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

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

CAMILA DE OLIVEIRA ASSUGENI

**Rio Claro - SP
2024**

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

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

CAMILA DE OLIVEIRA ASSUGENI

Orientador: Fernando José Zara

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

**Rio Claro - SP
2024**

A851c Assugeni, Camila de Oliveira
Caracterização do sistema reprodutor masculino e feminino em Portunoidea sob um contexto evolutivo: existem padrões de produção, transferência e armazenamento do fluido seminal? / Camila de Oliveira Assugeni. -- Rio Claro, 2024
205 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Fernando José Zara

1. Biologia reprodutiva. 2. Sistemática filogenética. 3. Brachyura. 4. Sistema reprodutor masculino. 5. Sistema reprodutor feminino. I. Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: CAMILA DE OLIVEIRA ASSUGENI

ORIENTADOR: FERNANDO JOSÉ ZARA

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

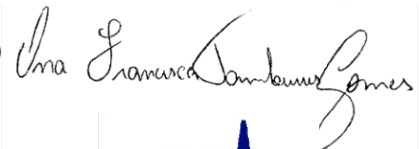
Prof.Dr. FERNANDO JOSÉ ZARA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / UNESP Jaboticabal



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



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



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



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



Rio Claro, 03 de outubro de 2022

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

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

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

Abstract

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

Keywords: Portunidae, reproductive system, seminal receptacle, sperm

Sumário

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

1. Introdução da tese e revisão da literatura

1.1 Contextualização do grupo de estudo

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

1.2 Sistema reprodutor masculino

De uma maneira geral, o sistema reprodutor em *Brachyura* é um órgão bilateral em forma de letra “H”, constituído pelo par de testículos, localizado em ambas às margens superiores do cefalotórax, os quais são contínuos aos vasa deferentia, estendendo-se longitudinalmente sobre o hepatopâncreas, abaixo do coração, terminando na região posterior do corpo (Krol et al., 1992; López-Greco, 2013, Mclay & Becker, 2015). Segundo Nagao & Munehara (2003), o testículo pode ser classificado como do tipo lobular ou tubular. O tipo lobular é constituído por vários lóbulos com células no mesmo estágio de maturação, nos quais são conectados por um ducto seminífero central, sendo o padrão mais comum aos caranguejos (Johnson, 1980; Diesel, 1989; Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2009; Zara et al., 2012). Por sua vez, o tipo tubular é constituído por um túbulo único e convoluto, preenchido em seu interior por células germinativas em diferentes estágios sequenciais de maturação (Chiba & Honma, 1972; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1999; Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2010). Estas células caracterizam os diferentes estágios da espermatogênese e espermiogênese. As espermatogônias são caracterizadas por apresentar grande diâmetro nuclear e são localizadas nos centros germinativos, ocupando a região mais periférica dos túbulos seminíferos (Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2009). Os espermátides são encontrados na região mais intermediária dos túbulos seminíferos, conhecida por zona de maturação ou transformação (Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2010). A zona de evacuação é constituída pelo tubo coletor, nos quais armazenam e carregam espermatozoides maduros através dos ductos seminíferos em direção ao vaso deferente (Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2009). De maneira geral, o vaso deferente em *Brachyura* é dividido em três diferentes regiões, tais como: a anterior (AVD), responsável pela formação dos espermatóforos e as regiões média (MVD) e posterior (PVD), as quais produzem grandes quantidades de secreções e armazenam os espermatóforos até a cópula (Simeó et al., 2009; Nicolau et al., 2012; Zara et al., 2012; Mclay & Becker, 2015). Em algumas espécies, a MVD e PVD podem exibir bolsas laterais, glândulas acessórias, expansões laterais, divertículos ou cecos, como observado em alguns representantes de *Portunoidea* Rafinesque, 1815, *Majoidea* Samouelle, 1819, *Grapsoidea* e *Ocypodoidea* (Johnson, 1980; Jivoff et al., 2007; Castilho et al., 2008; Simeó et al., 2009; Zara et al., 2012; Tiseo et al., 2014; Antunes et al., 2016, 2018). Tais estruturas produzem grandes quantidades de secreções que podem ser adicionadas ao fluido seminal no vaso deferente ou são expansões do vaso, responsáveis pelo aumento de fluido seminal, como ocorrem nos siris azuis (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013).

1.3 Sistema reprodutor feminino

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

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

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

1.4 Ultraestrutura dos espermatozoides

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

1.5 Filogenia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Referências

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

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

- Jamieson, B. G. M., 1994. Phylogeny of the Brachyura with Particular Reference to the Podotremata: Evidence from a Review of Spermatozoal Ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 345, 373-393.
- Jamieson, B. G. M.; Guinot, D.; Forges, B. R., 1995. Phylogeny of the Brachyura (Crustacea, Decapoda): evidence from spermatozoal ultrastructure. In: Jamieson, B. G. M., Ausio, J., & Justine, J.-L. (eds), *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. Muséum National d' Histoire Naturelle, 166, 265-283.
- Jamieson, B.G.M.; Tudge, C. C., 2000. Crustacea-Decapoda. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.), *Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny*, 1-95.
- Jayasankar, V.; Subramoniam, T., 1997. Proteolytic activity in the seminal plasma of the mud crab, *Scylla serrata* (Forsk.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, B. 116, 347-352.
- Jayasankar, V & Subramoniam, T., 1999. Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236, 253-259.
- Jeyalectumie, C.; Subramoniam, T., 1987. Biochemical composition of seminal secretions with special reference to LDH activity in the reproductive tissues of the field crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Experimental Biology*, 46, 231-236
- Jeyalectumie, C & Subramoniam, T., 1991. Biochemistry of seminal secretions of the crab *Scylla serrata* with reference to sperm metabolism and storage in the female. 1991. *Molecular Reproduction and Development*, 30, 44-55
- Jivoff, P.; Hines, A. H.; Quackenbush, L. C., 2007. Reproductive Biology and Embryonic Development, 255-286. In: Cronin, L. E.; Kennedy, V. S. (eds.), *The Blue Crab *Callinectes sapidus**. Maryland Sea Grant College.
- Johnson, P.T., 1980. *Histology of the blue crab *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda*. Praeger, New York. 440.
- Karasawa, H., Schweitzer, C.E., Feldmann, R.M., 2008. Revision of Portunoidea Rafinesque, 1815 (Decapoda: Brachyura) with emphasis on the fossil genera and families. *Journal of Crustacean Biology*, 28, 82-127.
- Klaus, S.; Schubart, C. D.; Brandis, D., 2009. Ultrastructure of Spermatozoa and spermatophores of old world Freshwater Crabs (Brachyura: Potamoidea: Gecarcinucidae, Potamidae, and Potamonautidae). *Journal of Morphology*, 270, 175-193.
- Koch, M., Spiridonov, V.A., Ďuris, Z., 2022. Revision of the generic system for the swimming crab subfamily Portuninae (Decapoda: Brachyura: Portunidae) based on molecular and morphological analyses. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1-49.
- Krol, R. M.; Hawkins, W. E.; Overstreet, R. M., 1992. Reproductive components, pp. 295-343. In: Harrison, F. W; Humes, A. G. (eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 10: Decapod Crustacea, Wiley-Liss Inc., New York.
- López-Greco, L. S.; Fransozo, V.; Negreiros-Fransozo, M. L.; Santos, D. C., 2009. Comparative morphology of the seminal receptacles of *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) (Brachyura, Ocypodoidea). *Zootaxa*, 2106, 41-50.
- López-Greco, L. S., 2013. Functional anatomy of the reproductive system. In: *Functional Morphology and Diversity*. Edited by Les Watling and Martin Thiel, Oxford University Press.
- Mantelatto, F.L.; Robles, R.; Schubart, C.D. & Felder, D.L., 2009. Molecular phylogeny of the Genus *Cronius* Stimpson, 1860, with reassignment of *C. tumidulus* and several American species of *Portunus*

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

- Ryan, E. P.; 1967. Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* Herbst (Brachyura: Portunidae). I. The male system. Proceedings of the Symposium on Crustacea at Erkulán, India. Part II. Symposium, Series 2, 522-544.
- Sainte-Marie, G. & B. Sainte-Marie., 1999. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). I. Observations on spermiogenesis and spermatophore formation in the vas deferens. Canadian Journal of Zoology, 77, 440-450.
- Schubart, C.D., Reuschel, S., 2009. A proposal for a new classification of Portunoidea and Cancroidea (Brachyura: Heterotremata) based on two independent molecular phylogenies. In: Martin JW, Crandall KA, Felder DL, eds. Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean issues, 18. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 533-549.
- Simeó, C. G.; Ribes, E; Rotllant, G., 2009. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). Tissue and Cell, 41, 345-361.
- Simeó, C. G.; Kurtz, K.; Chiva, M.; Ribes, E.; Rotllant, G., 2010. Spermatogenesis of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). Journal of morphology, 271, 394-406.
- Spiridonov, V.A.; Neretina, T.V.; Schepetov, D., 2014. Morphological characterization and molecular phylogeny of Portunoidea Rafinesque, 1815 (Crustacea Brachyura): implications for understanding evolution of swimming capacity and revision of the family-level classification. Zoologische Anzeiger, 253, 404-429.
- Spiridonov, V.A., 2020. An update of phylogenetic reconstructions, classification and morphological characters of extant Portunoidea Rafinesque, 1815 (Decapoda, Brachyura, Heterotremata), with a discussion of their relevance to fossil material. Geologija, 63, 133-166.
- Stephenson, W., 1972. Portunid crabs from the Indo-West-Pacific and Western America in the Zoological Museum, Copenhagen (Decapoda, Brachyura, Portunidae). Steenstrupia, 2, 127-156.
- Tiseo, G. R.; Mantelatto, F. L.; Zara, F. J., 2014. Is cleistosperry and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). Journal of Crustacean Biology, 34, 704-716.
- Tsang, L. M.; Schubart, C. D.; Ahyong, S. T.; Lai, J. C.; Au, E. Y.; Chan, T. Y.; Ng, K. L. P ; Chu, K. H., 2014. Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. Molecular biology and evolution, 31, 1173-1187.
- Tudge, C. C., 2009. Spermatozoal morphology and its bearing on decapod phylogeny. In: Martin, J.W., Crandall, K.A. & Felder, D.L. (eds), Crustacean Issues. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis/CRC Press, 101-119.
- Tudge, C.C.; Scheltinga, D.M.; Jamieson, B.G.M.; Guinot, D.; Forges, B.R., 2012. Comparative ultrastructure of the spermatozoa of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. Acta Zoologica (Stockholm), 95, 1-20.
- Watanabe, T.T.; López-Greco, L.S.; Zara, F.J., 2022. Seminal fluid and spermatophore production in a western Atlantic invasive swimming crab, *Charybdis hellerii*, reveals a different pattern to Portunoidea. Arthropod Structure & Development, 66, 1467-8039.
- Williams, A.B., 1974. The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). Fishery Bulletin, 72, 685-798.
- Williams, A.B., 1984. Shrimps, lobsters and crabs of Atlantic coast of Eastern United States, Maine to Florida. Washington, Smithsonian Institution Press, 550.

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

Capítulo 1

Evolution of spermatozoa characters in Portunoidea (Crustacea: Decapoda): Integrative analysis of morphology and its phylogenetic implications.

Abstract

The ultrastructure of spermatozoa and molecular analysis are both important and, in certain cases, decisive tools in phylogenetic implications. The objective of this study was to reconcile molecular analysis with the ultrastructure of spermatophores and spermatozoa in representatives of Portunoidea. Sequences of the 16S and COI genes were used for the phylogenetic analysis of 50 species. This phylogenetic hypothesis was reconciled with 10 ultrastructural characteres of the spermatozoa of 24 species that are representative of this superfamily, as obtained by means of transmission electron microscopy. The spermatophores proved to be a signal character to relate the species in Portunoidea and these seems to be related to the presence or not of sperm plug. In addition, species that have the ancestral type of spermatophore are also sperm plug formed. The most variable characteres of spermatozoa were the morphology of the ARY and perforatorial chamber. The morphology of the perforatorial chamber separates two lineages of *Callinectes*, the “*danae*” and “*bocourti*” groups, and validates the designation of *Achelous*. Furthermore, the spermatozoa ultrastructure also corroborates the separation of *Achelous* from *Portunus*, as well as the placement of *Cronius* in *Thalamitinae*, along with *Charybdis* and *Caphyra*. Our data also support the permanence of *Ovalipes* in *Geryonidae* and the polyphyly of Carcinidae, these two families have five concentric acrosomal layers, different from other Portunoidea. From the optimized analysis of the ultrastructural data and the molecular phylogeny of these representatives of Portunidae, it can be concluded that the morphology supports the phylogeny and the perforatorial chamber is the main character to be analyzed in futher works. This new approach of a comparison between spermatozoal traits along with molecular data in decapods reinforces the importance of the combined (or integrative) analysis for systematics at the species level.

Keywords: mitochondrial genes, phylogeny, Portunidae, sperm, spermatophore

Introduction

The Portunoidea superfamily is recognized as one of the most diverse and species-rich groups among the Brachyura, due to the large number of living and fossil specimens, as well as invasive species. Furthermore, they have a worldwide distribution, being able to occur in estuaries up to the open sea at depths of up to about 75m, with high tolerance to salinity variations (Stephenson, 1959, 1972; Hartnoll, 1971; Williams, 1984; Melo, 1996; Apel & Spiridonov, 1998).

Many species of portunoid constitute an important fishing resource in America, Europe and Japan, and may be the direct target of fisheries or integrate the bycatch of shrimp fisheries, as is the case mainly with the species of *Callinectes* Stimpson, 1860 (Melo, 1996; Mantelatto et al., 2009; Boos et al., 2010). Furthermore, in estuary regions these crabs are used as a source of income and food for the riverside population (Mantelatto et al., 2009; Boos et al., 2010).

The Portunoidea superfamily has undergone extensive revisions in its phylogenetic classification in the last century (Robles et al., 2007; Mantelatto et al., 2007, 2009; Spiridonov et al., 2014; Spiridonov, 2020; Evans, 2018). In the last classification for Brachyura proposed by Ng et al. (2008), Portunoidea was divided into only two families: Geryonidae Colosi, 1923 and Portunidae Rafinesque, 1815, which recently have been modified and the subfamilies have been elevated to family status. These analyzes were based on the external morphology of the animals (pereopods, chelipeds and lateral spines) integrated into the phylogeny of the group. Thus, Spiridonov et al. (2014) proposed that the family Geryonidae contained only the Geryoninae and the new subfamily Benthochasconinae, and elevated the subfamily Ovalipinae to the status of a family, as Ovalipidae Spiridonov, Neretina & Schepetov, 2014. The same authors maintained the classification of Carcinidae MacLeay, 1838, proposed by Karasawa et al. (2008) and Schubart & Rueschel (2009), thus comprising eight families in Portunoidea. In the most recent phylogeny proposed to the group, Portunoidea comprises three families: Geryonidae, Carcinidae and Portunidae, with seventeen subfamilies, including current and extinct taxa; these findings modified the previous classification that covered the creation of the family Ovalipidae, which returned as a subfamily to Geryonidae (Evans, 2018; Spiridonov, 2020). The last one study on the reclassification of the Portunoidea carried out by Spiridonov et al (2020), included a compilation of the results of Schubart & Reuschel (2010), Spiridonov et al. (2014), Evans (2018) and Mantelatto et al. (2018) and thus maintained the classifications proposed by Evans (2018), in which Portunoidea is divided into three families.

A study of the genus *Callinectes*, focusing on the American representatives of the genus, suggested the group be separated into two evolutionary distinct clades called the “*bocourti*” and “*danae*” groups (Robles et al., 2007). Studies on the genus *Portunus* Weber, 1795 have shown the genus to be polyphyletic (Mantelatto et al., 2007). Further studies reassigned one species of *Cronius* Stimpson, 1860, along with some species in *Portunus* to the resurrected genus *Achelous* De Haan, 1833 (Mantelatto et al., 2009). These studies also provided molecular evidence supporting separation of *Arenaeus* Dana, 1851 from *Callinectes* (Robles et al., 2007; Mantelatto et al., 2007, 2009). Furthermore, the last revision of Spiridonov (2020) maintained the separation of two genera *Achelous* and *Portunus* (*sensu* species of *Portunus* (*sensu stricto*) - occurring in the Indo-Pacific and Atlantic and are revealed as having close phylogenetic relationships with the Atlantic genera *Arenaeus* and *Callinectes* (Spiridonov et al., 2014; Evans 2018). Moreover, all molecular phylogenetic studies indicated that species from the American and Eastern Atlantic before considered belong to the subgenus *Achelous* the old one *Portunus* (Ng et al., 2008) constitute a distinct clade, which in some reconstructions appear as a sister group of Thalamitinae (Spiridonov et al., 2014; Evans, 2018; Mantelatto et al., 2018). Evans (2018) also indicated the basal position of the genus *Cronius* in Thalamitinae, which also includes the monophyletic genus *Charybdis* De Haan, 1833 and *Thalamita* Latreille, 1829.

Decapods spermatozoa ultrastructure have been studied to compare families using probabilistics analysis to infer phylogenetic relationship, furthermore, this tool is the one of the most efficient analysis for demonstrating relationship based on morphology (Jamieson, 1994; Jamieson & Tudge, 2000; Camargo et al., 2015, 2017; Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018). Despite consistent claims that spermatozoal morphology reflects the phylogenetic relationships within groups and families, such as in Potamoidea (Klaus et al., 2009) and Majoidea (Tudge et al., 2012; Assugeni et al., 2017). Klaus and Brandis (2010) showed that the small sample size and the convergent character evolution of the acrosome might affect phylogenetic inference at the family level. On the other hand, Tudge et al. (2012) argue the importance of spermiocladistics to different brachyuran taxa and provide examples of previous works that demonstrated molecular relationships predicted by spermatozoal ultrastructure. Besides the present study, in Portunoidea there are only a few studies on the spermatozoal ultrastructure focusing on spermatogenesis (Li 1995; Wang et al., 1997; Stewart et al., 2010), acrosome reaction during fertilization (Brown, 1966) and spermatozoal description (Brown, 1966; Hinsh, 1986; Jamieson, 1989; Jamieson and Tudge 1990, 2000; Li, 1995; Wang et al., 1997). Some of these previously described spermatozoal characters might have some

evolutionary significance, but there has not been any attempt to test that hypothesis before the present study.

Thus, the objectives of this study were to describe the spermatozoa and spermatophore ultrastructure of fourteen Portunoidea species of American West Atlantic and to present a first attempt at reconciling specific spermatozoal traits to this group with molecular data to trace the evolution of those spermatozoal characters, in order to resolve the phylogenetic inconsistencies of the group.

