Fig. 22



Pisidia longicornis

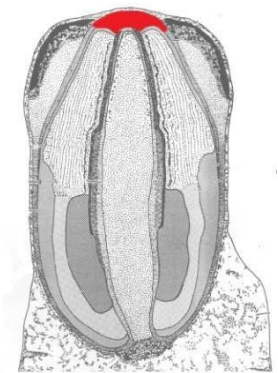
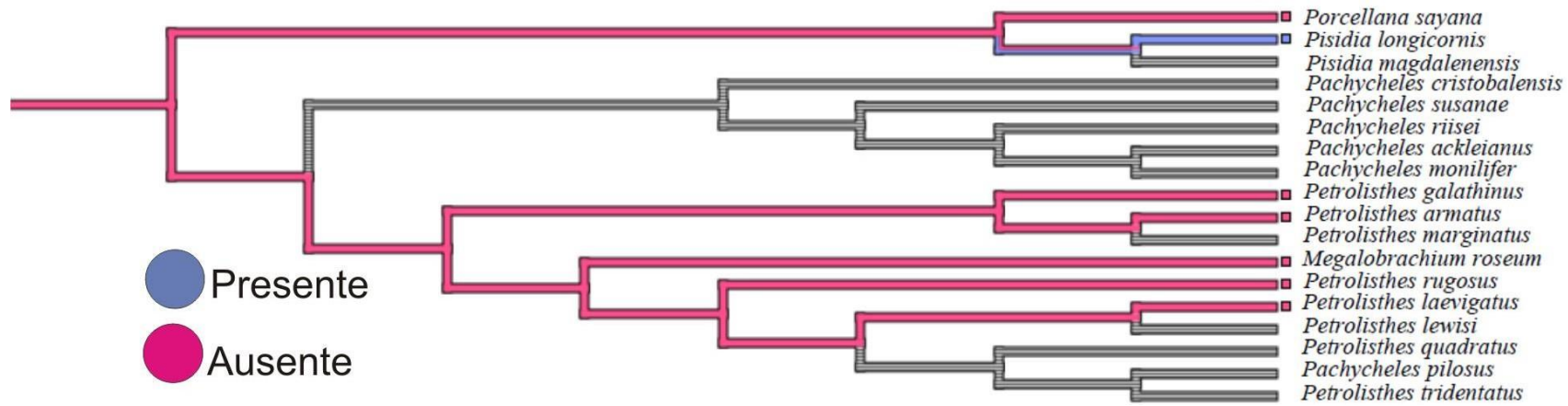


Porcellana sayana

Figura 23. Mapeamento do caráter “botão apical” em Porcellanidae. A partir da reconstrução do caráter, sendo que, azul é classificado como presente e rosa ausente. *Pisidia longicornis*, nota-se uma autopomorfia, uma vez que apenas esta espécie possui a estrutura botão apical.

Diagrama do espermatozoide de *Pisidia longicornis* modificado de Tudge e Jamieson, 1996a.

Fig. 23



Pisidia longicornis

Figura 24. Mapeamento do caráter “anel tubular” em Porcellanidae. A partir da reconstrução do caráter, sendo que, azul é classificado como ausente e rosa presente, observa-se que é uma característica exclusiva do gênero *Petrolisthes*. Diagrama do espermatozoide de *Petrolisthes armatus* representando o gênero.

Fig. 24

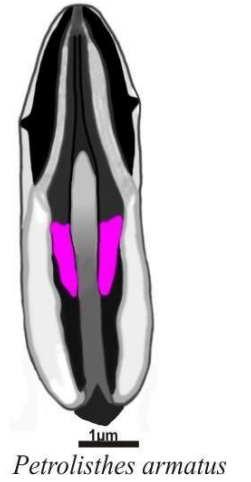
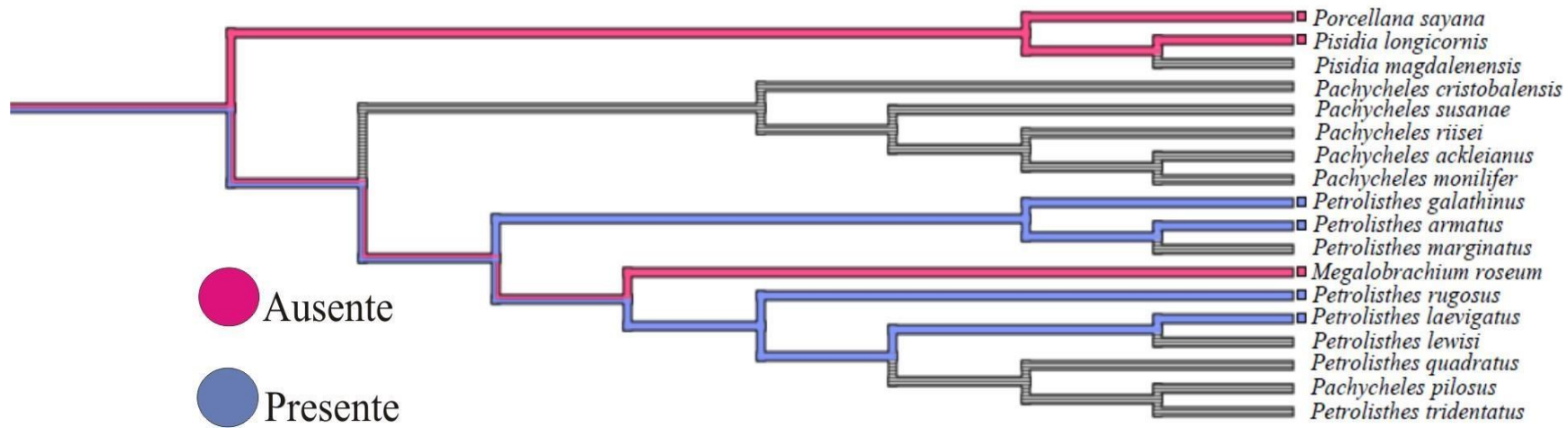


Tabela I. Código de acesso do GenBank das sequências concatenadas dos genes 16S rDNA e COI utilizadas neste estudo.