Material and Methods

Animals

Samples of *Callinectes danae* Smith, 1869, *Callinectes ornatus* Ordway, 1863, *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896, *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818), *Achelous spinimanus* (Latreille, 1819), *Achelous spinicarpus* Stimpson, 1871, and *Achelous tumidulus* (Stimpson, 1871) were collected monthly from March 2007 to December 2010 in the Bay/Estuary Complex of Santos - São Vicente, Cananéia and Ubatuba by otter trawling for approximately 20 minutes. *Cronius ruber* (Lamarck, 1818) and *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) were hand-collected at low tide along the rocky shore of Itararé beach at São Vicente. Baited ring nets were used to sample *Callinectes bocourti* A. Milne-Edwards, 1879 and *Callinectes exasperatus* (Gerstaecker, 1856) in the estuary of São Vicente and Bertioga, respectively. *Ovalipes trimaculatus* (De Haan, 1833) was collected in Ubatuba by otter trawling for approximately 20 minutes. All above localities are in São Paulo State, Brazil. *Callinectes larvatus* Ordway, 1863 were hand-collected at a rocky shore of Meache Beach, Pontal, Ilhéus, Bahia State, Brazil, while *Callinectes rathbunae* Contreras, 1930 were obtained in Playa Alvarado Vera Cruz state, Mexico. All collected animals were kept alive in labeled plastic boxes with water from the collecting site until the dissection. Only mature adult animals were used based on the macroscopic characterization of the reproductive system proposed for males of *C. danae* and *C. ornatus* (Zara et al., 2012, Nascimento and Zara, 2013). At least three animals of each species were used for spermatozoal ultrastructure except for the rare *O. trimaculatus* (N=1).

Transmission Electron Microscopy

Fragments (1mm³) of the anterior and posterior vas deferens were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4), with 5% sucrose for 2-4 h (Ro et al., 1990). The samples of *C. larvatus* and *C. rathbunae* remained

longer time than the other species in the fixative and inadequate temperature because they were collected in other locations of sample processing (this can lead to some fixation problems and inconsistencies in the micrographs). The material was later rinsed twice with the same buffer, and samples were post-fixed with 1% osmium tetroxide for 2 h and 'en block' stained overnight with aqueous 1% uranyl acetate. Samples were dehydrated in an acetone series (70 to 100%) and embedded in Epon-Araldite resin. Ultrathin sections (50-60nm) were contrasted with 2% aqueous uranyl acetate (20 minutes) and 2% lead citrate in 0.1 N NaOH (7 minutes). The material was photographed with a Jeol J1010 transmission electron microscope operating at 80 Kv electron beam.

Spermatophore and spermatozoal morphology and nomenclature

The spermatophores were classified in three types: A*(rounded format, usually with the same size and showing thick and compact pellicle or spermatophore wall with a smooth external surface); B* (elliptical format with different sizes and a feeble thin undulated wall); C* (mucous spermatophores and lack a distinct spermatophore wall (highly irregular surface) (Table 1). The established Portunidae spermatozoa characters follow the nomenclature proposed by Jamieson (1994). In addition, we used 11 new characters (Figure 2): acrosome length/width, operculum, accessory opercular ring, lateral subopercular zone, perforatorial chamber morphology, perforatorial chamber apex, and base at the level of thickened ring, perforatorium after thickened ring, acrosome ray zone (ARY), lamellar structure, chromatin (8 acrosomal and 1 nuclear) to differentiate closely related portunid species studied in the present work (Table 1). These new characters were also identified in the electron micrographs of spermatozoa published in Portunoidea studies: *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758), *Portunus trituberculatus* (Miers, 1876), *Podophtalmus vigil* (Fabricius, 1798), *Caphyra rotundifrons* (A. Milne-Edwards, 1869), *Scylla serrata* (Forskål, 1775), *Chaceon fenneri* (Manning & Holthuis, 1984), *Ovalipes molleri* (Ward, 1933), *Ovalipes ocellatus* (Herbst, 1799) and *Xaiva* sp. and *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758) (Brown, 1966; Pearson and Walker, 1975; Reger, 1984; Hinsh, 1986; Hinsch, 1988; Jamieson, 1989; Jamieson and Tudge, 1990, 2000; Li, 1995; Wang et al., 1997, Stewart, 2010). To standardize nomenclature, two of these characters (perforatorial chamber apex and perforatorial chamber morphology) were classified according to the plane shapes used in gregarine species taxonomy (Clopton, 2004) with some adaptations, as in the species of *Cronius* and *Charybids* that present the perforatorial chamber with morphologies of popular names (spade and arrow shaped). In these cases, we classified the morphology of the perforatorial chamber according to Clopton (2004) and included the popular names in parentheses. The

acrosomal vesicle was classified in three regions: the anterior, media and posterior. The anterior region is where the operculum and apex of the perforatorial chamber are located. The posterior region is where the base of the perforatorial chamber and the thickened ring are located. Between the anterior and posterior region is the middle region with most of the perforatorial chamber and the acrosomal ray zone (ARY) (Figure 2).

Phylogenetic analysis

To obtain the phylogenetic trees, we use the sequence of the 16S genes rDNA and COI mtDNA through the GenBank platform (Supplementary material). The alignment of the concatenated sequences were obtained using the ClustalW software (Thompson et al., 1994) via Bioedit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). For the analysis of the best model of nucleotide substitution followed the AIC criterion in jModelTest 2 software (Guindon and Gascuel, 2003), the model being GTR+G. The phylogenetic hypothesis was obtained with the Maximum Likelihood (ML) method using the software RAxML – HPC2 on XSEDE v. 8.2.12 (Stamatakis, 2014) via the CIPRES platform (Miller et al., 2010) with 1000's bootstraps. The choice of the outgroup *Sylviocarcinus pictus* (Milne-Edwards, 1853) and *Valdivia serrata* White, 1847 was based on several previous attempts and phylogenies of Portunoidea (Mantelatto et al., 2007, 2009; Robles et al., 2007; Schubart et al., 2009; Tsang et al., 2014; Spiridonov et al., 2014). The edition of cladograms and rooting were performed using the FigTree 1.3.1 software (Rambaut, 2009). Subsequently, a matrix was constructed containing the data of the ultrastructure of the spermatozoa of Portunoidea (assigned above) from the present study and from the available scientific literature (Table 1). In this matrix, the characters selected through the ultrastructure of the spermatozoa, for the purpose of indicating sign characters for separating closely related groups. To designate the state of the character, numbers were assigned, as follows: Character “Spermatophore”: A*(rounded format, usually with the same size and shows thick and compact pellicle or spermatophore wall with a smooth external surface); B* (elliptical format with different sizes and a feeble thin undulated wall); C* (mucous spermatophores and lack a distinct spermatophore wall (highly irregular surface)). Character “shape of perforatorial chamber”: rounded ellipsoid (0); (1) angled ellipsoid, (2) ellipsoid; (3) pyriform; (4) narrowly ellipsoid; (5) fusiform (spades-shaped); (6) narrowly fusiform (arrow-shaped); (7) narrowly fusiform; (8) fusiform. Character “ARY morphology”: (0) Thick, rounded and medially enlarged; (1) narrow and enlarged anteriorly; (2) narrow and slightly enlarged medially; in the species with insufficient data, the status assigned was the symbol “?” (Table 1). The matrix and the

phylogeny provided by ML was loaded into Mesquite v.3.04 (Maddison and Maddison, 2015) for character history reconstruction by parsimony criterion.

Results

Spermatophores

In all fourteen species of Portunoidea that were studied in this analysis, the spermatozoa are stored in distal portion of the anterior or in the median vas deferens. The spermatophores vary from spherical to elongate-elliptical and are immersed in secretion with an appearance ranging from granular to fibrous and homogeneous electron-density. The spermatophores exhibit variable size and number of enclosed spermatozoa (Figs. 1A-I), and only in *Ch. helleri* showed some cleistospermic spermatophores. In the genera *Callinectes* and *Arenaeus*, the spermatophores are round, usually with the same size and shows thick and compact pellicle or spermatophore wall with a smooth external surface (Fig. 1A-C). The spermatozoa of both genera are found immersed slightly fibrous matrix with many granules (Figs. 1A, B, D). In *Achelous*, the spermatophore is elliptical with different sizes and a feeble thin undulated wall shows homogeneous electron-density (Fig. 1F-G) and the spermatozoa within are immersed in a granular matrix (Fig. 1F). The spermatophores of *Cr. ruber* are very irregular in terms of their shape and number of contained spermatozoa; the wall is also undulated with a very thin irregular feeble pellicle or wall similar to *Achelous* (Fig. 1G). The spermatozoa are immersed in a granular matrix that is more electron-dense than the wall (Fig. 1H). The species *Ch. hellerii* displays the most distinct spermatophores of the analyzed Portunidae. The mucous spermatophores are formed by a mass of homogeneous secretions of intermediate electron density and lack a distinct spermatophore wall; the spermatophores have a highly irregular surface and vary in size, shape, and number of spermatozoa (Fig. 1I).

General Morphology of the Spermatozoa in Portunidae

The spermatozoa possess the ultrastructural morphology typical of Brachyura. All analyzed species have a complex acrosome vesicle that is approximately spherical with concentric zonation, including the distinctive acrosome ray zone (ARY) or acrosomal rays. The acrosome vesicle is almost completely surrounded by the nucleus, which is in the shape of a cup with filiform lateral expansions or arms. Only the electron-dense operculum forms the free apical portion, which is not enveloped by the nucleus. We consider the operculum as the anterior region of the acrosomal vesicle. The operculum is discontinuous with the capsule of the acrosome vesicle without a fold or a periopercular “rim”. Between the nucleus and the

acrosome vesicle, there is a thin layer of cytoplasm, where the remains of such cellular organelles as mitochondria, lamellar structures, and centrioles are found. The periacrosomal cytoplasm at the base of the acrosome vesicle is continuous with and transforms into, a cylindrical perforatorial chamber that extends through the central axis of the acrosome vesicle, terminating below, and within, the operculum. At the base of perforatorial chamber is noticed the thickened ring and we consider as a posterior region of the acrosomal vesicle. The spermatozoa of Portunoidea do not exhibit undulations in the perforatorial chamber wall, a xanthid ring, subopercular projections, capsular projections, concentric lamellae in the acrosome, or a capsular layer, which are characters traditionally used for the spermatid differentiation of the large groups of Brachyura. The usual portunid spermatozoal characters are summarized in the diagrammatic spermatozoon (Fig. 2) modified from Jamieson and Tudge (1990). In blue are highlighted the specific traits optimized in the phylogenetic trees and used in the following spermatozoal descriptions (also summarized in the table 1).

Spermatozoa of Callinectes danae (Figure 3, Table 1)

The acrosome vesicle displays on its apical surface, not encircled by the nuclear cup, the operculum, which is clearly protruding and pointed, forming a dome with a triangular morphology and a wide base (Figs. 3A-B). Below the operculum, which is discontinuous with the capsule, a reduced inner subopercular ring can be observed (Figs. 3A-B). The subopercular zone reaches the 1/3 (apical/anterior pole) of the perforatorial chamber (Fig. 3B). The perforatorial chamber is rounded-ellipsoid with a deeply deltoid apex inside the subopercular zone (Figs. 3A-C). The base of the perforatorial chamber, at the level of the thickened ring, is narrower relative to the rest of the structure. Immediately anterior to the thickened ring, the perforatorial chamber increases in width at a curved or rounded boundary (Fig. 3C). The ARY is thick, rounded, and enlarged medially (Figs. 3A-C). In the cytoplasm, the lamellar structure is reduced and when present, is found next to the basal pole of the acrosomal vesicle (Figs. 3C and D). In cross section, four concentric layers can be seen, including the ARY as second (Fig. 3D). The perforatorial chamber displays perforatorial tubules (Fig. 3D). The subopercular zone is of medium electron-density, and in longitudinal section, the perforatorial chamber practically divides it into two peripheral lateral subzones that are slightly triangular and linked by a thin layer at the apex of the perforatorial chamber (Figs. 3A-D).

Spermatozoa of Callinectes ornatus (Figure 4, Table 1)

Ultrastructurally, the spermatozoa of *C. ornatus* are very similar to those of *C. danae*. (Figs. 4A-B and D). The ARY are also enlarged medially. The nucleus has granular chromatin and lateral arms (Fig. 4A). Below the protruding triangular operculum, a reduced accessory opercular ring can be observed, and after this a less and small electron-dense subopercular zone was observed (Fig. 4B). The base of the perforatorial chamber at the thickened ring is narrow, and anterior to this, the perforatorial chamber wall curves to a greater diameter (Fig. 4C). In cross section, the spermatozoa display four concentric acrosomal zones (Fig. 4D).

Spermatozoa of Callinectes exasperatus (Figure 5, Table 1)

The spermatozoa of *C. exasperatus* display a protruding operculum forming a rounded dome. The perforatorial chamber is rounded-ellipsoid with wide and rounded (shallowly deltoid) apex, and each side of the subopercular zone has the shape of an arch, over the apex of the perforatorial chamber (Figs. 5A-B). In the subopercular zone, the presence of a well-developed accessory opercular ring can be noted (Fig. 5B). The ARY is thick and enlarged centrally (Fig. 5A). The base of the perforatorial chamber is wide and anterior to the thickened ring, it becomes wider and curved (Fig. 5C). Despite the slight narrowing from this basal region to the apex, *C. exasperatus* exhibits the greater width perforatorial chamber among the *Callinectes* studied here (Figs. 5C). The perforatorial tubules of the perforatorial chamber are sparse, more easily observed next to the apex (Fig. 5B), and difficult to identify in cross section (Fig. 5D). The acrosome displays four concentric layers, and the most external is moderately electron-dense (Figs. 5A and E).

Spermatozoa of Callinectes larvatus (Figure 6, table 1)

In *C. larvatus* the spermatozoa showed an acrosome vesicle with a thick ARY medially enlarged (Figs. 6A-D). The operculum is discreetly triangular pointed and the subopercular zone is triangular in shape with evidence of an accessory opercular ring (Figs. 6A-B). The perforatorial chamber is a rounded ellipsoid with a shallowly deltoid apex (Figs. 6A-B). The base of the perforatorial chamber at the thickened ring is wide and anterior to this ring, the perforatorial chamber is curved (Fig. 6A and C). The nucleus is filled with granular chromatin surrounded by a discontinuous nuclear envelope. The acrosome shows four concentric zones (Fig. 6D).

Spermatozoa of Callinectes sapidus (Figure 7, Table 1)

A longitudinal section of the spermatozoa shows the operculum forming a slightly protruding and rounded dome. The ARY is narrow and slightly enlarged medially. The thin nucleus displays chromatin with a fibrous appearance, which is different from the other *Callinectes* observed to date (Fig. 7A). A longitudinal section of the acrosome vesicle shows an angled ellipsoid perforatorial chamber with two angled points, one of these next to the finely trullate apex (Figs. 7A-C) and the other at the thickened ring, where an increase occurs in the width of this structure (Fig. 7C). Below the rounded operculum, the subopercular zone has the shape of an arch (similar a button) and an accessory opercular ring can be observed (Fig. 7B). In cross section, the most external layer of the acrosome is markedly more electron-dense (Fig. D).

Spermatozoa of Callinectes bocourti (Figure 8, Table 1)

The nucleus of the spermatozoa is thin with clearly marked fibrous chromatin (Fig. 8A). The acrosome has a protruding triangular operculum with a conical morphology and a wide base (Figs. 8A-B). The perforatorial chamber is angled ellipsoid and has an angled point next to the subopercular zone and another basal point at the level of the thickened ring (Figs. 8A-C). The ARY is thick and markedly rounded in the central region (Figs. 8A-C). The pointed operculum has an arched subopercular zone and an accessory opercular ring can be observed lateral to both sides of the opercular subzone (Fig. 8B). The apex of the narrow perforatorial chamber becomes more angled (finely trullate) at the point of contact with the subopercular zone (Fig. 8B). In contrast to what is observed in other taxa, the fourth and most external layer of the acrosome vesicle has lower electron density as well as the the perforatorial tubules that were clearly observed (Fig. 8D).

Spermatozoa of Callinectes rathbunae (Figure 9, Table 1)

The perforatorial chamber is angled ellipsoid and has perforatorial tubules, narrowing at the subopercular zone forming a more angled (finely trullate) apex (Figs. 9A-C). The acrosome vesicle shows a protruding and pointed, triangular operculum while the subopercular zone is arched showing distinct accessory opercular rings (Figs. 9A and B). The ARY is narrow and slightly enlarged medially and in transverse section of the acrosome vesicle shows four concentric zones and the perforatorial tubules (Fig. 9D).

Spermatozoa of Arenaeus cribrarius (Figure 10, Table 1)

In *Ar. cribrarius*, the spermatozoa have a flat and slightly less-rounded opercular region (Fig. 10A). The perforatorial chamber is ellipsoid with a rounded and wide apex (shallowly deltoid) (Fig. 10B). At the thickened ring, the perforatorial chamber wall is not angled but is slightly curved (Fig. 10C). The nucleus has fibrous chromatin (Fig. 10A). The ARY is rounded and enlarged from the central to the posterior region of the acrosomal vesicle (Figs. 10A-C). The subopercular zone is thin with a flat triangular morphology; and laterally, there is a well-developed accessory opercular ring (Fig. 10B). The perforatorial tubules display different diameters in cross section (Fig. 10D) and *Ar. cribrarius* exhibits four concentric layers in the acrosome vesicle (Fig. 10D).

Spermatozoa of Achelous spinimanus (Figure 11, Table 1)

In *Achelous*, the spermatozoon is a large cell (Fig. 11A). The acrosome vesicle is wider than long. The nucleus is so much voluminous and filled with granular chromatin. In the acrosome vesicle, the operculum is protruding round and with an irregular surface, with a slightly round protruding central portion (Fig. 11A-B). At the end of the operculum, this structure has an upward prominence at both ends (Fig. 11B). Below this, the subopercular zone is flat and has an accessory opercular ring (Figs. 11A-B) and appears continuous with a rounded ARY (Figs. 11B-E). The ARY is enlarged anteriorly and slender posteriorly, however, the ARY is thicker than observed in the other *Achelous*. The perforatorial chamber is large, and swollen, with pyriform format (Figs. 11A-B). The apex of the perforatorial chamber is gently rounded and wide with no narrowing (Figs. 11B) In addition, it is possible to observe discrete perforatorial tubules (Figs. 11A-D). Posterior to the thickened ring, the perforatorial chamber becomes wider with rather accentuated curvature (Fig. 11C). In cross section, a wide perforatorial chamber and four concentric layers can be observed (Fig. 11D).

Spermatozoa of Achelous spinicarpus (Figure 12, Table 1)

Ultrastructurally, the spermatozoa of *A. spinicarpus* are very similar to those of *A. spinimanus* (Figs. 12A-D). The primary difference occurs in the operculum, which does not have the same upward protuberance (flat round) and has irregular surface aspect (Figs. 12A-B). The second difference is in the ARY, which is narrower in *A. spinicarpus* (Figs. 12A-C). The nucleus has granular chromatin (Figs. 12A-D). The subopercular zone is continuous to ARY but slightly less electron-dense and flat, showing the discrete subopercular ring at both margins (Fig. 12B). The ARY is enlarged anteriorly and slender posteriorly, being thinner than observed

in *A. spinimanus*. The perforatorial chamber is large, swollen apically, and therefore resembles a rounded head (capitate), with a very broadly pyriform format. The apex of the perforatorial chamber is flat rounded with a finely ovoid format. The base of the perforatorial chamber at the thickened ring is thick, and anterior to this, the perforatorial chamber wall curves to a greater diameter. The thickened ring is so marked (Fig. 12C). In cross section, the spermatozoa display four concentric acrosomal zones (Fig. 12D).

Spermatozoa of Achelous tumidulus (Figure 13, Table 1)

The spermatozoa of *A. tumidulus* has the acrosome vesicle are very similar to the other *Achelous*. The nucleus is also voluminous and filled with granular chromatin. In the acrosome vesicle, the operculum is flat, with a rounded protruding central portion and irregular surface (Figs. 13A-B). At the end of the operculum, this structure has a slightly upward prominence at both ends with a presence of a discrete subopercular ring. (Fig. 13B). Below this, the subopercular zone is also flat, lacks any accessory opercular ring (Figs. 13A-B), and appears continuous with a rounded ARY (Figs. 13B and E). The ARY is enlarged anteriorly and slender posteriorly, being thinner as observed in *A. spinicarpus*. The perforatorial chamber is large, narrow apically, with a broadly pyriform format (Figs. 13A-B). The apex of the perforatorial chamber is slightly rounded (Fig. 13B), in addition, it is possible to observe numerous perforatorial tubules (Figs. 13A-D). Posterior to the thickened ring, the perforatorial chamber becomes marked rounded (Fig. 13C). In cross section, a wide perforatorial chamber (with perforatorial tubules) and four concentric layers can be observed (Fig. 13D).

Spermatozoa of Cronius ruber (Figure 14, Table 1)

The acrosome vesicle of *Cr. ruber* is wider than long, as well as in *Achelous*. The nucleus is thin with granular chromatin and long lateral arms (Fig. 14A). The operculum is protruding, and the central portion is a rounded dome (Figs. 14A-B). Immediately below the operculum, the subopercular zone is divided into two subzones in the shape of an arch due to the broad and pointed apex of the perforatorial chamber. An accessory opercular ring is observed (Fig. 14B). The ARY is thin and enlarged anteriorly (Fig. 14A-B). The perforatorial chamber is large and has a fusiform format (spades-shaped) with a shallowly deltoid apex (Figs. 14 A-C). The perforatorial chamber again widens immediately anterior to the thickened ring, with accentuated curvature before the beginning of the ARY (Figs. 14A-C). In cross section, it is noted that the ARY is rather thin and the usual pattern of four concentric layers occurs in this species (Fig. 14D).

Spermatozoa of Charybdis hellerii (Figure 15, Table 1)

The spermatozoa of *Ch. hellerii* have the same acrosome length/width ratio as that found in the genus *Callinectes* (Fig. 15A). The operculum is protruding triangular and somewhat pointed, reminiscent of the geometric shape of a cone (Figs. 15A-B). The perforatorial chamber displays a totally different morphology than the other Portunidae described in this report, with a distinct arrow-shape classified as narrowly fusiform and covered by a thin ARY showing a slightly enlarged medially (Figs. 15A-B). The nucleus is thin and filled with granular chromatin (Figs. 15A-D). The perinuclear cytoplasm remains mostly restricted to the basal pole of the acrosome vesicle, and only a very narrow strip of cytoplasm reaches anteriorly to the edge of the operculum (Figs. 15A-D). The apex of the perforatorial chamber is rather narrow and pointed (finely trullate), separating the subopercular zone into two triangular subzones and displays an accessory opercular ring (Fig. 15B). Immediately anterior to the thickened ring, the perforatorial chamber widens at a markedly angled region (Figs. 15A and C). As observed in the other genera, the acrosome displays four concentric zones (Fig. 15D).

Spermatozoa of Ovalipes trimaculatus (Figure 16, Table 1)

The spermatozoa of *O. trimaculatus* have the same acrosome length/width ratio as that found for the genus *Callinectes* (Fig. 16A) and display a protruding operculum, which is clearly protruding and pointed, forming a dome with a triangular morphology and a wide base (Figs. 16A and B). The acrosome vesicle has five acrosomal layers; the innermost is more electron-dense than the others, which decreases in electron-density to the outermost layer (Fig. 16A-B). The ARY is thin and slightly enlarged medially similar to that found in *Charybdis* (Fig. 16A-B). The perforatorial chamber has a narrowly ellipsoid format with a wide and rounded apex (very shallowly ovoid), and each side of the subopercular zone is rounded and short, over the apex of the perforatorial chamber (Figs. 16A-B). In the subopercular zone, the presence of a well-developed accessory opercular ring can be noted (Fig. 16B). The base of the perforatorial chamber is wide, and anterior to the thickened ring, it becomes wider and slightly angled (Fig. 16C). The perforatorial tubules of the perforatorial chamber are sparse (Fig. 16D). The acrosome displays five concentric layers, and the most internal is more electron-dense (Figs. 16A-E).

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyzes of two molecular markers (16S and CO1) were carried out on 50 portunoid based on sequences of the GenBank. The results were summarized and

support/bootsraps values (bs) are summarized in Figures 17 to 20 and discussed with the ultrastructure of the portunoid spermatozoa. With few exceptions, phylogenetic analyses of the two concatenated data sets recovered consistent topologies that displayed significant support for most of the same clades and per reconstruction of the ancestral state of character. A total of 10 characters of spermatozoal morphology and the spermatophore ultrastructure were optimized across our ML tree using ML-state reconstruction.

In the phylogenetic hypothesis proposed here, the Portunoidea superfamily is monophyletic (bs: 100%), with the presence of three families: Portunidae (polyphyletic), Carcinidae (monophyletic) and Geryonidae (polyphyletic). The Portunidae was comprised by two well-defined evolutionary groups within *Callinectes* (bs 97%); one of them, called the “*danae*” (bs: 85%) and the other called “*bocourti*” (bs 99%). The group of *Callinectes* forms a sister group (bs 65%) with *Arenaeus* and *Portunus*. These two genera also formed a sister group with each other (bs 44%). The second clade (bs 32%) were formed by *Achelous* and *Portunus* (*Achelous*), while the *Achelous* clade used in the ultrastructure of this work has high support (bs 99%). The *Achelous* and *Achelous* (*Portunus*) is a sister group of *Caphyra*, *Podophtalmus*, *Scylla* and *Charybdis*. The fourth (bs 47%) and fifth clade (bs: 100%) were formed by the Thalamitinae genera *Cronius* and *Thalamita* (Fig. 17). The monophyletic Carcinidae (bs 98%) are composed by *Sirpus*, *Portumnus*, *Carcinus*, *Liocarcinus* and *Thia* genera within five subfamilies (Fig. 17). The family Geryonidae was represented by *Ovalipes* that is polyphyletic (bs: 72%) and forms a sister group with *Geryon* and *Chaceon* clades (bs 96%) (Fig. 17).

In this way, by mapping the characters the ancestral spermatophore type was the rounded format and the thick and compact wall that occurs in *Callinectes*, *Portunus*, *Arenaeus*, *Scylla*, *Ovalipes*, *Carcinus*, *Chaceon* and *Geryon* (Fig. 18). In the case of the morphology of the perforatorial chamber (Fig. 19), the ancestral character was recovered, and the most primitive morphology is related to the ellipsoid type that occur in the *Callinectes*, *Arenaeus* and *Portunus* genera. The third ancestral character recovered was the ARY morphology (Fig. 20), that is thick, rounded and medially enlarged and occur in the same species that has an ancestral spermatophore and perforatorial chamber morphology.

Figures

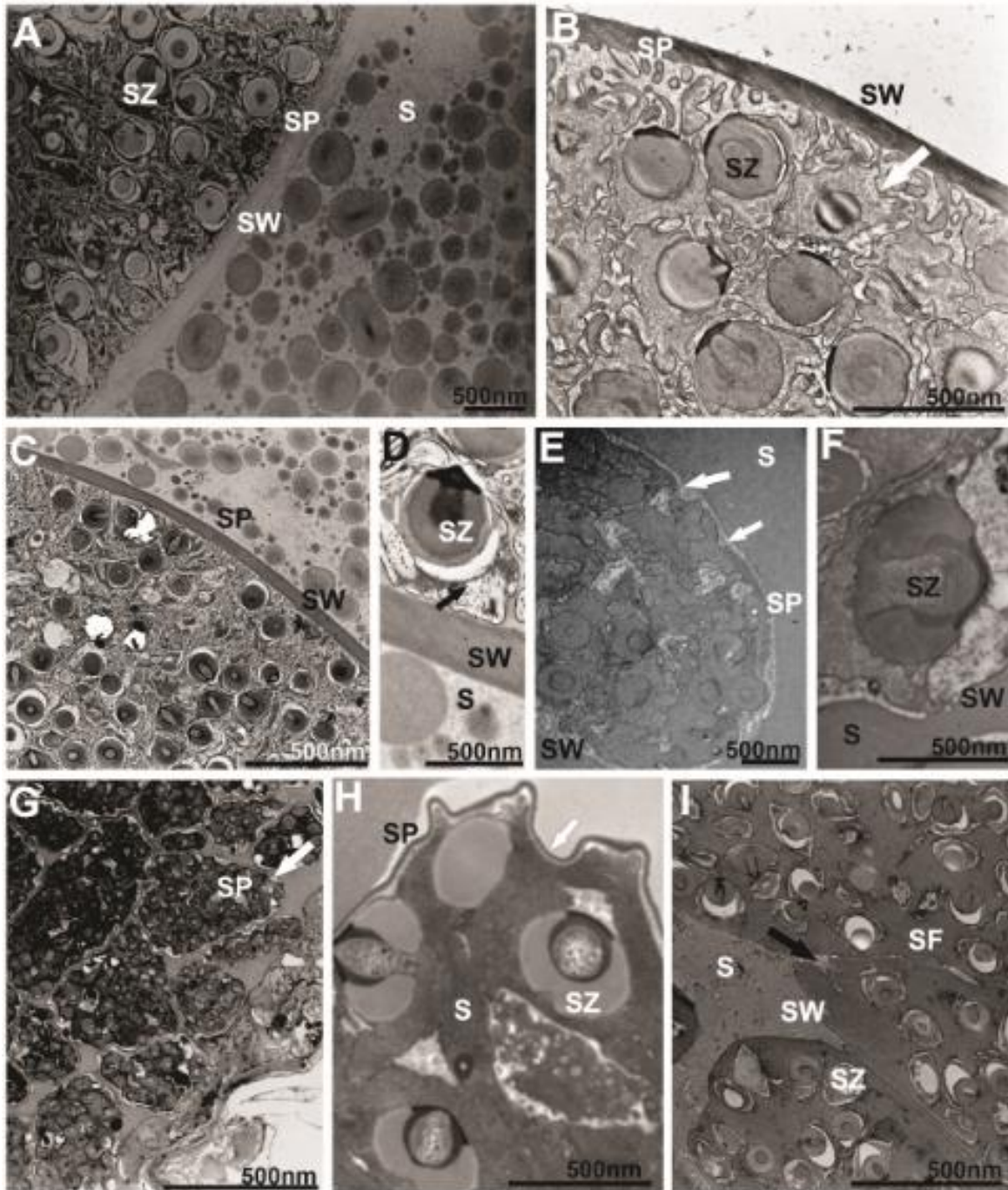


Figure 1. General appearance of spermatophores in Portunidae. A.) Spermatophore of *Callinectes ornatus* from the middle region of the vas deferens covered by a granular secretion. B.) Details of the spermatophores of *Callinectes danae* showing the thick wall and the spermatozoa inside covered by a finely fibrous matrix (white arrow). C and D.) General view of the spermatophores of *Arenaeus cribrarius* covered by a granular-fibrous secretion, showing the thick and smooth wall. In D, the homogeneous wall and the fibrous matrix between the spermatozoa can be clearly seen (arrow). E and F.) Spermatophore of *Achelous spinimanus* with small undulations (white arrows). The spermatozoa are immersed in a granular matrix, and the electron density of the wall is homogeneous. G and H.) General view of spermatophores of *Cronius ruber* with varied sizes and shapes. It can be noted that the wall of the spermatophores undulates (arrow), and in H, the moderately electron-dense and homogeneous matrix between the spermatozoa can be observed. I.) General spermatophore view of *Charybdis helleri* showing irregular surface (black arrow). MT= matrix; S = secretion; SF = spermatophore; SP = spermatozoa; SW = spermatophore wall.

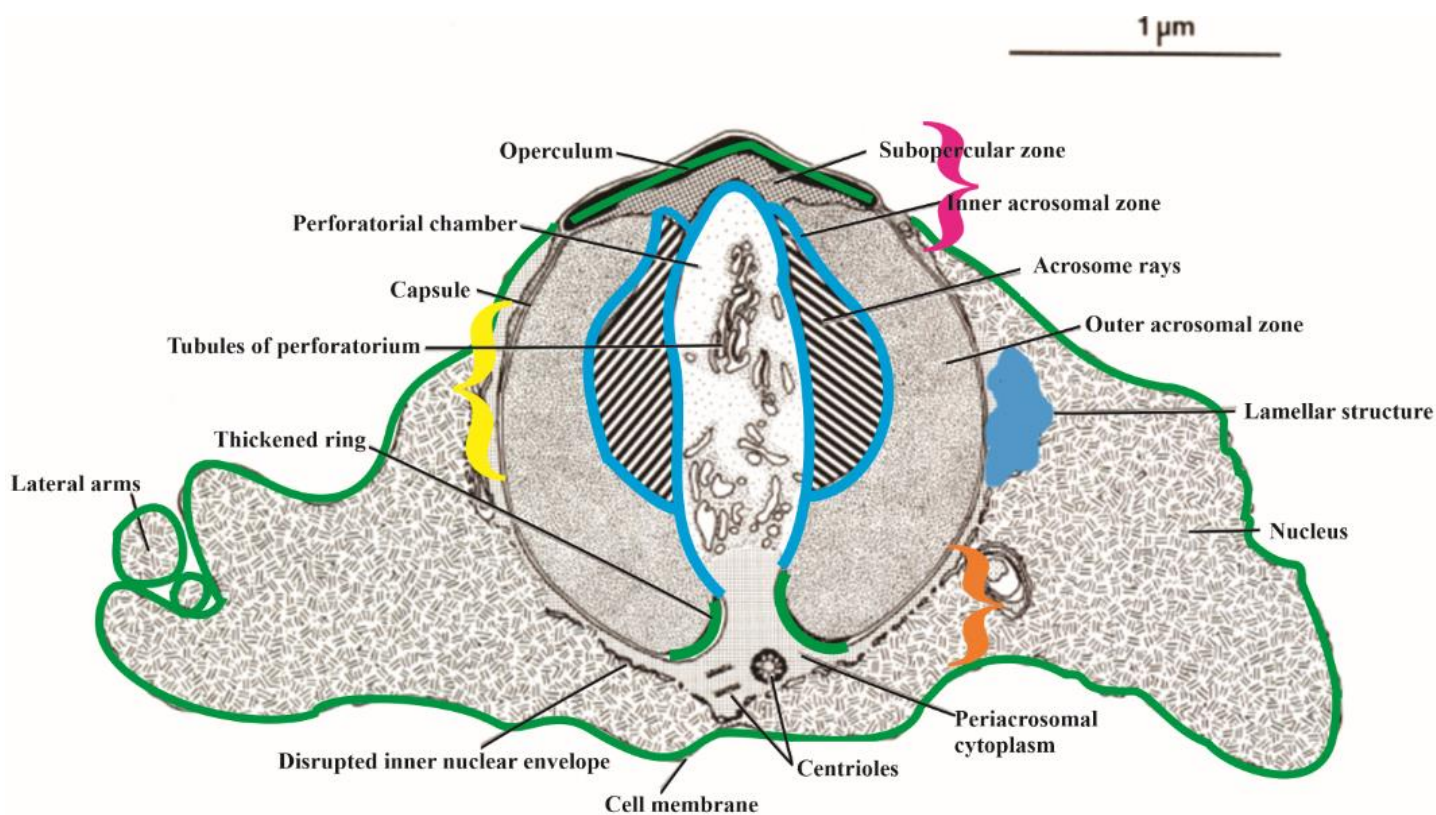


Figure 2. General spermatozoa diagram of Portunoidea. The spermatozoon of *Portunus pelagicus*. Figure modified from Jamieson and Tudge (1990) showing the main characteristics of Eubrachyura (green) and the characters of the Portunoidea superfamily (blue) of spermatozoa ultrastructure. The keys are envisioning the regions of the acrosomal vesicle. Pink: anterior region; yellow: middle region; orange: posterior region.

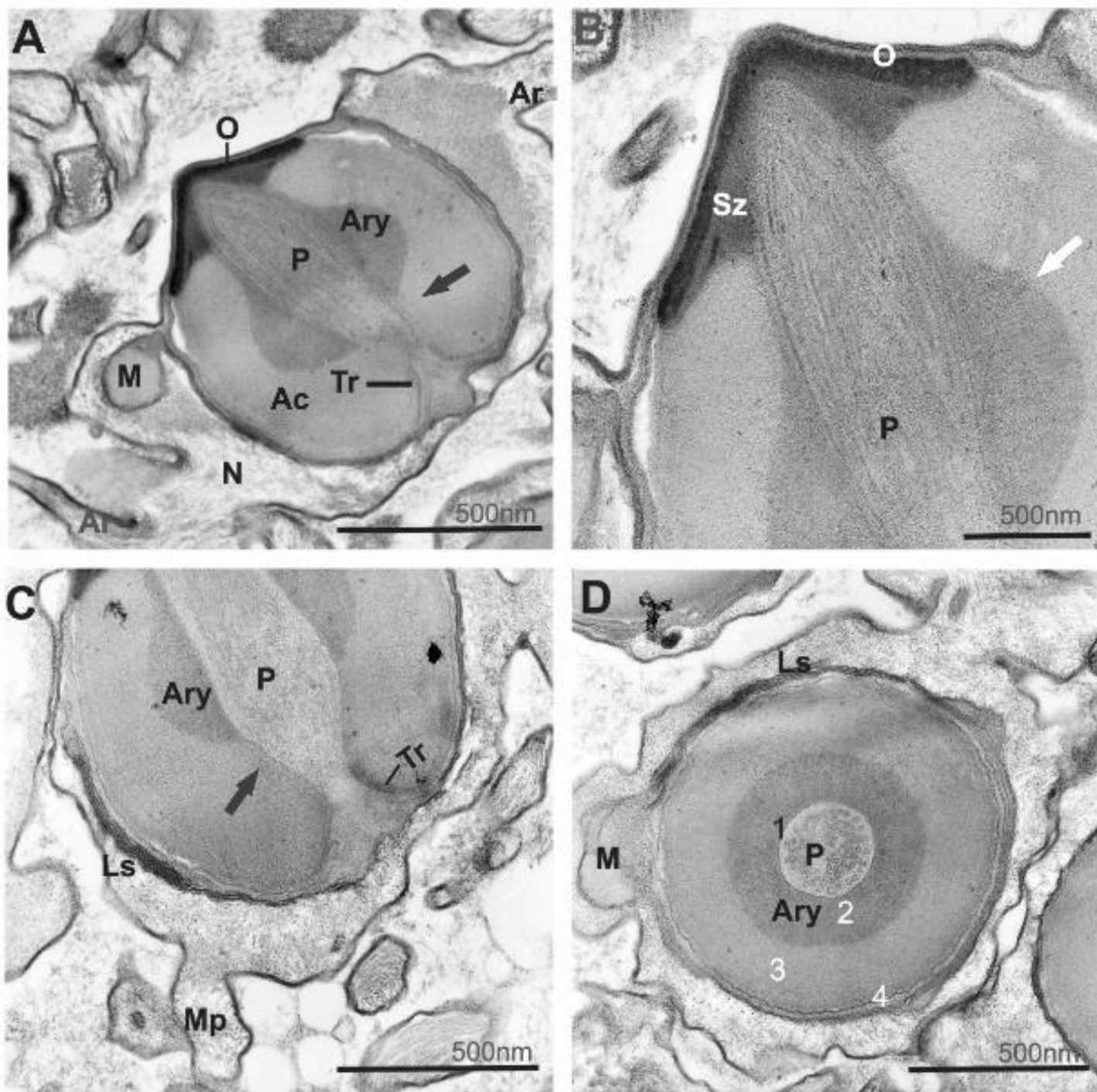


Figure 3. Spermatozoa of *Callinectes danae*. A.) General appearance of the spermatozoa in longitudinal section, showing the acrosome vesicle almost completely covered by the nucleus in the shape of a bowl, with granular chromatin and lateral arms. B.) Details of the electron-dense operculum, discontinuous with the capsule of the acrosome vesicle and the reduced accessory opercular ring. A rounded ellipsoid perforatorial chamber with a narrow and rounded apex separating the subopercular zone into two lateral triangular areas. Note in detail the reduced accessory opercular ring. C.) Detail of the base of the perforatorial chamber morphology (black arrow) and the well-developed thickened ring. D.) Spermatozoon in cross section, with four concentric layers (1, 2 (ARY), 3, 4) and a central perforatorial chamber with tubules. AC= acrosome; Ar= radial arms; ARY= acrosome ray zone; LS= lamellar structure; M= mitochondrion; MP= posterior median process; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