Espécie	Família	16s	COI
<i>Megalobrachium roseum</i>	Porcellanidae	HM352468.1	MF490052.1
<i>Pachycheles ackleianus</i>		DQ865332.1	x
<i>Pachycheles cristobalensis</i>		MK971626.1	MN184199.1
<i>Pachycheles pilosus</i>		DQ865329.1	MN710071.1
<i>Pachycheles riisei</i>		JF900726.1	x
<i>Pachycheles susanae</i>		DQ865334.1	x
<i>Pachycheles monilifer</i>		DQ865331.1	KC858116.1
<i>Petrolisthes armatus</i>		DQ865310.1	MF490061.1
<i>Petrolisthes galathinus</i>		DQ865303.1	MN184156.1
<i>Petrolisthes granuloso</i>		AF260613.1	x
<i>Petrolisthes laevigatus</i>		AF260606.1	x
<i>Petrolisthes lewisi</i>		DQ865317.1	x
<i>Petrolisthes marginatus</i>		DQ865309.1	x
<i>Petrolisthes quadratus</i>		DQ865318.1	x
<i>Petrolisthes tridentatus</i>		DQ865323.1	MN710065.1
<i>Pisidia longicornis</i>		FR682470.1	MG935361.1
<i>Porcellana sayana</i>	Munidopsidae	DQ865339.1	MG596256.1
<i>Munidopsis sp.</i>		KM979549.1	JN166763.1
<i>Munidopsis crenatirostris</i>		JN166743.1	JN166781.1
<i>Munidopsis senticosa</i>		MG979476.1	MG979483.1
<i>Agononida incerta</i>	Munididae	KM281833.1	KM281854.1
<i>Agononida norfocerta</i>		KM281836.1	KM281857.1
<i>Cervimunida johnei</i>		EU821546.1	AY351054.1
<i>Munida gregaria</i>		AY700158.1	AY700165.1
<i>Munida lanciaria</i>		JF727289.1	x
<i>Munida rugosa</i>		x	JQ306225.1
<i>Paramunida spiniantennata</i>		KX155560.1	x
<i>Pleuroncodes planipes</i>		KU985130.1	x
<i>Alainius crosnieri</i>		AY351239.1	AY351051.1
<i>Allogalathea babai</i>		GU392163.1	GU392206.1
<i>Allogalathea elegans</i>	Galatheididae	EU821543.1	GU392204.1
<i>Allogalathea longimana</i>		GU392159.1	GU392201.1
<i>Galathea intermedia</i>		x	MG935178.1
<i>Galathea squamifera</i>		MG596260.1	x
<i>Galathea strigosa</i>		MK049304.1	x
Outergroup			
<i>Atyopsis sp.</i>	Atyidae	EU868634.1	x
<i>Solenocera sp.</i>	Solenoceridae	KF182583.1	x

Discussão

Atualmente, estudos que associam a ultraestrutura do espermatozoide com dados moleculares tem se mostrado importantes para a resolução de empasses taxonômicos e relações filogenéticas em crustáceos decápodes (Jamieson, 1994; Tudge, 1995, 1996a, b, 1997c, 2009; Camargo et al., 2016, 2017; Assugeni et al., 2017, Garcia Bento et al., 2019). Para Porcellanidae, não haviam trabalhos suficientes sobre a ultraestrutura dos espermatozoides que permitissem a relação entre estas duas ferramentas, as quais poderiam auxiliar na resolução de problemas e relações de parentesco e reconstrução de caracteres ancestrais, permitindo estudar a evolução dos espermatozoides entre as espécies e famílias dentro de Porcellanidae.

De acordo com a filogenia, a partir de infêrencia bayesiana proposta por Bracken-Grissom et al. (2013) a infraordem Anomura pode ser dividida em dois grandes clados. O primeiro clado é formado por Lithodoidea, Paguroidea, Galatheoidea, Chirostyloidea, Lomisoidea e Aegloidea. O segundo clado, é formado pela super família Hippoidea (Bracken-Grissom et al., 2013). O primeiro clado ainda pode ser dividido em dois grandes grupos. O primeiro é composto pelas superfamílias Galatheoidea, Chirostyloidea, Lomisoidea e Aegloidea. O segundo clado, sendo grupo irmão do anterior é formado por Paguroidea e Lithodoidea (Bracken-Grissom et al., 2013). Por sua vez, a família Porcellanidae pertence a super família Galatheoidea juntamente com Munididae, Galatheidae, Munidopsidae, formando um clado monofilético. Dentro de Galatheoidea ocorre a formação de dois clados (Bracken-Grissom et al., 2013). A família Porcellanidae constitui um clado sendo um grupo monofilético. As famílias Galatheidae, Munidopsidae e Munididae constituem o outro clado, sendo que, Munidopsidae representa um grupo monofilético e as famílias Galatheidae e Munididae, apresentaram-se como parafiléticas.

Na filogenia produzida neste trabalho, dois clados foram claramente formados em Porcellanidae. No primeiro clado com *Porcellana* e *Pisidia*, os espermatozoides aqui estudados de *Porcellana sayana* e *Pisidia brasiliensis*, bem como de *Pisidia longicornis* descrita em literatura (Tudge e Jamieson, 1996a), apresentam o material subopercular se estendendo até a região média da câmara perforatorial dando aspecto de ombro, sendo uma sinapomorfia deste grupo. Este mesmo clado com a presença a mais do gênero *Polyonyx* é observado na filogenia de Bracken-Grissom et al. (2013), o que vai de acordo com a ultraestrutura do

espermatozoide descrita para a espécie *Polyonyx transversus* (Tudge e Jamienson, 1996b), uma vez que, esta espécie também apresenta o aspecto de “ombro”. A espécie *Aliaporcellana sulensis* (Tudge e Jamienson 1996a) também possui esse aspecto ombro, acreditamos que ela pertença ao mesmo clado, corroborando com a filogenia existente para a família (Bracken-Grissom et al., 2013). Ainda dentro do primeiro clado da família Porcellanidae, ocorre uma autapomorfia para o gênero *Pisidia*. As espécies *Pisidia brasiliensis* e *Pisidia longicornis* (Tudge e Jamienson, 1996a) apresentam na região da perfuração opercular uma estrutura denominada botão apical. Esta estrutura não foi observada em nenhum outro gênero da família. O segundo clado de Porcellanidae, pode ser dividido em dois grupos, sendo um formado pelas espécies do gênero *Pachycheles*, e o outro clado formado por *Megalobrachium* e *Petrolisthes*. No primeiro clado, ultraestruturalmente o espermatozoide de *Pachycheles* é desconhecido, por isso não será discutido. No segundo clado, o gênero *Petrolisthes* apresenta uma característica exclusiva, a presença de um anel tubular, esta estrutura foi encontrada aqui para *Petrolisthes armatus*, *Petrolisthes galathinus*, *Petrolisthes laevigatus* e *Petrolisthes granulatus*, e também para *Petrolisthes armatus* e *Petrolisthes lamarckii* (Tudge e Jamienson, 1996b). A espécie *Megalobrachium roseum* aqui estudada apresentou uma característica compartilhada com *Porcellana sayana*, na vesícula acrossomal, o cone perforatorial se estende até o opérculo perfurado sendo uma sinapomorfia dos gêneros *Porcellana* e *Megalobrachium*. Embora estas espécies são de clados distintos dentro de Porcellanidae, elas estão proximamente relacionadas corroborando com a filogenia deste trabalho e de Anomura (Bracken-Grissom et al., 2013).

Em geral, os espermatozoides dos Galatheaidea aqui estudados da família Porcellanidae e os disponíveis na literatura como *Munidopsis sp.* Whiteaves, 1874, *Munida sp.* Leach, 1820, *Pleurocondes planipes*, *Cervimunida johni*, *Galathea intermedia*, *Galathea squamifera*, *Galathea strigosa* e *Allogalathea elegans* são caracterizados por apresentarem uma vesícula acrossomal alongada dividida em zona interna e externa, que se liga ao núcleo por uma delgado citoplasma (Koltzoff, 1906; Retzius, 1909; Hinsch, 1991; Jamieson, 1991b; Tudge, 1995a,b; Lohrmann e Rainieri, 1995; Tudge e Jamienson, 2000). As espécies *Munida sp.*, *Galathea intermedia*, *Galathea squamifera*, *Galathea strigosa* e *Allogalathea elegans* apresentam septos na parede posterior da câmara perforatorial, característica

compartilhada com o gênero *Petrolisthes* em Porcellanidae (material suplementar, tabela 1 e 2). Por sua vez, os espermatozoides de Porcellanidae se diferem das demais famílias de Galattheoidea por apresentarem os principais caracteres: vesícula acrossomal com opérculo centralmente perfurado, cone perforatorial eletrondenso e o anel perforatorial posterior, eletrondenso, alongado e levemente dilatado, localizado próximo à base da câmara perforatorial (Tudge, 1996 a, b). Estas características corroboram com a filogênia proposta neste trabalho e de Bracken- Grissom et al., (2013) uma vez que estas espécies estão próximas filogeneticamente.

A superfamília Chirostyloidea tem poucos trabalhos abordando a ultraestrutural dos espermatozoides, sendo conhecidos apenas na família Eumunidae pela espécie *Eumunida sternomaculata* de Saint Laurent & Macpherson, 1990 e na família Chirostylidae a espécie *Uroptychus* sp. Henderson, 1888 (Tudge, 1995). Os espermatozoides de Chirostyloidea compartilham mais semelhanças com os caranguejos eremitas do que com qualquer outro Galattheoidea. Estas semelhanças são referentes particularmente na forma da vesícula acrossomal e na presença de zonas acrossomais raiadas (Jamieson e Tudge, 2000). Diferente dos espermatozóides do gênero *Petrolisthes* de Porcellanidae, o Chirostyloidea investigados não apresentam septos na parede posterior da câmara perforatorial (Tudge, 1995).

Quando comparamos a morfologia dos espermatozoides de espécies pertencentes a superfamília Lomisoidea, representado por *Lomis hirta* (Lamarck, 1818), as características diferem muito em relação aos Porcellanidae. De acordo com Tudge (1995), o espermatozoide de *Lomis hirta* é irregular e sua vesícula acrossomal mostra-se totalmente incorporada no citoplasma, sendo seu formato considerado com forma semelhante a um “copo invertido”, em Porcellanidae a vesícula acrossomal tem apenas a porção posterior em contato com o citoplasma. Adicionalmente, o opérculo eletrondenso é descontínuo, circundando toda a vesícula acrossomal e não apenas o polo apical como visto em Galattheoidea (Tudge, 1995; Tudge e Jamienson 1996 a,b, 2000). Estas características justificam o fato da família Lomisoidea na filogenia representar um grupo primitivo. Os espermatozoides descrito para o gênero *Aegla* são muito similares aos de Lomisoidea, uma vez que também possuem o acrossoma totalmente envolto pelo citoplasma e a morfologia da vesícula acrossomal é irregular, mostrando que estas

espécies são proximamente relacionadas filogeneticamente (Tudge e Jamienson, 2000; Tudge, 2003; Bracken-Grissom et al., 2013).