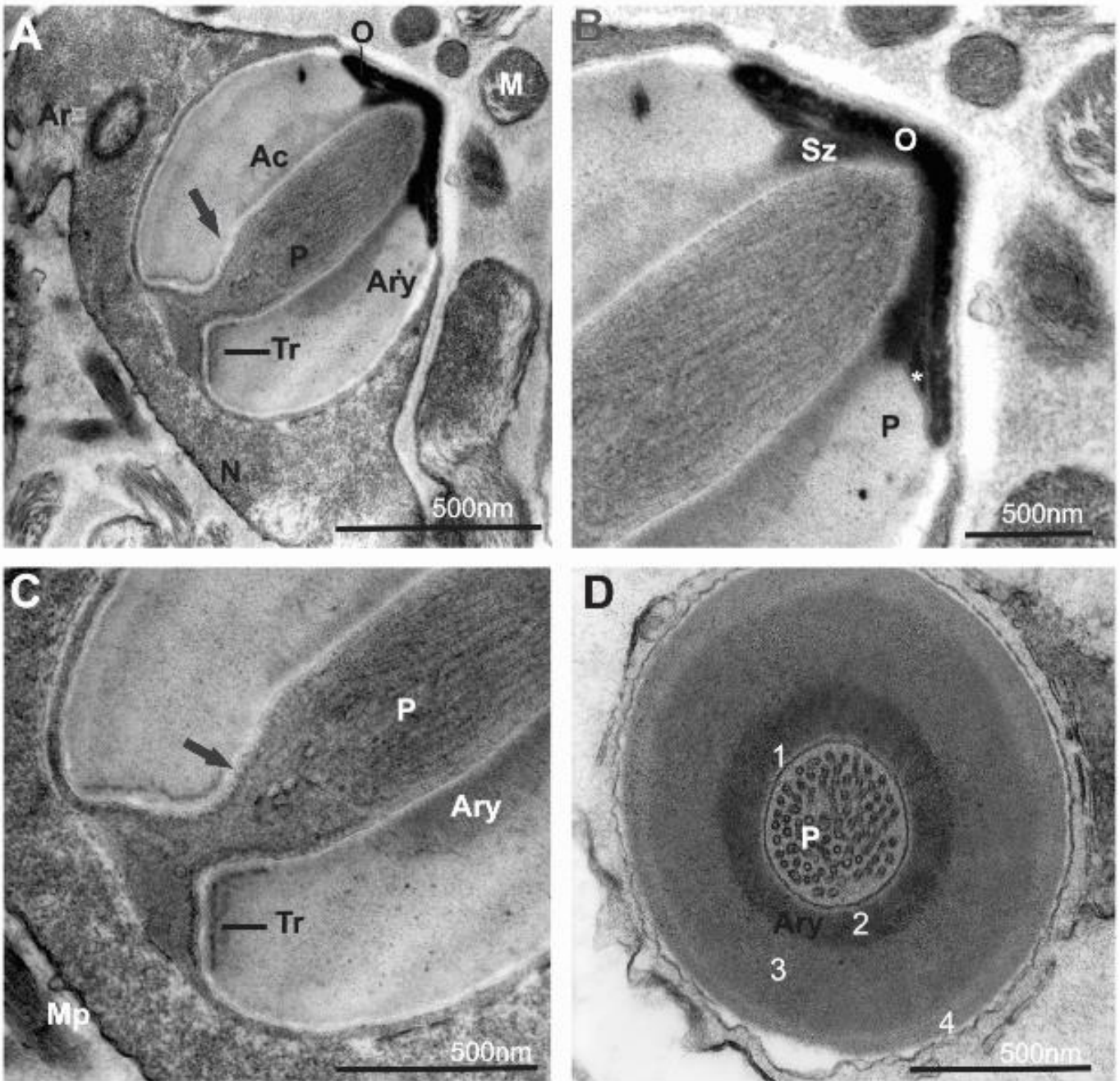


Figure 4. Spermatozoa of *Callinectes ornatus*. A.) Longitudinal section of the acrosome vesicle showing the protruding and pointed operculum, and a narrow and rounded apical portion of the perforatorial chamber that is rounded ellipsoid. The ARY is thin and continuous up to the subopercular zone. The nucleus displays granular chromatin and includes expansions forming the lateral arms. Anterior to the thickened ring, the perforatorial chamber forms a rounded expansion (black arrow). B.) Detail of the operculum with the accessory opercular ring (*) next to the triangular subopercular zone. C.) Detail of the thickened ring at the base of the perforatorial chamber. D.) Cross section of the acrosome vesicle showing the four concentric layers (1, 2, 3, 4) and the perforatorial tubules. AC= acrosome; Ar= radial arms; ARY= acrosome ray zone; LS= lamellar structure; M= mitochondrion; MP= posterior median process; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

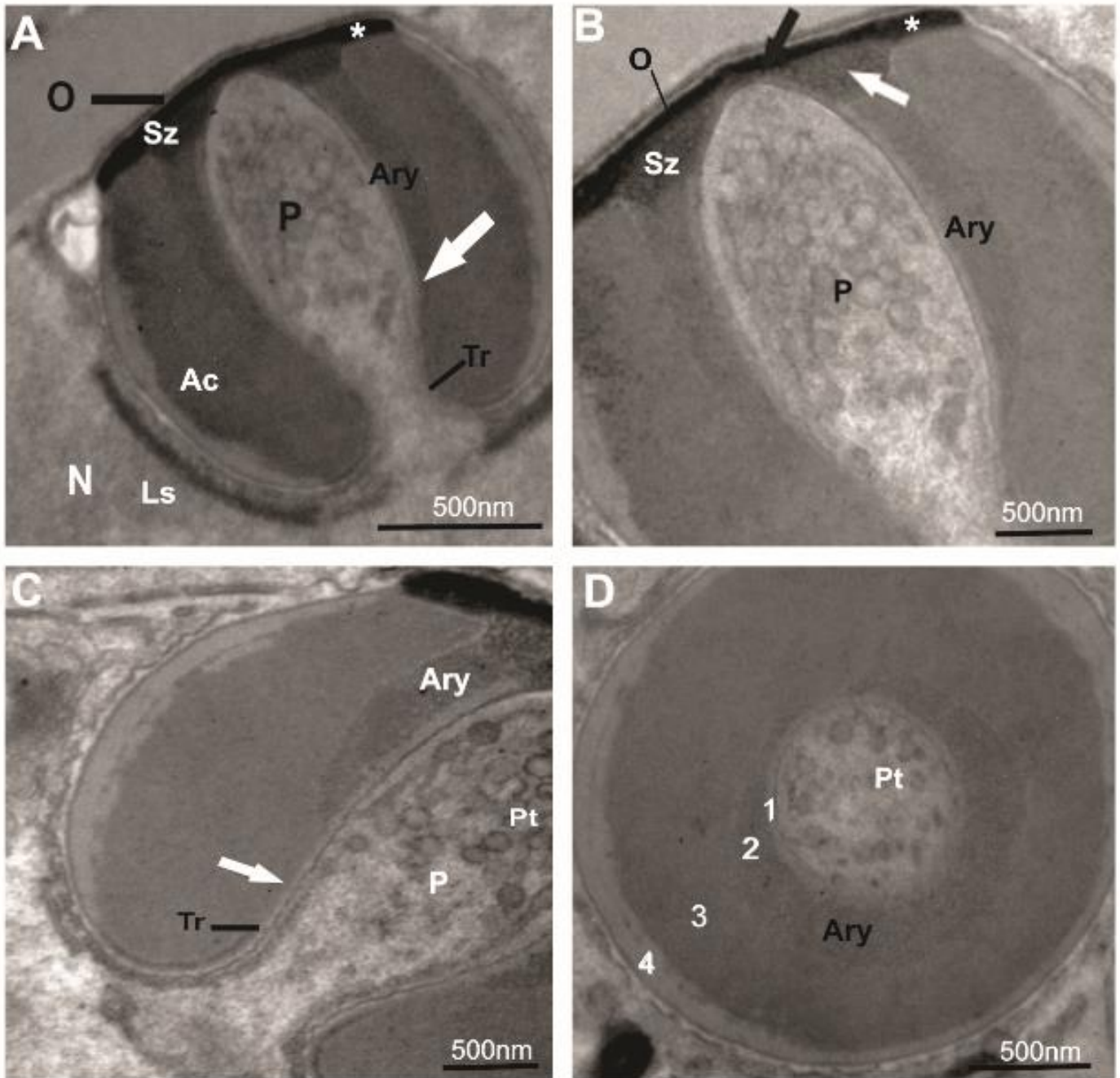


Figure 5. Spermatozoa of *Callinectes larvatus*. A.) Longitudinal section of the acrosome vesicle showing the operculum, and a wide and rounded apical portion of the perforatorial chamber. The ARY is thin and continuous up to the subopercular zone. The nucleus displays granular chromatin. Anterior to the thickened ring, the perforatorial chamber is rounded ellipsoid and forms a rounded expansion (white arrow). B.) Detail of the operculum with the short subopercular zone and a discrete accessory opercular ring (*). C.) Detail of the base of the perforatorial chamber after the thickened ring that comes marked rounded. D.) Cross section of the acrosome vesicle showing the four concentric layers (1, 2, 3, 4) and the perforatorial tubules. AC= acrosome; Ar= radial arms; ARY= acrosome ray zone; LS= lamellar structure; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Pt= perforatorial tubules; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

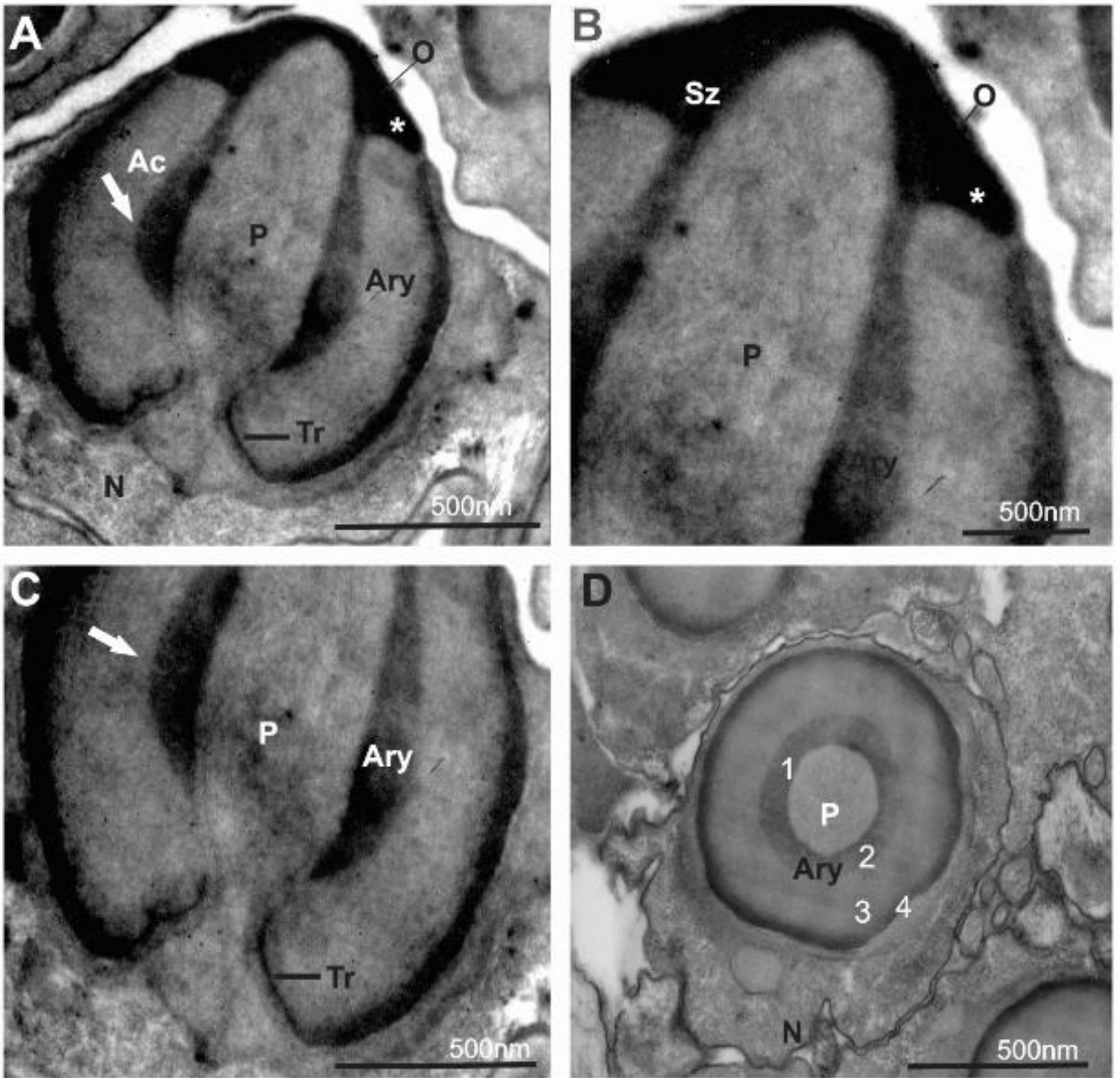


Figure 6. Spermatozoa of *Callinectes exasperatus*. A.) General appearance of the spermatozoa with a protruding and rounded operculum. Note that the subopercular zone is in the shape of an arch and the perforatorial chamber is angled ellipsoid and displays a rounded, wide apex. B.) Detail of the subopercular zone showing the accessory opercular ring (*). C.) Note an increase in the wide base of the perforatorial chamber at the thickened ring. Note that anterior to the narrowing at the level of the thickened ring, the perforatorial chamber wall curves and becomes wider. D.) Cross section of a spermatozoon showing the concentric layers (1, 2, 3, 4). Note that the perforatorial chamber does not display any organized perforatorial tubules. AC= acrosome; ARY= acrosome ray zone; LS= lamellar structure; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Pt= perforatorial tubules; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

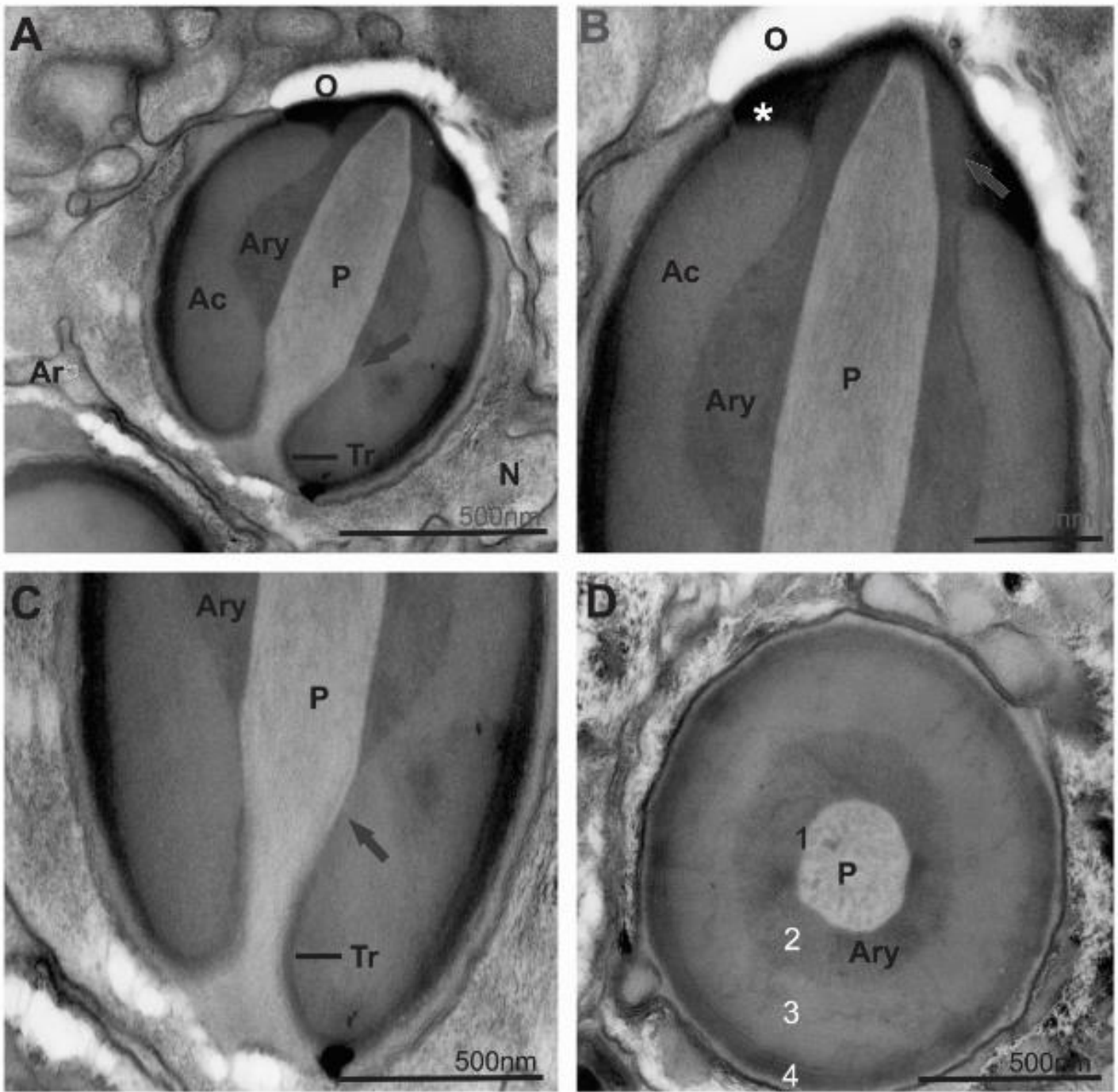


Figure 7. Spermatozoa of *Callinectes sapidus*. A.) A longitudinal section of a spermatozoon showing the thin nucleus and slightly fibrous chromatin. The rounded operculum is slightly protruding and in the interior of the acrosome; the ARY is circular and centrally positioned. General view of the acrosome vesicle showing the perforatorial chamber is rounded ellipsoid with two narrower regions: an apical region next to the subopercular zone and another, more basal region at the thickened ring (arrows). B.) Detail of the operculum showing the arched subopercular zone (arrow) and the narrowing of the apex of the perforatorial chamber. Note the presence of the accessory opercular ring in the subopercular region (arrow). C.) At the base of the acrosome note that the perforatorial chamber wall becomes wider and angled after the thickened ring. D.) Cross section of the acrosome vesicle with concentric layers (1, 2, 3, 4), with the most external layer being the most electron-dense. AC= acrosome; Ar= radial arms; ARY= acrosome ray zone; LS= lamellar structure; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