Em relação aos representantes que formam o segundo grande clado de Anomura proposto na filogenia de Bracken-Grissom et al. (2003), quando comparamos os espermatozoides do Lithodidae *Lithodes maja* (Linnaeus, 1758) com os Porcellanidae aqui estudados e os da literatura, nota-se que estes se assemelham pela presença do opérculo perfurado, e dos braços microtubulares em número maior que três (Tudge, 1998). Diferenças foram notadas, quando comparamos Porcellanidae com Lithodidae, o citoplasma engloba apenas a região posterior da câmara perforatorial, enquanto em *Li. maja*, o citoplasma envolve a vesícula acrossomal até a região mediana. Outra diferença notória, é que nas espécies de Porcellanidae o núcleo aparece abaixo do citoplasma, enquanto em Lithodidae, o núcleo envolve a vesícula acrossomal e o citoplasma (Tudge, 1998).

Os espermatozoides da família Paguridae representada pelas espécies *Pagurus chevreuxi* (Bouvier, 1896), *Pagurus bernhardus* (Linnaeus, 1758), *Pagurus excavatus* (Herbst, 1791), *Pagurus hirtimanus* (Miers, 1880), *Pagurus prideaux* Leach, 1815, *Solitariopagurus tuerkayi* McLaughlin, 1997 e *Xylopagurus caledonicus* Forest, 1997 tem o seu acrossoma totalmente ou metade envolvido pelo citoplasma. Apresentam também uma zona acrossomal raiada, nenhuma dessas características foi observada nas espécies aqui estudadas (Tudge, 1995, 1997c). Por outro lado, *Pagurus hirtimanus* e *Pagurus chevreuxi* compartilham a característica de presença do septo na região posterior da vesícula acrossomal com o gênero *Petrolisthes*. (Tudge, 1997c, 1995). Com poucas características ultraestruturais compartilhadas este grupo encontra-se mais distante filogeneticamente de Porcellanidae, o que vai de encontro com a filogenia proposta por Bracken-Grissom et al., (2013).

Em Diogenidae nota-se que os indivíduos deste último grupo apresentam grande variedade de características espermáticas entre espécies. No geral os espermatozoides de Diogenidae se assemelham aos dos Porcellanidae em relação a porção em que o acrossoma é envelopado pelo citoplasma, sendo em ambas as famílias, apenas na região posterior (Tudge, 1995; Jamieson e Tudge, 2000; Tirelli et al., 2006, 2008, 2010). Segundo Tudge (1995) os espermatozóides do gênero *Calcinus* Dana, 1851 são formados por uma vesícula acrossomal classificada como esférica, com um opérculo não perfurado centralmente localizado na sua porção

anterior. Além disso, este mesmo autor descreve a presença de uma autopomorfia para o gênero, a qual é caracterizada pela presença da câmara perforatorial em sua extremidade anterior dividida, dando aspecto de “dedos”, separando-os assim dos outros Anomura estudados até o momento (Tudge, 1995; Tudge e Jamienson, 2000; Tirelli et al., 2006). Ainda em relação aos Diogenidae, o gênero *Cancellus* H. Milne Edwards, 1836 se assemelha aos Porcellanidae, por apresentarem no ápice da vesícula acrossomal um opérculo perfurado, sendo característica exclusiva deste gênero quando comparado a outros Diogenidae (Tudge, 1995). Nas espécies pertencentes ao gênero *Clibanarius*, foi observado a presença de uma estrutura em torno do bulbo perfuratório posterior nomeada de anel perforatorial denso (Tudge, 1995; Tudge e Jamienson, 2000; Santos e Mantelatto, 2011). Esta estrutura, é similar ao anel perforatorial posterior encontrado em Porcellanidae, o que inferimos ser uma estrutura homóloga porém com nome distintos. Os espermatozoides do gênero *Dardanus* Paulson, 1875 são semelhantes aos espermatozoides dos representantes de Coenobitidae, porém não compartilham nenhuma característica com Porcellanidae (Tudge, 1995; Jamieson e Tudge, 2000). No gênero *Diogenes* Dana, 1851 os espermatozoides também não são similares aos Porcellanidae, e se diferenciam dos outros Anomura por possuir uma região central fibrilar no acrossoma, mostrando ser uma modificação da camada interna (Tudge, 1995; Tirelli et al., 2008; Buranelli et al., 2014). A presença de opérculo perfurado e presença do anel perforatorial posterior, mostram ser caracteres que aproximam a família Diogenidae e Porcellanidae, como observado na filogenia de Bracken-Grissom et al., (2013).

Em relação à comparação entre espécies da família Coenobitidae, representadas neste trabalho por *Coenobita brevimanus* Dana, 1852 e *Coenobita rugosus* H. Milne Edwards, 1837, a presença da vesícula acrossomal alongada observada nos porcelanídeos também é característica em indivíduos deste grupo. Entretanto, os Coenobitidae apresentam zonas acrossomais raiadas o que aproxima esta família de Diogenidae. (Tudge, 1995; Tudge e Jamienson, 2000; Buranelli et al., 2014).