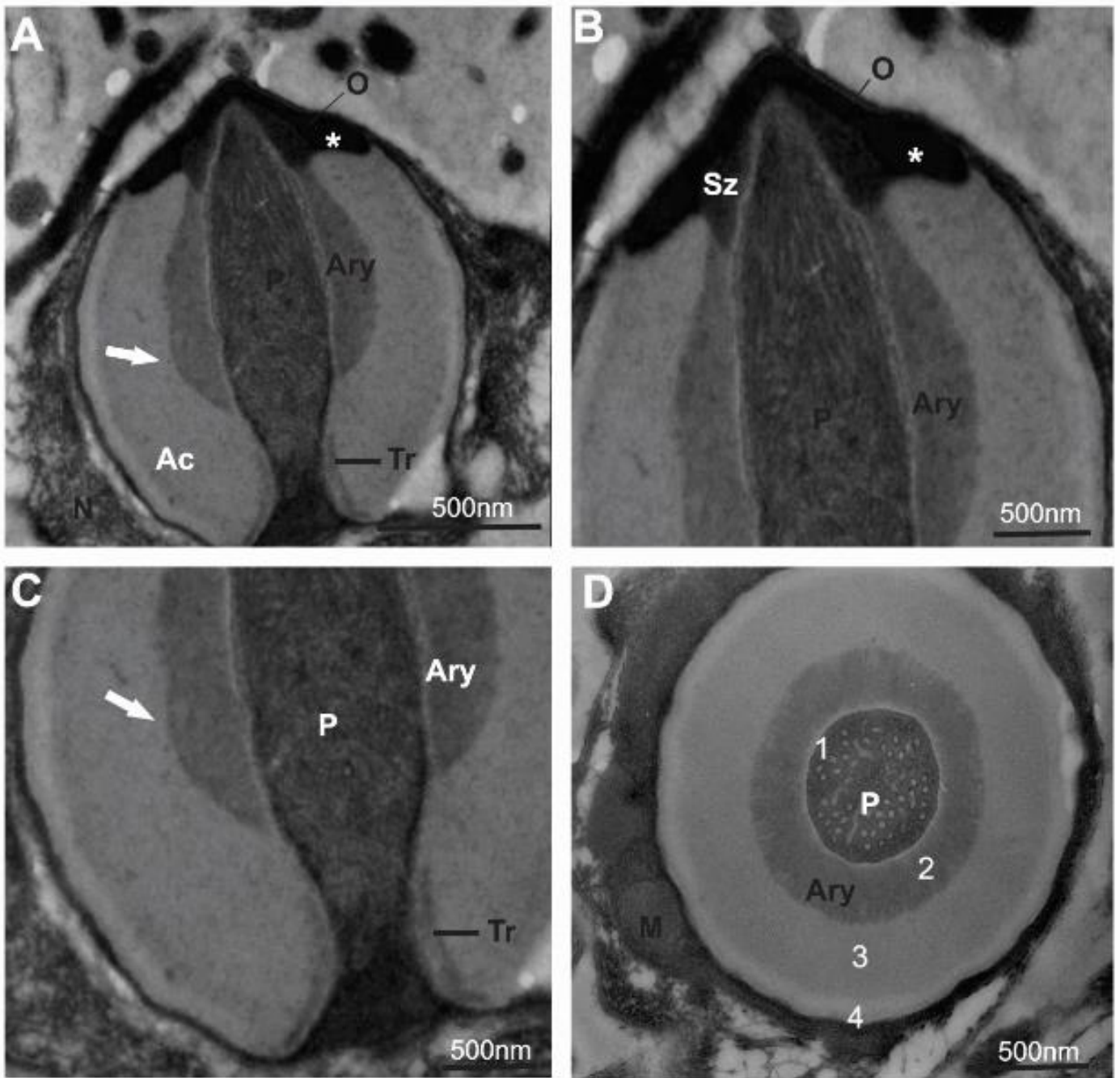


Figure 8. Spermatozoa of *Callinectes bocourti*. A.) Sagittal section of a spermatozoon with a protruding, pointed and conical operculum. The thin nucleus has rather fibrous chromatin. Detail of the acrosome vesicle with the angled ellipsoid perforatorial chamber. Note that the ARY is approximately rounded and centrally positioned. B) Protruding and pointed operculum with the subopercular zone in the shape of an arch. Further note the well-developed accessory opercular ring (*). The apex of the perforatorial chamber is narrow, and the angled portion coincides with the entrance into the subopercular zone. C.) Detail of the thickened ring and angled after this of the perforatorial chamber, D.) Cross section of the acrosome vesicle showing the concentric layers (1, 2, 3, 4), with the most external layer being the most electron-lucent and the perforatorial tubules. AC= acrosome; ARY= acrosome ray zone; M=mitochondrion; N = nucleus; O = operculum; P = perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

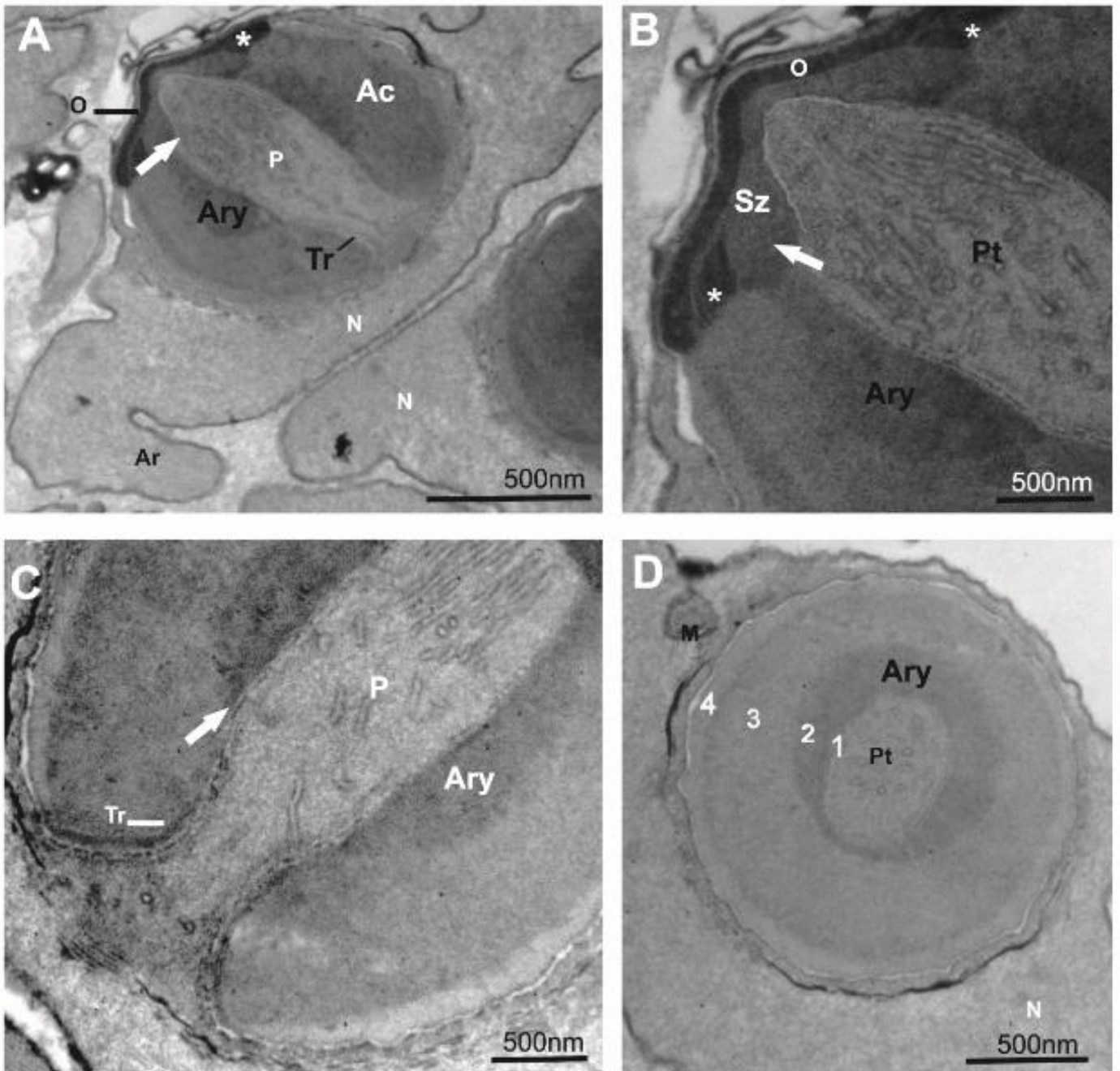


Figure 9. Spermatozoa of *Callinectes rathbunae*. A.) A longitudinal section of a spermatozoon showing the thin nucleus and slightly fibrous chromatin. The rounded operculum is slightly protruding and in the interior of the acrosome; the ARY is circular and centrally positioned. B.) Detail of the operculum showing the arched subopercular zone (arrow) and the narrowing of the apex of the perforatorial chamber that is angled ellipsoid. Note the presence of the well-developed accessory opercular ring (*) C.) At the base of the acrosome note that the perforatorial chamber wall becomes angled after the thickened ring. D.) Cross section of the acrosome vesicle with concentric layers (1, 2, 3, 4), with the most external layer being the most electron-lucent. AC= acrosome; Ar= radial arms; ARY= acrosome ray zone; N=nucleus; O=operculum; P = perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

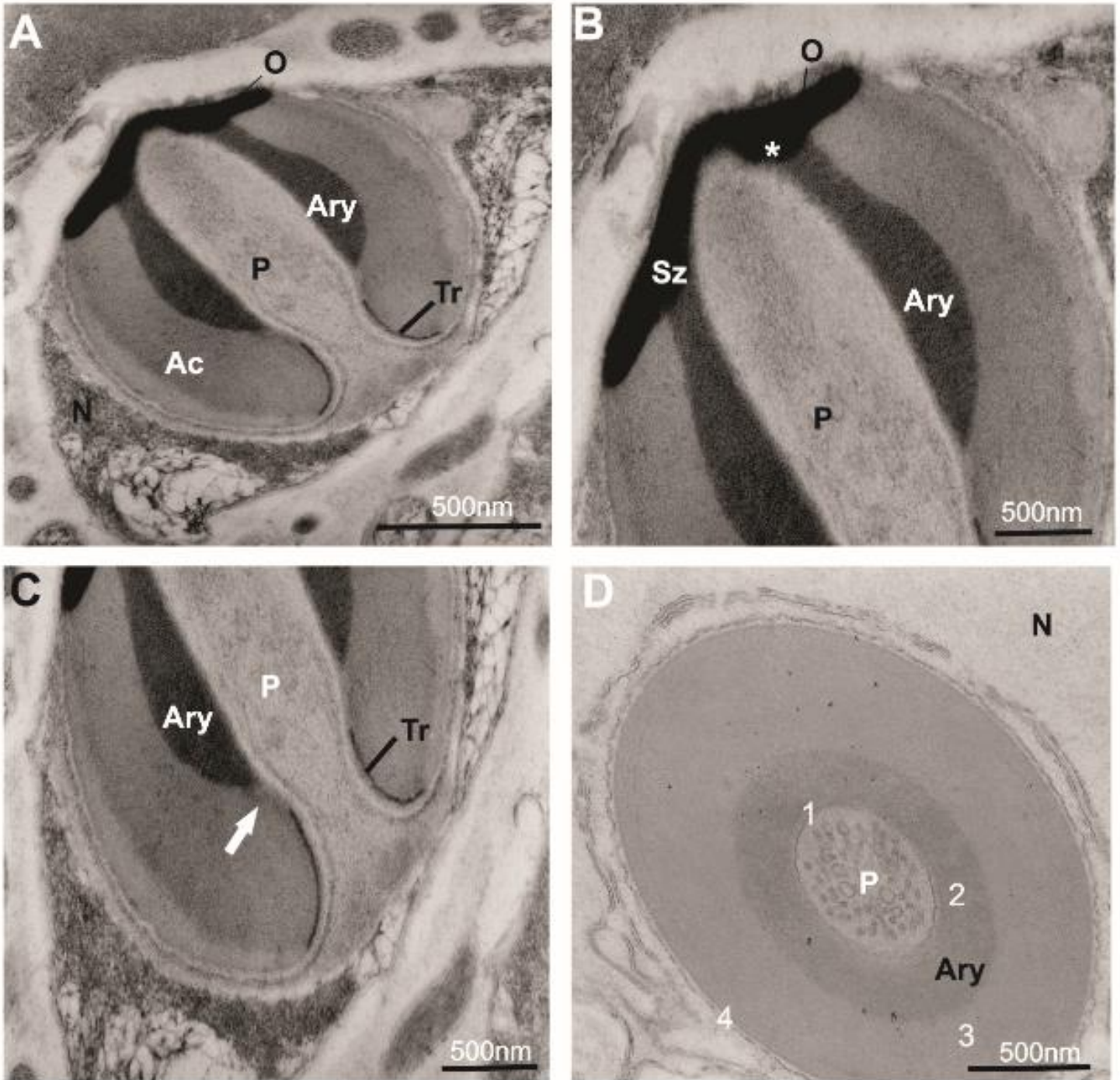


Figure 10. Spermatozoa of *Arenaeus cribrarius*. A.) Note the acrosome vesicle with a flat operculum and the nucleus with fibrous chromatin. Ellipsoid shaped perforatorial chamber with a wide, rounded apex and slightly, electron-dense and curved thickened ring. The subopercular zone is approximately triangular (*) and possesses an accessory opercular ring. C.) Detail of the thickened ring and the morphology of perforatorial chamber. D.) Transverse section of the spermatozoon showing the acrosome vesicle is composed of four concentric layers (1, 2, 3, 4). In the perforatorial chamber, tubules with unequal diameters can be seen. AC= acrosome; ARY= acrosome ray zone; N=nucleus; O=operculum; P = perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

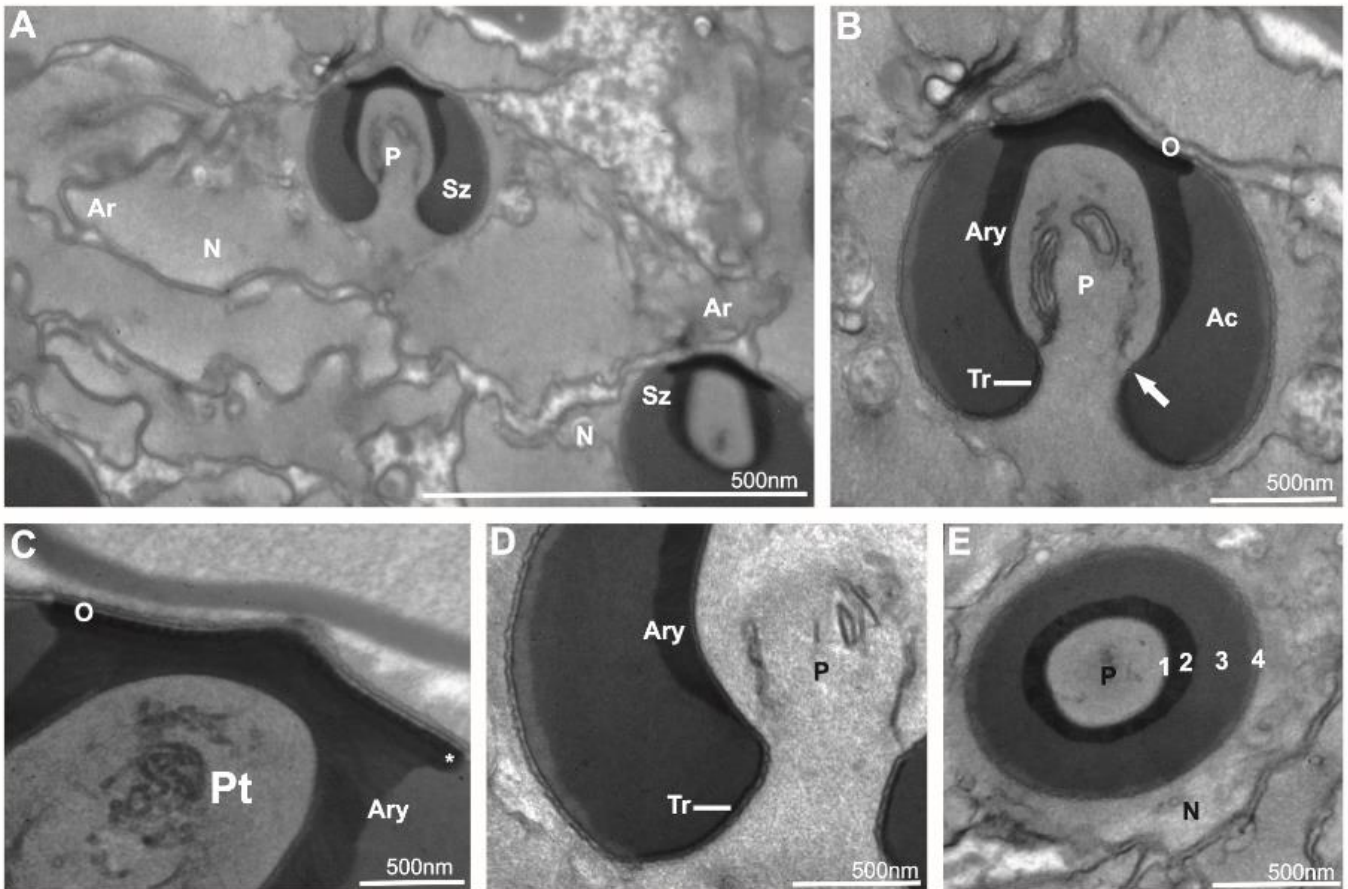
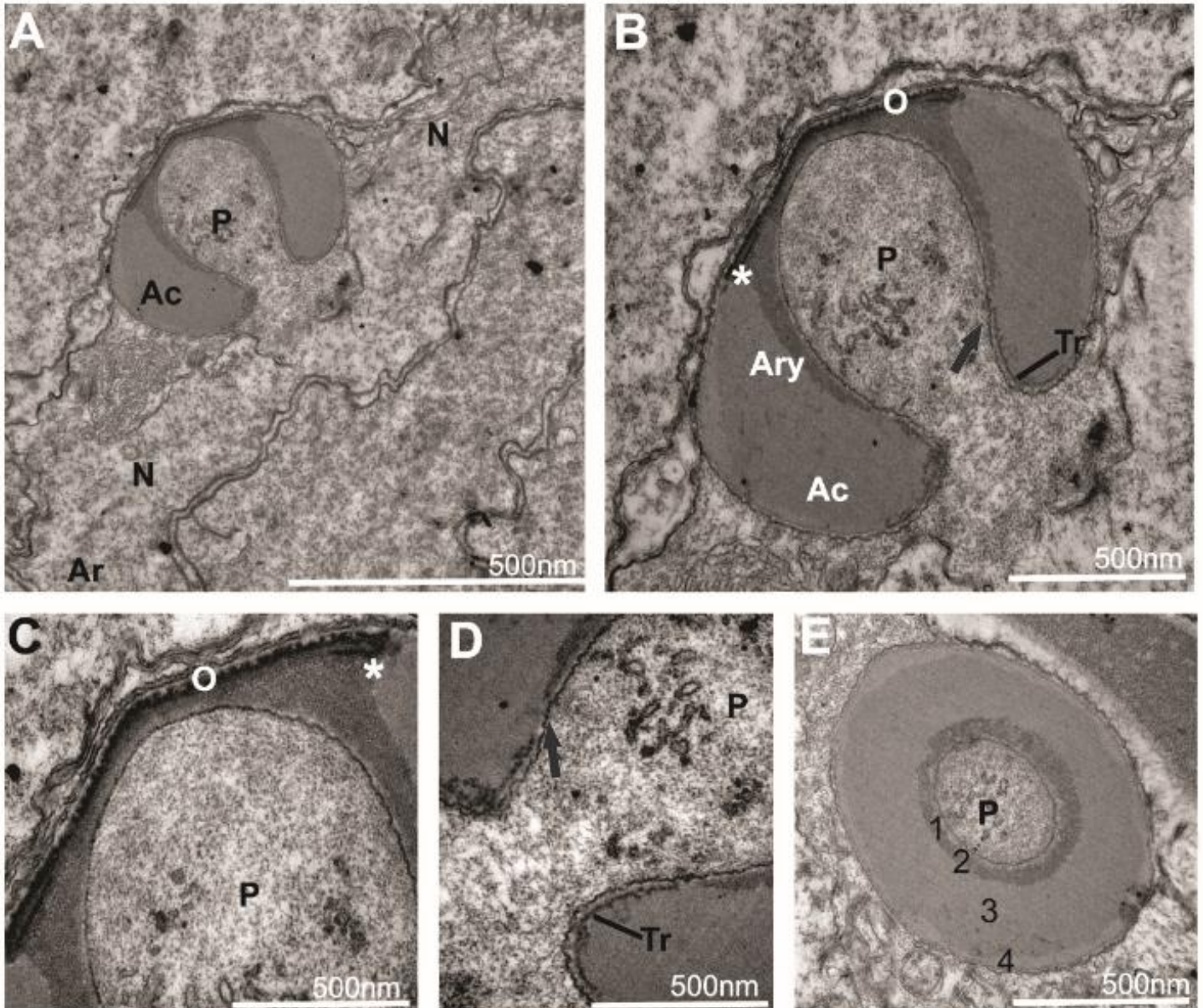


Figure 11. Spermatozoa of *Achelous spinimanus*. A.) Sagittal section of a spermatozoon showing the voluminous acrosome vesicle encircled by the wide nucleus B.) Detail of the large acrosome vesicle with a flat operculum and a perforatorial chamber with a very broadly pyriform format with a rounded apex. Detail of the operculum with a flat and almost imperceptible subopercular zone C.) At the thickened ring, the perforatorial chamber becomes wide with rather accentuated curvature, both anteriorly and posteriorly (arrow). Note the perforatorial tubules D.) Cross section of the acrosome vesicle showing the wide perforatorial chamber and the wider ARY. The pattern of four concentric layers is maintained (1, 2, 3, 4). AC= acrosome; ARY= acrosome ray zone; N=nucleus; O=operculum; P = perforatorial chamber; Pt= Perforatorial tubules; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.



12. Spermatozoa of *Achelous spincarpus*. A.) Sagittal section of a spermatozoon showing the voluminous acrosome vesicle encircled by the wide nucleus with granular chromatin. B.) Detail of the large acrosome vesicle with a flat operculum and a broadly pyriform perforatorial chamber with a rounded apex. Detail of the operculum with a flat subopercular zone (arrow) C.) At the thickened ring, the perforatorial chamber becomes wide with rather accentuated curvature, both anteriorly and posteriorly (black arrow). Base of the perforatorial chamber at the level of the thickened ring, showing the expansion of the perforatorial chamber wall (arrow). D.) Cross section of the acrosome vesicle showing the wide perforatorial chamber and the narrow ARY. The pattern of four concentric layers is maintained (1, 2, 3, 4). AC= acrosome; ARY= acrosome ray zone; N=nucleus; O=operculum; P = perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

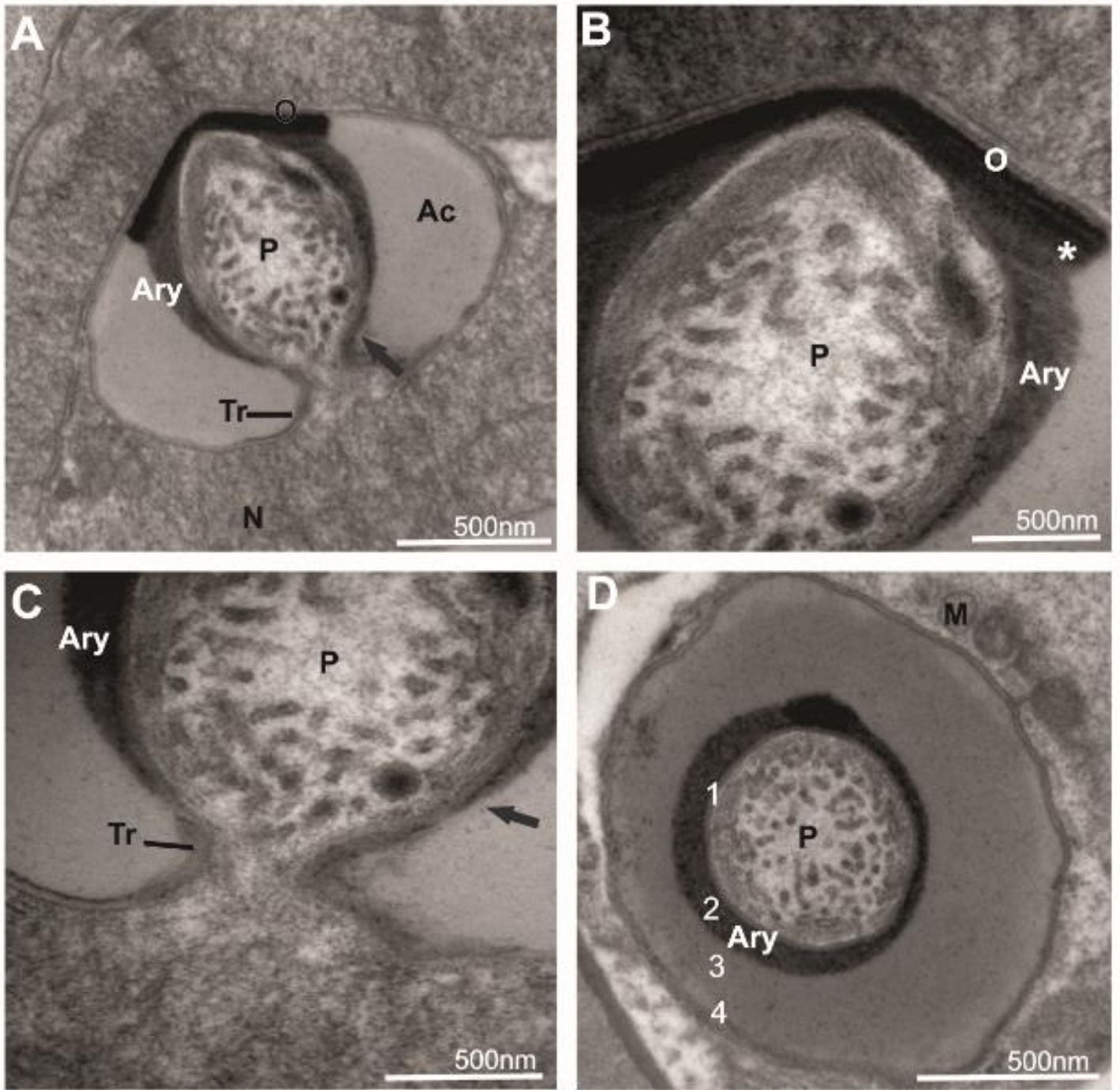


Figure 13. Spermatozoa of *Achelous tumidulus*. A.) longitudinal section of a spermatozoon showing the voluminous acrosome vesicle encircled by the wide nucleus with granular chromatin. B.) Detail of the large acrosome vesicle with a flat operculum and a broadly pyriform perforatorial chamber with a rounded apex. Detail of the operculum with a flat subopercular zone (*) C.) At the thickened ring region, the perforatorial chamber becomes wide with rather accentuated curvature anteriorly (black arrow). D.) Cross section of the acrosome vesicle showing the wide perforatorial chamber with perforatorial tubules and the narrow ARY. The pattern of four concentric layers is maintained (1, 2, 3, 4). AC= acrosome; ARY= acrosome ray zone; N=nucleus; O=operculum; P = perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

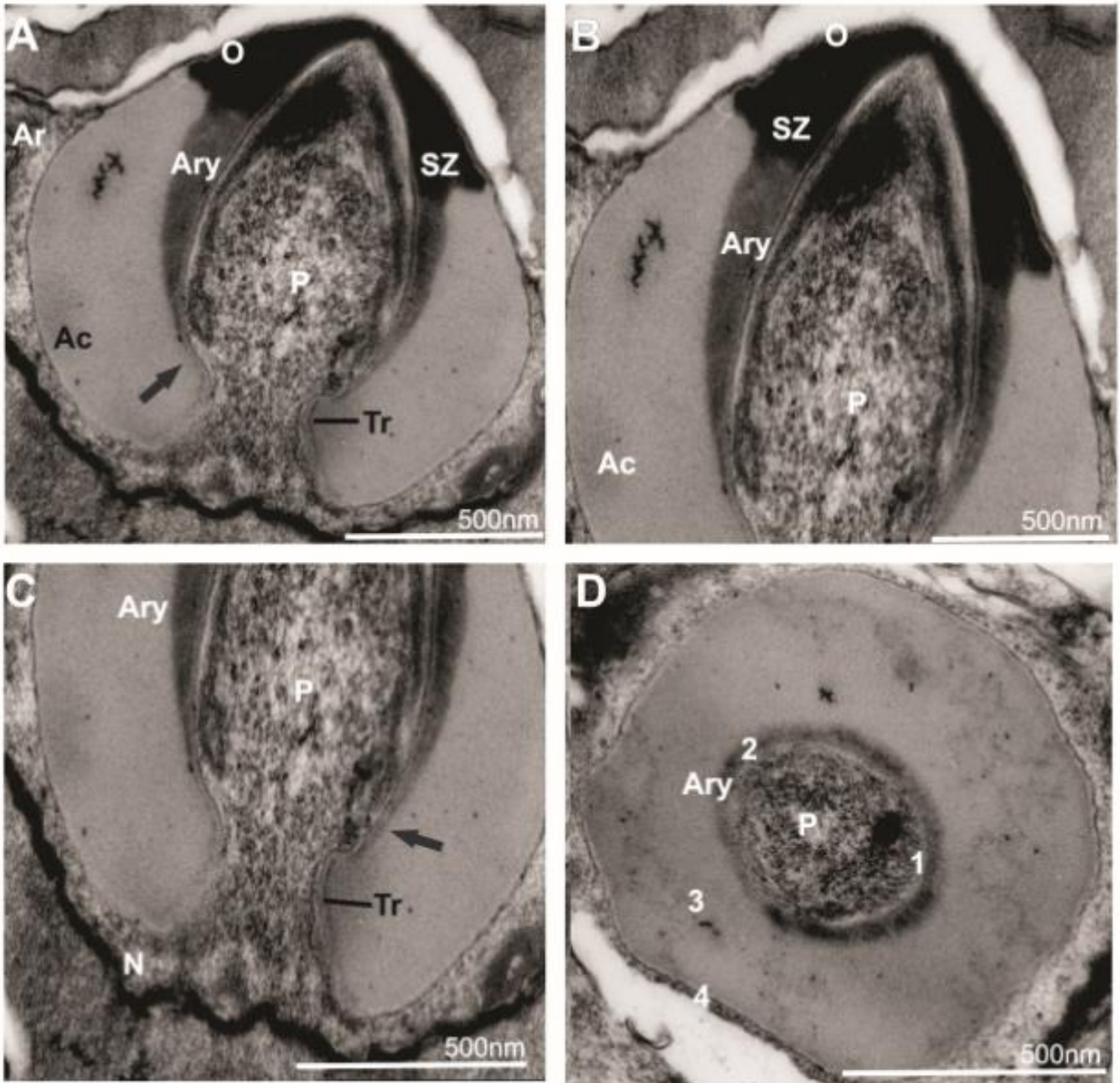


Figure 14. Spermatozoa of *Cronius ruber*. A.) General appearance of a spermatozoon with a thin nucleus and marked lateral arms. The acrosome vesicle is wider than long. B.) Detail of the capitate perforatorial chamber and a protruding, rounded operculum. Note that the arched subopercular zone that extend anteriorly on the perforatorial chamber. C.) Anterior to the thickened ring, the perforatorial chamber wall forms an accentuated curve, and can be observed that the tubules in the apex of the perforatorial chamber are concentrated in the periphery. Detail of the accentuated curvature (arrow) anterior to the thickened ring and the extended ARY. D.) Appearance of a spermatozoon in cross section, with a thin ARY (zone 2) as part of the four concentric zones (1, 2, 3, 4). AC= acrosome; Ar= radial arms; ARY= acrosome ray zone; N=nucleus; O=operculum; P = perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

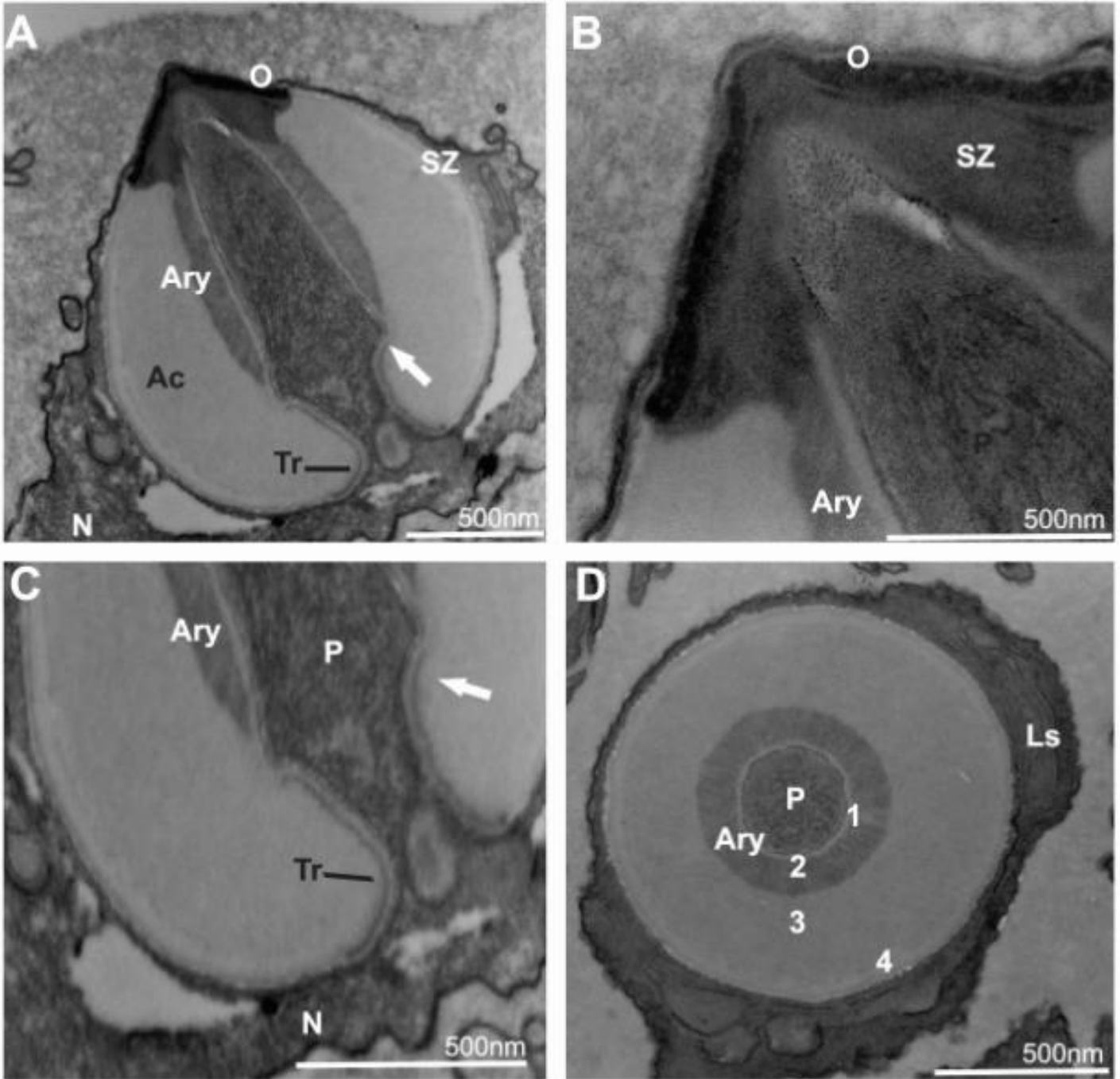


Figure 15. Spermatozoa of *Charybdis hellerii*. A.) Longitudinal section of a spermatozoon showing the protruding and markedly pointed operculum. The perforatorial chamber has the shape of an arrow, with a rather angled region near the thickened ring (arrow). Note the thin ARY around the perforatorial chamber. B.) Detail of the narrow and pointed operculum and perforatorial chamber. Note that the subacrosomal structure forms two triangular subzones without an accessory opercular ring. C.) Large increase in the diameter of the perforatorial chamber at the thickened ring showing the strongly angled portion of the chamber (white arrow). D.) Concentric zones of the acrosome in cross section (1, 2, 3, 4). AC= acrosome; Ar= radial arms; ARY= acrosome ray zone; Ls= lamellar structure; N=nucleus; O=operculum; P = perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr = thickened ring.