Os espermatozoides da família Parapaguridae, representados por *Sympagurus* sp. Smith, 1883 compartilham características importantes com os Paguridae sendo, a presença de uma zona reticulada na vesícula acrossomal e falta de projeções microvilares na câmara perforatorial (Tudge, 1995 a, b). A longa

vesícula acrossomal observada em *Sympagurus sp.* os separa dos representantes dos membros dos Paguridae e os aproxima de Porcellanidae. Porém, os Parapaguridae se diferem principalmente por apresentarem uma vesícula acrossomal mais simples que Porcellanidae (Tudge, 1995).

Por fim, o último clado observado na infraordem Anomura é formado pela superfamília Hippoidea (Bracken-Grisson et al., 2013). Embora seus representantes como *Hippa pacifica* (Dana, 1852), apresentem algumas características ultraestruturais dos espermatozoides iguais a observadas em outros Anomura como, braços microtubulares e a estrutura da vesícula do acrossomal, é difícil associá-las a qualquer outra superfamília. (Tudge, 1995; Jamieson e Tudge, 2000). *Hippa pacifica* destaca-se por uma diferença marcante, sendo a presença de septo membranoso que divide longitudinalmente a câmara perforatorial encontrada, sendo característica somente observada em espécies pertencentes à esta superfamília entre todos os Anomura estudados. Este clado é o mais externo e basal dentre os Anomura, o que corrobora com a filogenia proposta por Bracken-Grisson et al., (2013).

Em conclusão, apresentamos, pela primeira vez, a descrição comparativa da ultraestrutura dos espermatozoides de alguns membros da família Porcellanidae, comparando aos demais Anomura. Dentro de Porcellanidae o clado formado por *Pisidia* e *Porcellana* (*Pisidia brasiliensis* e *Porcellana sayana*) foi separado dos outros gêneros pela presença de “ombro” na região apical do acrossoma, formado pelo material subopercular, que se estende até a região média. A ausência do botão apical é um carácter ancestral da família, sendo a sua presença uma autapomorfia para *Pisidia*. *Porcellana sayana* e *Megalobrachium roseum* possuem o cone perforatorial se estendendo até a abertura opercular. *Petrolisthes*, tem como característica exclusiva a estrutura pela primeira descrita como anel tubular, eletrondenso. A ultraestrutura dos espermatozoides de Porcellanidae quando comparado a outros Anomuras mostra-se como ferramenta importante para estudos filogenéticos e, com os dados disponíveis, corroborou para a filogenia beysiana de Bracken-Grisson et al., (20013) e pode-se presumir que o espermatozoide do ancestral Porcellanidae apresentava: 1) opérculo centralmente perfurado, 2) sem botão apical, 3) com cone perforatorial, e 4) anel perforatorial na base do acrossoma. O restante dos caracteres da vesícula acrossomal excêntrica, com camadas concêntricas e câmara perforatorial são características

compartilhadas com os Galattheoidea e outros Anomura.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pelo programa de Pós-graduação em Aquicultura concedido a BPC. FJZ agradece a CAPES Ciências do Mar CIMAR II # 1989/2014 e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, JP #2005 04707-5 e Biota “Intercrusta” #2018/13685-5) pelo auxílio financeiro ao Laboratório de Morfologia de Invertebrados, FCAV – UNESP. Agradecimento são devidos ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP, FCAV, Campus Jaboticabal e ao suporte técnico de Márcia F. Mataqueiro e Dra. Claudia Fiorillo. Este estudo foi conduzido de acordo com as leis brasileiras (Licença Permanente FJZ - MMA SisBio # 34587-2).

Referências:

- Assugeni, C. D. O., Magalhães, T., Bolaños, J. A., Tudge, C. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. (2017). Ultrastructure of spermatozoa of spider crabs, family Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura): Integrative analyses based on morphological and molecular data. *Journal of morphology*, 278, 1628- 1646.
- Bracken-Grissom, H. D., Cannon, M. E., Cabezas, P., Feldmann, R. M., Schweitzer, C. E., Ah Yong, S. T., Felder, D. L., Lemaitre, R., Crandall, K. A. (2013). A comprehensive and integrative reconstruction of evolutionary history for Anomura (Crustacea: Decapoda). *BMC Evolutionary Biology*, 13, 128.
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. (2016). Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology*, 135, 67-81.
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., Zara, F. J. (2017). Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod Structure & Development*. 46, 588 - 600.
- Fantucci, M. Z., Mantelatto, F. L. M. (2011) . Male reproductive apparatus and spermatophore morphology of the hermit crabs *Pagurus brevidactylus* and *P. criniticornis* (Anomura, Paguridae). *Journal of Morphology*. 272, 1271-1280.
- Garcia Bento, M. A., Greco, L. S. L., Zara, F. J. (2019). Seminal fluid production and sperm packaging in dromiid crabs (Brachyura, Podotremata). *Zoology*, 132, 17-30.
- Glez-Peña, D., Gomez-Blanco, D., Reboiro-Jato, M., Fdez-Riverola, F., Posada, D. (2010). ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research*, 38:14-18.
- Guindon, S., Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696-704.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95- 98.
- Jamieson, B. G. M. (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, B. G. M., Tudge, C. C. (2000). Progress in male gamete ultrastructure and phylogeny, part C in: Adiyodi, K.G., and Adiyodi, R.G. (eds), *Reproductive biology of invertebrates*. 9, 1-95.
- Jemieson, B. G. M. (1991b). Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. *Memoirs of the Queensland Museum*, 31, 109-142.
- Koltzoff, N. K. (1906). Studien über die Gestalt der zelle. I Untersuchungen über die spermien der decapoden, als einleitung in das problem der zellengestalt. *Archivfür Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 67, 364-572.
- Lohrmann, K., Rainieri, M. (1995). Ultrastructure of the spermatozoon of the crab *Cervimunida johni* Porter, 1903 (Galatheidae, Anomura, Crustacea). *Invertebrate Reproduction and Development*. 28, 71-76.
- Maddison, W. P., Maddison, D. R. (2015). Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. Encontrado em: <http://mesquiteproject.org>.
- Mantelatto, F. L., Miranda, I. (2016). Avaliação do caranguejo porcelanídeo *Minyocerus angustus* (Dana, 1852) (Decapoda: Porcellanidae). *Livro vermelho dos crustáceos do Brasil: avaliação 2010-2014*.
- McLaughlin, P. A. (1983). Hermit Crabs - Are They Really Polyphyletic? *Journal of Crustacean Biology*, 3, 608-621.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1-8.
- Rambaut, A., Drummond, A. J. (2009). FigTree version 1.3. 1. Website <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Retzius, G. (1909). Die spermien der Crustaceen. *Biologische Untersuchungen*, 14, 1-54.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference undermixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Santos, N. M., Mantelatto, F. L. (2011). Reproductive system of the male hermit crab *Clibanarius sclopetarius*: gonopore, spermatophore, and spermatozoal morphologies. *Aquatic Biology*, 12, 271-280.
- Scholtz, G., Richter, S. (1995). Phylogenetic systematics of the reptantian Decapoda (Crustacea, Malacostraca). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 113, 289- 328.