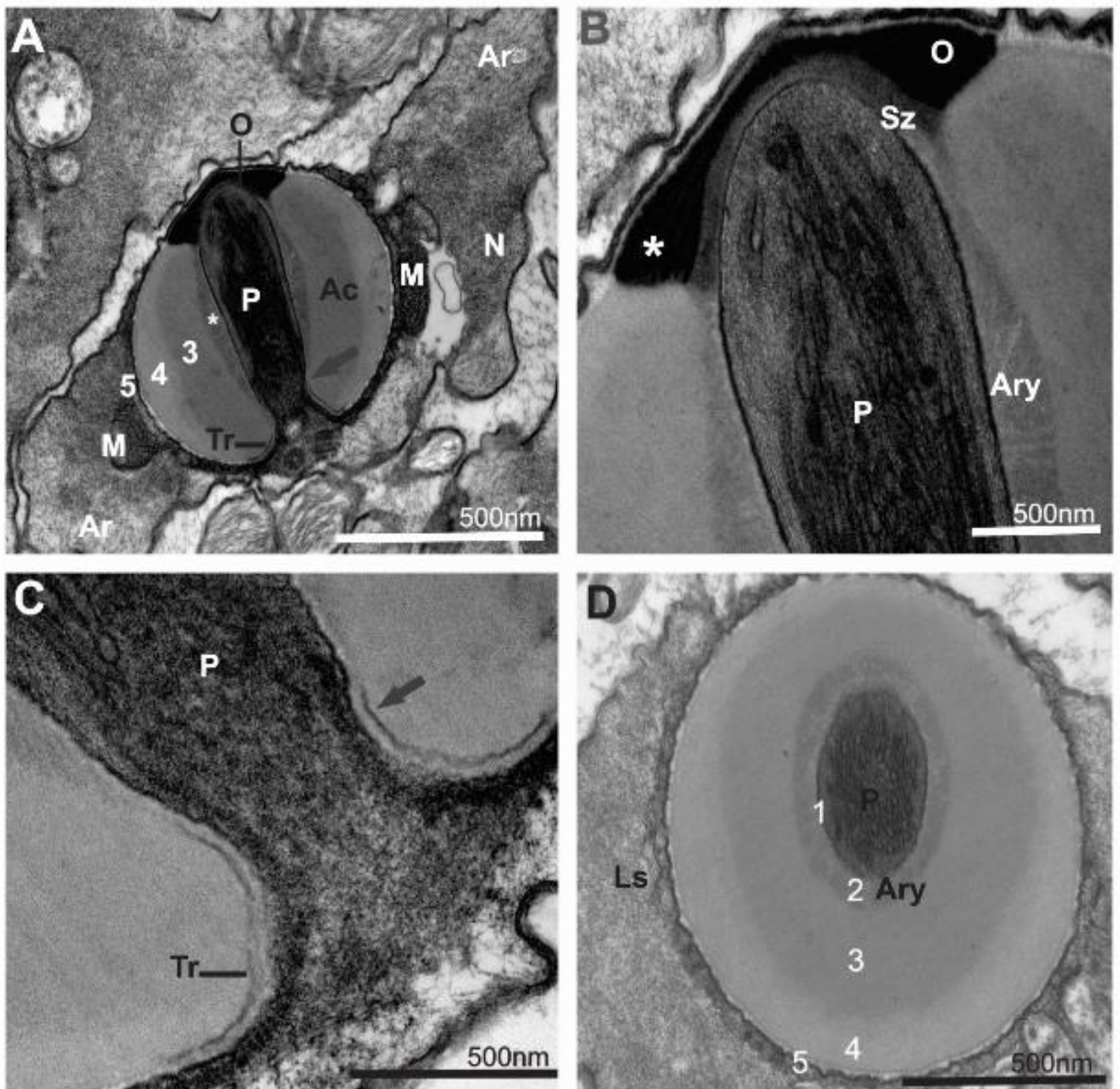


Figure 16. Spermatozoa of *Ovalipes trimaculatus*. A.) Note the acrosome vesicle longer than wider with a short operculum and the nucleus with fibrous chromatin. The narrowly oblong perforatorial chamber with a wide, rounded apex and slightly, electron-dense and curved thickened ring. Apparently, the acrosome vesicle presents five concentric layers, being the last one more electron-dense. B.) The subopercular zone is flat and approximately rounded and possesses an accessory opercular ring in “letter C” format (*). C.) Detail of the narrowly thickened ring (arrow) and the morphology of the perforatorial chamber base. D.) Transverse section of the spermatozoon showing the acrosome vesicle is composed of five concentric layers (1, 2, 3, 4, 5). In the perforatorial chamber, tubules with unequal diameters can be seen. AC= acrosome; Ar= radial arms; ARY and 2= acrosome ray zone (*); Ls= lamellar structure; M= Mitochondrion; N=nucleus; O=operculum; P= perforatorial chamber; Sz= subopercular zone; Tr= thickened ring.

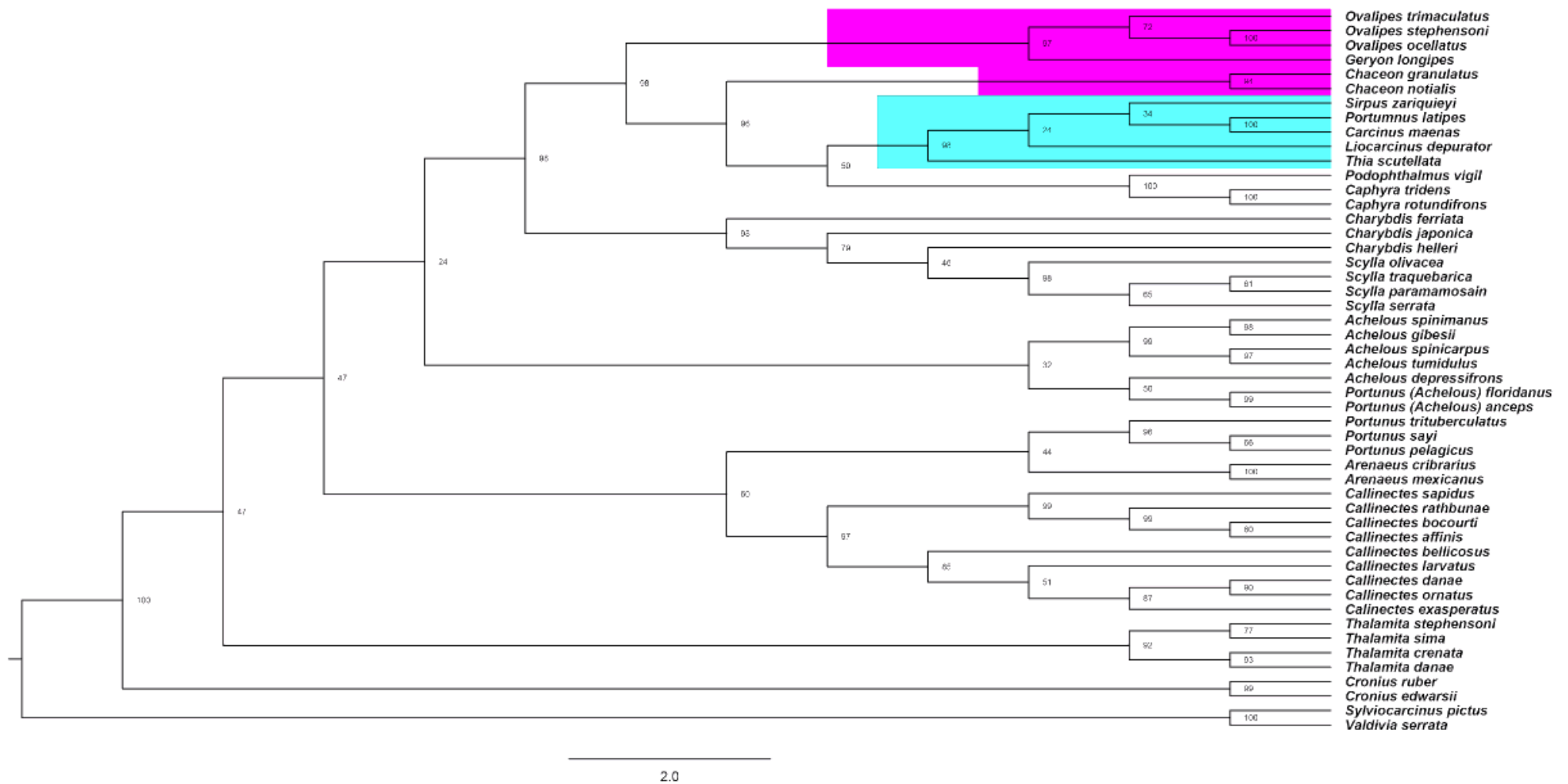


Figure 17. Maximum likelihood (ML) phylograms of Portunoidea based on analyses of 50 species alignment of concatenated 16S rRNA and CO1. Support values appear below relevant branches with ML bootstrap values >50% (based on 1000 replicates). Pink: Geryonidae family; Blue: Carcinidae family; Not highlighted: Portunidae.

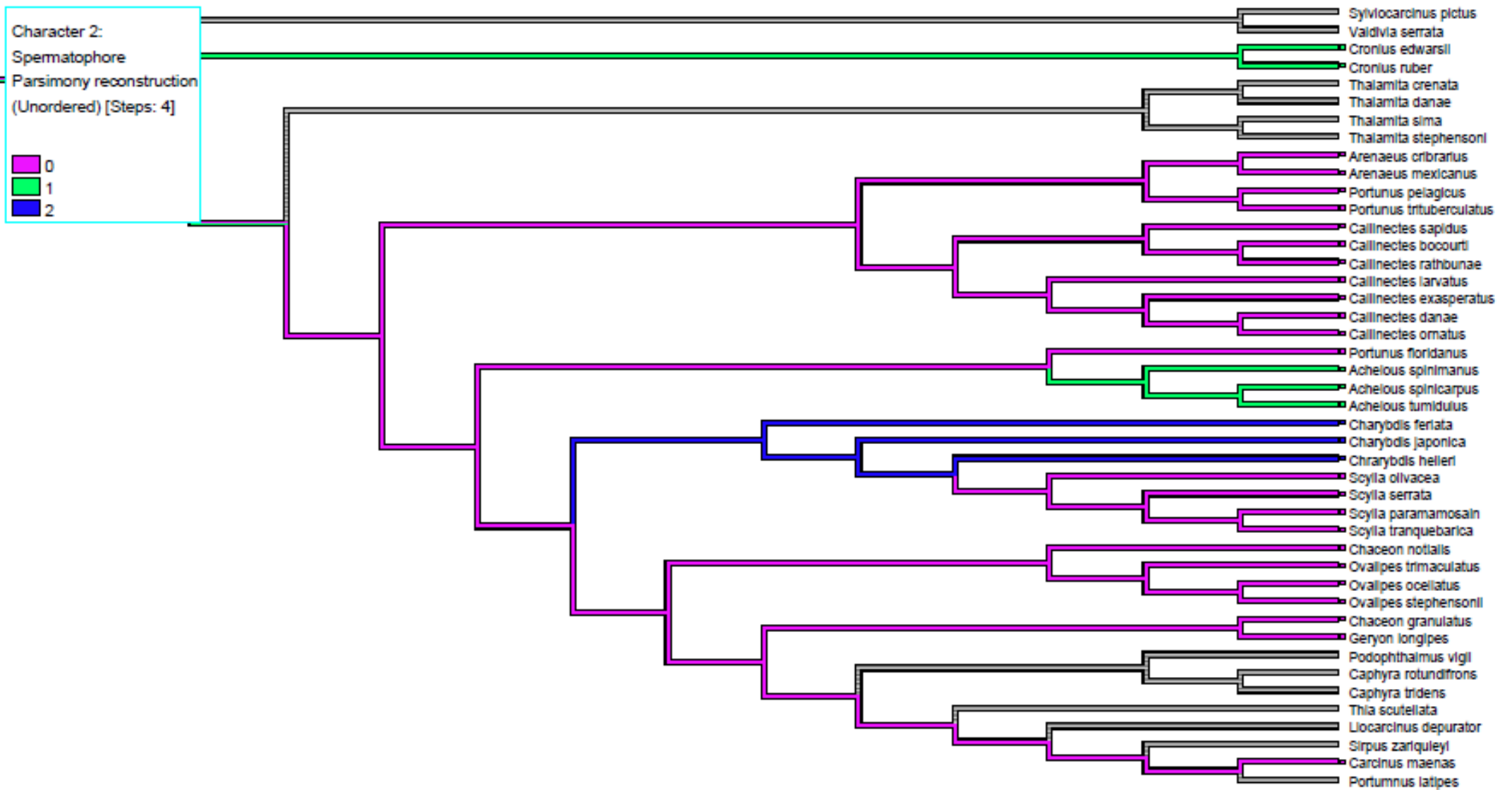


Figure 18. Mapping of the morphological Character 1 (Spermatophore type) traced onto the topology obtained by ML analyses of the combined molecular data (16S and COI). Character states: (0) thick and compact pellicle or spermatophore wall; (1) feeble thin undulated wall, (2) mucous spermatophores and lacks a distinct spermatophore wall.

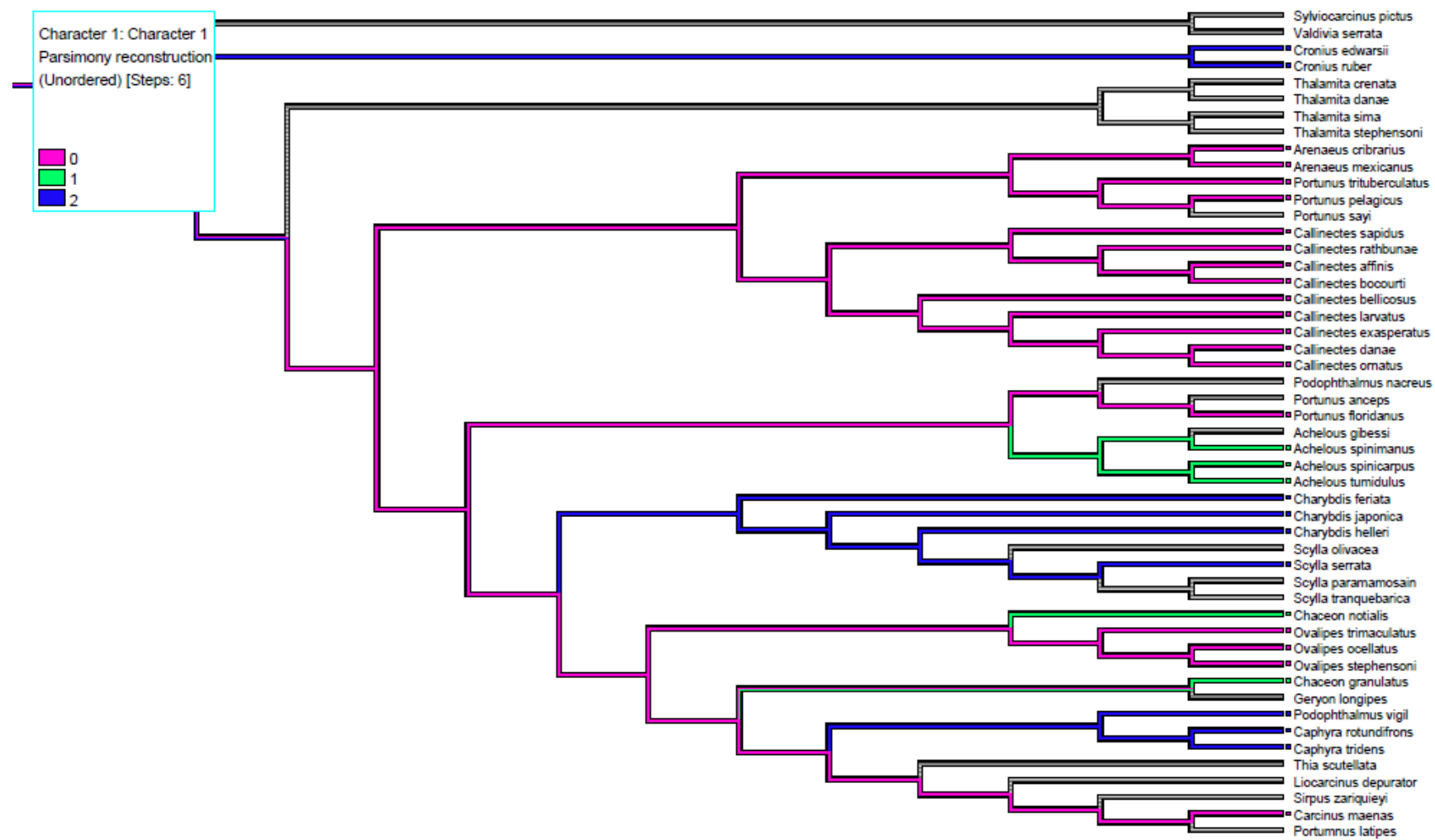


Figure 19. Mapping of the morphological Character 2 (Perforatorial chamber morphology) traced onto the topology obtained by ML analyses of the combined molecular data (16S and COI). Character states: Ellipsoid (0); Pyriform (1) fusiform (2).

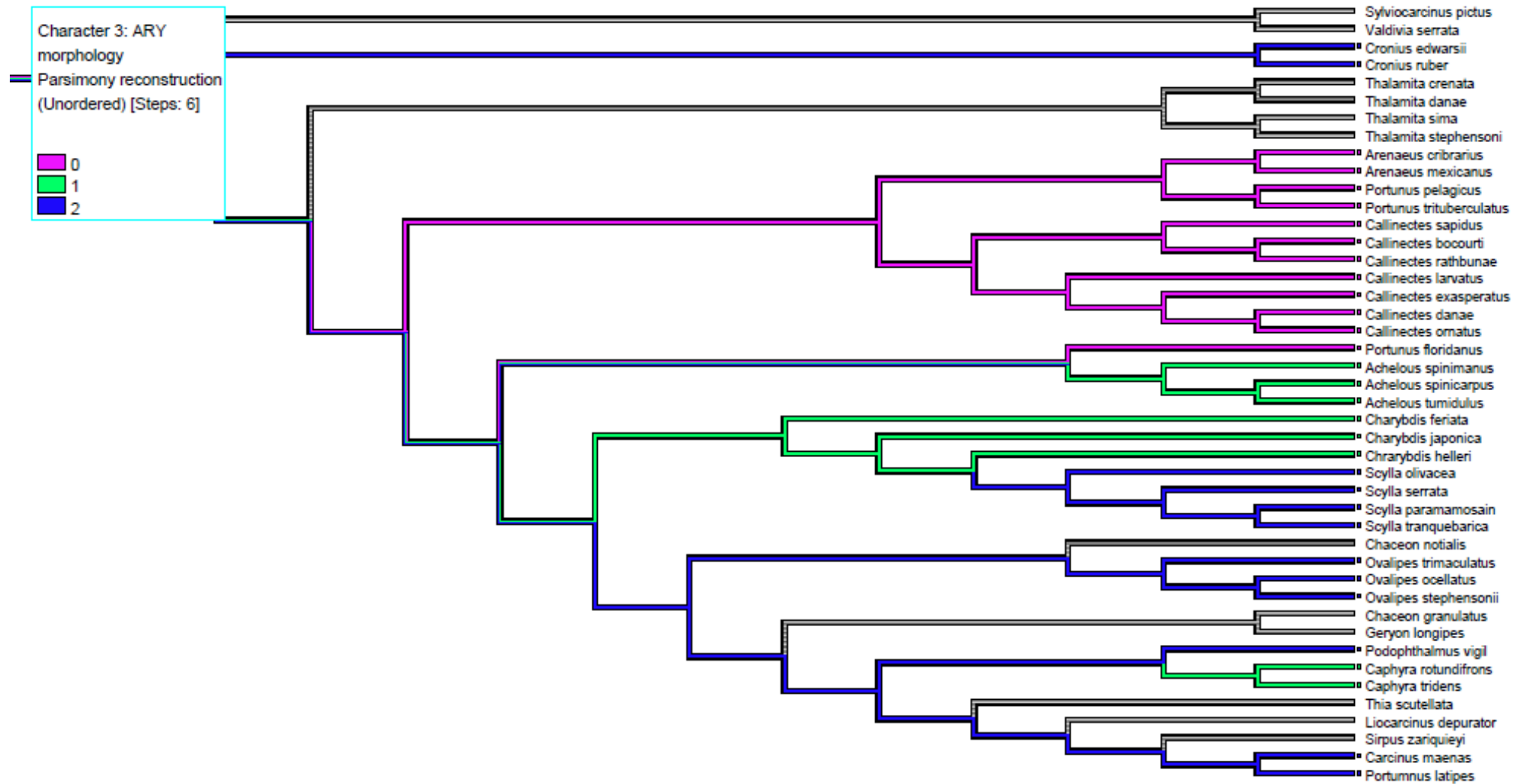


Figure 20. Mapping of the morphological Character 3 “(ARY morphology)” traced onto the topology obtained by ML analyses of the combined molecular data (16S and COI). Character states: thick, rounded and medially enlarged (0); narrow and enlarged anteriorly (1); narrow and slightly enlarged medially (2).