- Stamatakis, A. (2014). RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* 10.1093/bioinformatics/btu033 <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/214/01/21/bioinformatics.btu033.abstract>.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Symposium Series*, 22, 4673-4680.
- Tirelli, T., Campantico, E., Pessani, D., Tudge, C. C. (2006). Description of the male reproductive apparatus of the hermit crab *Calcinus tubularis* (Decapoda: Anomura: Diogenidae). *Crustacean Research*, 6, 13-21.
- Tirelli, T., Pessani, D., Silvestro, D., Tudge, C. (2008). Reproductive biology of Mediterranean hermit crabs: fine structure of spermatophores and spermatozoa of *Diogenes pugilator* (Decapoda: Anomura) and its bearing on a sperm phylogeny of Diogenidae. *Journal of Crustacean Biology*, 28, 534-542.
- Tirelli, T., Silvestro, D., Pessani, D., Tudge, C. C. (2010). Description of the male reproductive system of *Paguristes eremita* (Anomura, Diogenidae) and its placement in a phylogeny of diogenid species based on spermatozoal and spermatophore ultrastructure. *Zoologischer Anzeiger*. 4, 299-312.
- Tudge, C. C. (1995). Ultrastructure and phylogeny of the spermatozoa of the Infraorders Thalassinidea and Anomura (Decapoda, Crustacea). *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle. Serie A, Zoologie*, 166, 251-263.
- Tudge, C. C. (1997c). Phylogeny of the Anomura (Decapoda, Crustacea): Spermatozoa and spermatophore morphological evidence. *Contributions to Zoology*, 67, 125- 141.
- Tudge, C. C. (2009). Sperm morphology and its bearing on decapod phylogeny. In: Martin, J. W., Crandall K. A., Felder, D. L. (Eds) Decapod crustacean phylogenetics. *Crustacean issues* 18. Taylor and Francis/CRC Press.
- Tudge, C. C., Jamieson, B. G. M. (1996a). Spermatophore and spermatozoal morphology in the Porcellanidae. I. *Aliaporcellana suluensis* and *Pisidia longicornis* (Decapoda: Anomura: Porcellanidae). *Crustacean Research*, 25, 73–85.
- Tudge, C. C., Jamieson, B. G. M. (1996b). Spermatophore and spermatozoal

- morphology in the Porcellanidae. II. The genera *Petrolisthes* and *Polyonyx* (Decapoda: Anomura). *Journal of Crustacean Biology*, 16, 535-546.
- Tudge, C. C., Scheltinga, D. M. (2002). Spermatozoal morphology of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* Bond-Buckup & Buckup, 1994 (Crustacea Decapoda: Aeglidae) from South America. *Proceedings of The Biological Society of Washington*. 1, 118-128.
- Veloso, V. G., Buckup, L., Bond-Buckup, G. (1999). Família Porcellanidae (caranguejos anomuros marinhos). *Os crustáceos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 504, 398-405.
- Veloso, V. G., Melo, G. A. S. (1993). Taxonomia e distribuição da família Porcellanidae (Crustacea: Decapoda: Anomura) no litoral brasileiro. *Iheringia, Série Zoologia*, 75, 171-186.

Material Complementar

Tabela 1. Características citoplasmáticas e acrossomais nos espermatozoides de Anomura

Species	Acrosome morphology	Inner acrosome layer	Outer acrosome layer	Proportion of the acrosome that the citoplasm envelops	Origin of microtubular arms	Number of microtubular arms
<i>Birgus latro</i> (Tudge & Jamieson, 1991)	Oblong/Ovoid (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P Finely granular	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Coenobita brevimanus</i> (Tudge, 1995a)	Cylindrical (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/granular	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Coenobita perlatus</i> (Tudge, 1995a)	Cylindrical (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/granular	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Coenobita purpureus</i> (Tudge, 1995a)	Cylindrical (Oblong in Gregarine Forms of Clopton(2004))	P/granular	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Coenobita rugosus</i> (Tudge, 1995a)	Cylindrical (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/granular	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Coenobita variabilis</i> (Tudge, 1995a)	Cylindrical (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/granular	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Calcinus gaimardii</i> (Tudge, 1995a)	Spherical (Broadly ovoid in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/granular	P/finely granular	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Calcinus laevimanus</i> (Tudge, 1991; 1995a)	Spherical (Broadly ovoid in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/granular	P/finely granular	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Calcinus minutus</i> (Tudge, 1991; 1995a)	Spherical (Broadly ovoid in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/granular	P/finely granular	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Cancellus sp.</i> (Tudge, 1995a, b)	Cylindrical (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P/Ray	Half	Cytoplasmic	Three
<i>Clibanarius corallinus</i> (Tudge, 1995a, b)	Ovoid	P/fibrous	P	All	Cytoplasmic	Three
<i>Clibanarius erythropus</i> (Tudge, 1995a, b)	Ovoid	P/fibrous	P	All	Cytoplasmic	Three
<i>Clibanarius longitarsus</i> (Tudge, 1995a, b)	Ovoid	P/fibrous	P	All	Cytoplasmic	Three
<i>Clibanarius taeniatus</i> (Tudge, 1995a, b)	Ovoid	P/fibrous	P	All	Cytoplasmic	Three
<i>Clibanarius virescens</i> (Tudge, 1995a, b)	Ovoid	P/fibrous	P	All	Cytoplasmic	Three
<i>Dardanus arrosor</i> (Tudge, 1995a)	Ovoid (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Dardanus crassimanus</i> (Tudge, 1995a)	Ovoid (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Dardanus lagopodes</i> (Tudge, 1995a)	Ovoid (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Dardanus scutellatus</i> (Tudge, 1995a)	Ovoid (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Dardanus sp. nov.</i> (Tudge, 1995a)	Ovoid (Oblong in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Diogenes custos</i> (Tudge, 1992, 1995a)	Elipsoid	P/homogeneous	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Diogenes pallescens</i> (Tudge, 1995a, b)	Elipsoid	P/homogeneous	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Strigopagurus boreonotus</i> (Tudge, 1995a)	Spherical (Broadly ovoid in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P/finely granular	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Pylocheles sp.</i> (Tudge et al., 2001)	Disk-shape (Luniform in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/granular with vesicles	P	All	Cytoplasmic	Three

<i>Pagurus bernhardus</i> (Tudge, 1995a)	Ovoid	P/homogeneous	P	All	Cytoplasmic	Three
<i>Pagurus chevreuxi</i> (Tudge, 1995a, b)	Ovoid	P/homogeneous	P	All	Cytoplasmic	Three
<i>Pagurus hirtimanus</i> (Tudge, 1991, 1995a)	Ovoid (Obovoid in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P	All	Cytoplasmic	Three
<i>Pagurus prideaux</i> (Tudge, 1995a)	Ovoid	P/homogeneous	P	Half	Cytoplasmic	Three
<i>Porcellanopagurus sp.</i> (Tudge, 1995a,b)	Eliptoid	P/homogeneous	P	All	Cytoplasmic	Three
<i>Xylopagurus sp. nov.</i> (Tudge, 1995a, b)	Cylindrical (Ovoid in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Sympagurus sp.</i> (Tudge, 1995a, b)	Eliptoid	P/homogeneous	P	All	Cytoplasmic	Three
<i>Lomis hirta</i> (Tudge, 1995a, b)	Ring-shaped (Luniform very deeply in Gregarine Forms of Clopton (2004))	P/finely granular	P/granular	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Eumunida sternomaculata</i> (Tudge, 1995a, b)	Cylindrical (Eliptoid in Gregarine forms of Clopton (2004))	P/finely granular	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Uroptychus sp.</i> (Tudge, 1995a)	Cylindrical (Eliptoid in Gregarine forms of Clopton (2004))	P/finely granular	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Allogalatea elegans</i> (Tudge, 1995a)	Cylindrical (Eliptoid in Gregarine forms of Clopton (2004))	P/finely granular	P/Ray	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Munida sp.</i> (Tudge, 1995a, b)	Cylindrical (Eliptoid in Gregarine forms of Clopton (2004))	P/finely granular	P	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Galathea intermedia</i> (Kronenberg et al., 2004)	Oblong and fusiform (Eliptoid in Gregarine forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P/homogeneous	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Munidopsis sp.</i> (Tudge, 1995a)	Ovoid (Obpanduriform in Gregarine forms of Clopton (2004))	P/homogeneous	P	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Aliaporcellana suluensis</i> (Tudge & Jamieson, 1996)	Ovoid	P/granular	P/granular	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Porcellana sayana</i> (In this study)	Eliptoid (Clopton, 2004)	P/granular	P/homogeneous	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Petrolisthes armatus</i> (In this study)	Eliptoid (Clopton, 2004)	P/granular	P/granular	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Petrolisthes lamarckii</i> (Tudge & Jamieson, 1996)	Ovoid (Eliptoid in Gregarine forms of Clopton (2004))	P/granular	P/granular	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Petrolisthes galactinus</i> (In this study)	Eliptoid (Clopton, 2004)	P/granular	P/granular	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Petrolisthes granulatus</i> (In this study)	Eliptoid (Clopton, 2004)	P/granular	P/granular	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Megalobrachium roseum</i> (In this study)	Eliptoid (Clopton, 2004)	P/granular	P/granular	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Petrolisthes laevigatus</i> (In this study)	Eliptoid (Clopton, 2004)	P/granular	P/granular	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Pisidia longicornis</i> (Tudge & Jamieson, 1996)	Ovoid (Eliptoid in Gregarine forms of Clopton (2004))	P/granular	P/homogeneous	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Pisidia brasiliensis</i> (In this study)	Eliptoid (Clopton, 2004)	P/granular	P/granular	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Polyonyx transversus</i> (Tudge & Jamieson, 1996)	Cylindrical (Eliptoid in Gregarine forms of Clopton (2004))	P	P	Posterior portion	Cytoplasmic	More than 3
<i>Hippa pacifica</i> (Matthews, 1956; Tudge, 1995a,b)	Ovoid	P/finely granular	P/homogeneous	Posterior portion	Cytoplasmic	Three
<i>Lithodes maja</i> (Tudge et al., 1998)	Ovoid	P/homogeneous	P/homogeneous	Posterior portion	Cytoplasmic	Three

Tabela 2. Caracteres referentes ao espermatozoides de Anomura

Species	Perforated operculum	Operculum morphology	Opercular ridge	Apical bottom	Dense perforatorial cone	Central cone material	Tubular ring	Posterior perforatorial ring	Perforatorial chamber morphology (Clopton, 2004)	Microvillar projections	Ornamentation of Perforatorial chamber	Perforatorial chamber contentes	Fibrilar acrosome core	Reticulated acrosome zones	Lacunar sheath	Microtubular core	Sholder in apical region
<i>Birgus latro</i> (Tudge & Jamieson, 1991)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Oblong with rounded apex	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Coenobita brevimanus</i> (Tudge, 1995a)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Oblong with rounded apex	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Coenobita perlatus</i> (Tudge, 1995a)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Oblong with rounded apex	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Coenobita purpureus</i> (Tudge, 1995a)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Oblong with rounded apex	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Coenobita rugosus</i> (Tudge, 1995a)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Oblong with rounded apex	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Coenobita variabilis</i> (Tudge, 1995a)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Oblong with rounded apex	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Calcinus goimardii</i> (Tudge, 1995a)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Hand format*	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Calcinus laevimanus</i> (Tudge, 1991; 1995a)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Hand format*	Short and tuberculous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Calcinus minutus</i> (Tudge, 1991; 1995a)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Hand format*	Short and tuberculous	Smooth walls	Prominent tubules	A	A	A	A	A
<i>Cancellus</i> sp. (Tudge, 1995a, b)	A	Slender and rounded	A	A	A	A	A	A	Deltoid	A	Smooth walls	Prominent tubules	A	A	A	A	A
<i>Clibanarius corallinus</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Deltoid	Short and tuberculous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Clibanarius erythropus</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Deltoid	Short and tuberculous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Clibanarius longitarsus</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Deltoid	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Clibanarius taeniatus</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Deltoid	Short and tuberculous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Clibanarius virescens</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Deltoid	Short and tuberculous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Dardanus arrosor</i> (Tudge, 1995a)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Eliptoid	Short and tuberculous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Dardanus crassimanus</i> (Tudge, 1995a)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Eliptoid	Short and tuberculous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Dardanus lagopodes</i> (Tudge, 1995a)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Eliptoid	Short and tuberculous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A

<i>Dardanus scutellatus</i> (Tudge, 1995a)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Eliptoid	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Dardanus sp. nov.</i> (Tudge, 1995a)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Eliptoid	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Diogenes custos</i> (Tudge, 1992, 1995a)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Deltoid (gladiate)	Long and filamentous	Smooth walls	A	P	A	A	A	A
<i>Diogenes pallescens</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Deltoid (gladiate)	Long and filamentous	Smooth walls	A	P	A	A	A	A
<i>Strigopagurus boreanotus</i> (Tudge, 1995a)	A	Slender and domed	A	A	A	A	A	A	Hand format*	Long and filamentous	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Pylocheles sp.</i> (Tudge et al., 2001)	A	Slender and trullate	A	A	A	A	A	A	Panduriform	A	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Pagurus bernhardus</i> (Tudge, 1995a)	A	Slender and trullate	A	A	A	A	A	A	Panduriform	A	ow longitudinal corruga	A	A	P	A	A	A
<i>Pagurus chevreuxi</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Slender and trullate	A	A	A	A	A	A	Panduriform	A	Proeminent septa	A	A	P	A	A	A
<i>Pagurus hirtimanus</i> (Tudge, 1991, 1995a)	A	Slender and trullate	A	A	A	A	A	A	Panduriform	A	Proeminent septa	A	A	P	A	A	A
<i>Pagurus prideaux</i> (Tudge, 1995a)	A	Slender and trullate	A	A	A	A	A	A	Deltoid	A	Smooth walls	A	A	P	A	A	A
<i>Porcellanopagurus sp.</i> (Tudge, 1995a,b)	A	Slender and trullate	A	A	A	A	A	A	Deltoid	A	Proeminent septa	A	A	A	P	A	A
<i>Xylopagurus sp. nov.</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Slender and trullate	A	A	A	A	A	A	Short perforatorial chamber/Deeply delt	A	Smooth walls	A	A	P	A	A	A
<i>Sympagurus sp.</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Slender and trullate	A	A	A	A	A	A	Pyriform	A	Smooth walls	A	A	P	A	A	A
<i>Lomis hirta</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Eliptoid	A	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Eumunida sternomaculata</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Eliptoid	A	Smooth walls	Prominent tubules	A	A	A	A	A
<i>Urotychus sp.</i> (Tudge, 1995a)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Eliptoid	A	Smooth walls	A	A	A	A	A	A
<i>Allogalatea elegans</i> (Tudge, 1995a)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Romboid very narrowly	A	Proeminent septa	A	A	A	A	A	A
<i>Munida sp.</i> (Tudge, 1995a, b)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Romboid very narrowly	A	Proeminent septa	A	A	A	A	A	A
<i>Galathea intermedia</i> (Kronenberg et al., 2004)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Eliptoid	A	Smooth walls	Prominent septum	A	A	A	A	A
<i>Munidopsis sp.</i> (Tudge, 1995a)	A	Thick and domed	A	A	A	A	A	A	Eliptoid	A	Smooth walls	Prominent septum	A	A	A	A	A