Table 1 – Specific ultrastructural traits used for the species of Portunidae in the present study.

Characters	<i>Callinectes danae</i> ^{*1}	<i>Callinectes ornatus</i> ^{*1}	<i>Callinectes exasperatus</i> ^{*1}	<i>Callinectes larvatus</i> ^{*1}	<i>Callinectes sapidus</i> ^{*1; 8}	<i>Callinectes bocourti</i> ^{*1}	<i>Callinectes rathbunae</i> ^{*1}	<i>Arenaeus cribrarius</i> ^{*1}	<i>Achelous spinimanus</i> ^{*1}	<i>Achelous spinicarpus</i> ^{*1}	<i>Achelous tumidulus</i> ^{*1}	<i>Portunus pelagicus</i> ^{*5}	<i>Portunus trituberculatus</i> ^{*4}
Spermatophore	A*	A*	A*	A*	A*	A*	A*	A*	B*	B*	B*	A*	A*
Acrosome length/width	1.0	1.2	1.2	1.0	1.2	1.2	1.0	1.0	0.8	0.7	0.7	1.0	1.0
Operculum	protruding triangular	protruding triangular	protruding round	flat round	protruding round	protruding triangular	protruding triangular	flat round	flat round	flat round	flat round	protruding triangular	flat round
Accessory opercular ring	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	apparently present*	?
Lateral subopercular zone	triangular	triangular	arched	triangular	arched	arched	arched	triangular	flat	flat	flat	triangular	?
Perforatorium	rounded ellipsoid	rounded ellipsoid	rounded ellipsoid	rounded ellipsoid	angled ellipsoid	angled ellipsoid	angled ellipsoid	ellipsoid	very broadly pyriform	broadly pyriform	broadly pyriform	narrowly ellipsoid	narrowly ellipsoid
Perforatorium Apex	deeply deltoid	deeply deltoid	shallowly deltoid	shallowly deltoid	finely trullate	finely trullate	finely trullate	shallowly deltoid	depressed ovoid	depressed ovoid	depressed ovoid	narrowly very shallowly deltoid	very shallowly deltoid?
Perforatorium base	narrow	narrow	wide	wide	narrow	narrow	narrow	narrow	wide	wide	wide	narrow	narrow
Perforatorium after thickened ring	curved	curved	curved	curved	angled	angled	angled	curved	curved	curved	curved	curved	curved
Acrosome ray zone	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A
Chromatin	granular	granular	granular	granular	fibrous	fibrous	granular	fibrous	granular	granular	granular	fibrous	fibrous

Characters	<i>Cronius ruber</i> * ¹	<i>Charybdis helleri</i> * ¹	<i>Podophthalmus vigil</i> * ²	<i>Caphyra rotundifrons</i> * ²	<i>Scylla serrata</i> * ⁶	<i>Ovalipes trimaculatus</i> * ¹	<i>Ovalipes molleri</i> * ²¹	<i>Ovalipes ocellatus</i> * ³	<i>Chaceon fenneri</i> * ¹	<i>Carcinus maenas</i> * ⁷	<i>Xaiwa sp</i> * ²¹
Spermatophore	B*	C*	?	?	A*	A*	A*	A*	A*	A*	?
Acrosome length/width	0.9	1.0	0.9	1.0	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9
Operculum	protruding round	protruding triangular	protruding round	protruding triangular	protruding triangular	protruding triangular	protruding triangular	protruding triangular	protruding round	protruding round	flat round/perforated ?
Accessory opercular ring	present	present	?	?	apparently present*	present	present	present	present	Apparently absent*	?
Lateral subopercular zone	arched	triangular	arched	triangular	triangular	arched	triangular	triangular	arched	triangular	arched
Perforatorium	fusiform (spades-shaped)	narrowly fusiform (arrow-shaped)	narrowly fusiform (spades-shaped)	narrowly fusiform	fusiform?	narrowly ellipsoid	narrowly ellipsoid	narrowly ellipsoid	pyriform	Narrowly fusiform	ellipsoid
Perforatorium Apex	narrowly trullate	very finely falciform	very finely falciform	shallowly deltoid	deltoid?	very shallowly ovoid	very shallowly ovoid	very shallowly ovoid	depressed ovoid	very shallowly ovoid	very shallowly ovoid
Perforatorium base	wide	narrow	wide	wide	narrow	narrow	narrow	narrow	wide	wide	wide
Perforatorium after thickened ring	curved	angled	curved	curved	curved	curved	curved	curved	curved	curved	curved
Acrosome ray zone (Ary)	C	B	C	B	C	C	C	C	?	C	C
Chromatin	granular	granular	granular	granular	fibrous	fibrous	granular	fibrous	granular	granular	granular

*¹Present work; *²Jameison & Tudge (2000); *³Hinsch (1986); *⁴ Li (1995); *⁵ Jamieson (1989), Jamieson & Tudge (1990), Stewart et al (2010); *⁶Wang et. al. (1997); *⁷ Pearson and Walker (1975), Reger et al (1984); *⁸Brown (1966); *⁹ Hinsh (1988). ! not used in the molecular reconstruction. ? not described, neither seen or clearly seen in the micrograph. In the species, that we put that the characters is "apparently" absent or present it is due to the difficult of clarity for observation in the micrographs (literature), even though the author did not mention it. Spermatophores: A*(rounded format, usually with the same size and shows thick and compact pellicle or spermatophore wall with a smooth external surface); B* (elliptical format with different sizes and a feeble thin ondulated wall); C* (mucous spermatophores

and lack a distinct spermatophore wall (highly irregular surface). ARY: A (Thick, rounded and medially enlarged); B (narrow and enlarged anteriorly); C (narrow and slightly enlarged medially).

Discussion

In the present study, we are trying to trace the evolution of spermatozoa characters in Portunoidea. We are assuming that the underlying phylogeny in which we map the spermatozoal morphological characters, obtained in previous steps, has already been tested (although incompletely or not described). Furthermore, we are limited to using only a few portunoids species because the morphological characters of the spermatozoa have only been described for a few representatives. In fact, we are presenting new data on the morphology of the spermatozoa for 14 out of the 24 species included in the morphological, and 50 in phylogenetic analysis. However, the analysis of ancestral states is central to solving questions on the evolution of spermatozoa of portunoids as apomorphies or convergent evolution. Finding the ancestral state of a character will in time help us to explain how a character evolved in response to some evolutionary pressure. Although many of the 10 spermatozoa and spermatophore characters analyzed show a morphology that can be associated to a specific genus, character state reconstruction for most characters showed a clear pattern of evolution. Of these 10 characters analyzed, three of them provided support for relationships in Portunoidea: spermatophore ultrastructure, acrosome ray zone (ARY) and perforatorial chamber morphology.

Nevertheless, some topological incongruence was recovered between Maximum-likelihood (ML) analyses of this concatenated data set. This conflict was associated with deeper nodes in Portunoidea and involved the relative placement of a well-supported “*Cronius*” *sensu lato* clade. This conflict may be an artifact of the low taxon sampling available in this phylogeny of Thalamitinae representatives. In this work, Portunoidea superfamily was a monophyletic group, and the same results are point in Mantelatto et al. (2009), Spiridonov et al. (2014) and Evans (2018). In the phylogeny proposed here, Portunidae appears as polyphyletic, probably due to the same inconsistency mentioned above for Portunoidea, similar to the one proposed by Evans (2018), which indicates that subfamilies may not represent reciprocally monophyletic clades. Despite being a single marker ML analyses, the generally recovered were resolved topologies and displayed significant well supported in majority clades. Ancestral character reconstruction was performed to explore evolutionary changes across representatives of thirteen genera of Portunoidea in an attempt to identify spermatozoal synapomorphies that might be defining some of the clades. Special effort was made to identify characters separating the Carcinidae, Geryonidae and Portunidae families’ *sensu* Evans (2018), beyond mainly

Callinectes from *Arenaeus*, *Portunus* from *Achelous*, and two internal clades previously observed in *Callinectes*, moreover other portunids genera.

In general, all species analysed share some distinct characteristics in the spermatophore morphology, that was useful to group species providing adequate support for taxonomic or relationship analyses, similar to that occurs in different groups of Brachyura, as Majoidea (Tudge et al., 2014; Assugeni et al., 2017). The morphology of the Portunoidea spermatophores demonstrated to be a phylogenetic signal capable of grouping the genera into more closely related clades. In this way, it was possible to relate the morphology of the spermatophores with their reproductive sperm transfer strategy. In all sperm plug formers, Portunoidea species of the genera *Callinectes*, *Arenaeus*, *Portunus*, *Scylla*, *Ovalipes*, *Chaceon*, and *Carcinus* (Ryan, 1967; Pearson & Walker, 1975; Hinsch, 1986; 1988; Li, 1995; Zara et al., 2012; Nascimento & Zara et al., 2014; Watanabe et al., 2020) the spermatophores are rounded, generally of similar sizes, with a thick and compact spermatophore wall or pellicle. Thus, we propose that the spermatophore morphology of these species is linked to the type of spermatophore dehiscence since this process occurs more slowly. This is in accordance to the fact of the presence of spermatophores intact (with a wall) in the sperm plugged seminal receptacle of females, and the dehiscence is synchronous with the dissolution of the sperm plug during the ovarian development (Zara et al., 2014; Assugeni et al., 2021). Furthermore, this idea can be extended to the Platyxanthidae *Homalaspis plana* (H. Milne Edwards, 1834) also a Heterotremata related to the Portunoidea (Karasawa & Schweitzer, 2008), which also form a sperm plug and presents the same morphology of spermatophore with a rigid wall (Pardo et al., 2019).

In contrast, when the spermatophores of *Achelous* and *Cronius* was observed, we noted that they have an elliptical shape, with an undulated, thin and delicate spermatophore wall. Thus, the difference in the ultrastructure of the spermatophores of *Achelous* and *Portunus* confirms, once again, the phylogenetic separation of these two genera, since they were once considered to belong to the same genus. In *Achelous* and *Cronius*, the occurrence of sperm plug has not been demonstrated so far, therefore, the spermatophores are related to the absence or presence of sperm plug. When we analyzed the phylogeny proposed in this work and the most recent for Portunoidea (Evans, 2018), a clade containing *Achelous* species can be noticed. In this way, this type of spermatophore seems to be an *Achelous* synapomorphy while a homoplasy to other Portunidae as *Cronius*. Even more, the elliptical spermatophores, with an undulated, thin and delicate wall has been observed only in members of Portunidae.

The species of *Charybdis* (Thalamitinae) has a more diverse spermatophore morphology among the Portunoidea, which are mucous, formed by a mass of secretions, and absence of a distinct spermatophore wall or pellicle. Moreover, these coenospermic spermatophores have a highly irregular surface, varying in size, shape, and number of spermatozoa even with some cleistospermic spermatophores found in the vas deferens (Watanabe et al., 2022). These last authors proposed that *Charybdis* is not sperm plug formers according to the very low gonadosomatic index, male reproductive system morphology and ultrastructure and spermatophore dehiscence process. The absence of a typical wall in the spermatophore may be an evidence of sperm plug absence that needs to be checked in future works when describing Portunoidea male reproductive system. In general, the difference between the spermatophore of *Ch. helleri*, *Cronius* and the Portuninae of the genus *Achelous* is merely the absence of a thin and feeble wall, generally more electron-dense, not compact, which is very different from the spermatophores of the sperm plug forming species. Thus, the similarity of *Achelous* and *Cronius* spermatophores may be a homoplasy in Portunidae, based on the species studied here. Furthermore, these spermatophores morphology (*Cronius* and *Achelous*) required to be studied from the point of view of its formation in the male reproductive system, considering the aspects of dehiscence and presence or absence of sperm plug, as is already evidenced in both Portunidae and Inachoididae (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara et al., 2014; Zara et al., 2014; Watanabe et al., 2020; Antunes et al., 2018). So, once the absence of sperm plug formation in *Achelous*, *Cronius* and *Charybdis* within Portunoidea is confirmed, the type of spermatophore can be considered an indicative trait related to the sperm plug production, which is essential for understanding the absence of sperm competition in Portunoidea (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013; Zara et al., 2014; Watanabe et al., 2020, 2022; Assugeni et al., 2021).

The ultrastructure of spermatozoa of Portunoidea has a typical morphology of Eubrachyura crabs, as the presence of radial arms, typical Heterotremata thickened ring strongly electron-dense operculum and spherical and slightly flattened shape of the acrosome vesicle. Those characteristics are considered plesiomorphic in this context (Jamieson & Tudge, 2000; Tudge et al., 2014). For the Portunoidea analyzed in this study, we observed that the nucleus has granular to fibrous chromatin and lateral arms. Additionally, they display a not perforated operculum, which varies in morphology and thickness, and just below this structure, there is the formation of the subopercular zone as described for other decapods (Jamieson & Tudge, 1994; Jamieson, 2000).

The morphological characters of the spermatozoa that can be used to group species were the morphology of the perforatorial chamber and ARY. The presence of an ellipsoid perforatorial chamber is a general feature found for Portunidae. In this way, we noticed that each more closely related genera and group presented specificities in relation to this one structure, that provide an adequate separating of species in genera. As well as, in the literature, the morphology of the perforatorial chamber was a key tool for the recovery of ancestral character and relationships for Dromiidae, Mithracidae, Calappidae, Aethridae and Menippidae (Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018; Camargo et al., 2020).

Even more, the ultrastructure of the spermatozoa of our phylogenetic analysis recovered two lineages within the genus *Callinectes*, similar to previously published phylogenies (Robles et al., 2006): the “*danae*” and the “*bocourti*” groups. The “*danae*”- group contains: *C. ornatus*, *C. danae*, *C. exasperatus*, *C. bellicosus* and *C. larvatus*, while the “*bocourti*”- group clusters: *C. sapidus*, *C. bocourti*, *C. affinis* and *C. rahbunae*. The spermatozoal ultrastructural data strongly corroborate the findings based on molecular data obtained to lineages within *Callinectes*. Furthermore, ultrastructure of the perforatorial chamber and its apex in the subopercular zone shows that *C. exasperatus* shares some spermatozoal characters (perforatorial chamber: rounded ellipsoid) with *C. larvatus*, *C. danae*, *C. ornatus* and *C. bellicosus*. Similar spermatozoal traits (perforatorial chamber: angled ellipsoid) were also found for *C. bocourti*, *C. sapidus*, *C. rathbunae*, *C. affinis*.

In our analysis, the spermatozoal character (operculum morphology) are decisive to separate *Callinectes* to *Arenaeus*. The operculum morphology is protruding rounded in *Callinectes* and in *Arenaeus* is flat round. Thus, confirming the sharing of characters, and are in accordance with the placement of these two clades as a sister group, as was well evidenced in Robles et al. (2006), Mantelatto et al. (2009), Spiridonov (2014) and Evans (2018). However, a flat and round, but slight-centrally protruding operculum separates *Arenaeus* from *Callinectes* and from all other members of Portunidae. This spermatozoal character is discrete and we have been conservative in our morphological analysis.

For the genus *Portunus*, through the micrographs published in the literature for *P. pelagicus* (Stewart et al., 2010) and *P. trituberculatus* (Li, 1995) we classified the morphology of the perforatorial chamber as narrowly ellipsoid. Thus, the synapomorphy of *Callinectes*, *Arenaeus* and *Portunus* can be considered the perforatorial chamber with ellipsoid morphology. The ARY is thick and enlarged medially, as well as the general morphology of the acrosome, which has a similar ratio length/width in three genera. Furthermore, the opercular surface

appears smooth in all these genera, at least for the species analyzed here and in micrographs from the literature (Jamieson, 1989; Li, 1995; Stewart, 2010). Thus, also corroborating the phylogeny proposed by Spiridonov (2014) and Evans (2018). In addition, it was possible to observe the presence of subopercular ring in all these genera closely related above, with for exception of *Portunus*, which was not identified in the micrographs, despite being apparently present (Jamieson, 1989; Li, 1995; Stewart, 2010).

The perforatorial chamber morphology also validates the designation of *Achelous* as an independent lineage from *Portunus*. In the *Achelous* is noticed the pyriform type and in the sperm plug formers *Portunus* are narrowly ellipsoid. In this work, in the three species of the genus *Achelous* it is noted that the perforatorial chamber has a general morphology that is broadly pyriform type, but in *A. spinimanus* has a very broadly pyriform format, which corroborates the separation of this species in a different clade from *A. spinicarpus* and *A. tumidulus* as showed in the phylogenetic hypothesis of this work and in Evans (2018). In this way, the species *A. spinicarpus* and *A. tumidulus* are more closely related, as shown in the phylogeny of this work and in the literature (Evans, 2018). Moreover, *A. spinimanus* differs from the other *Achelous* also by the morphology of the operculum, which is protruding round; while in the other two species of the genus, it is of a flat round type. In addition, the ARY, which in this *A. spinimanus* has a dilatation in the anterior and posterior region, while in *A. spinicarpus* and *A. tumidulus* this dilation occurs only in the anterior region. Furthermore, there is another feature that separates the *Achelous* clade: the morphology of the acrosome that is so wider and rounded than all other Portunoidea members. In addition, the ultrastructure of the spermatozoa also corroborates the phylogeny that proposes the change of *Cronius tumidulus* to *Achelous tumidulus* (Mantelatto et al., 2009). The spermatozoa ultrastructure is conclusive and perfectly fits the characters that distinguish the genus *Achelous* from other Portunoidea and even more to *Cronius*. The phylogeny proposed here corroborates the other ones already proposed (Karasawa et al., 2008; Mantelatto et al., 2009; Nguyen, 2013; Schubart & Reuschel, 2009; Spiridonov et al., 2014) and has high support in the separation of “*Achelous*” from “*Portunus*”. Once, by the spermatozoa ultrastructure is possible to separate very well two distinct groups. There are exceptions as *Portunus (Achelous) floridanus* Rathbun, 1930 and *Portunus (Achelous) anceps* (de Saussure, 1857) that were inserted *Achelous* group, but with medium support, being difficult to corroborate or not with this classification, since there is no ultrastructure of the spermatozoa of these species for comparisons and the spermatozoa ultrastructure of this species can be a decisive tool for elucidation their position in future works.

In the Thalamitinae studied here, the character that groups these animals is the perforatorial chamber morphology that has a general fusiform format, which in *Cronius* is fusiform (spades-shaped), while in *Charybdis* is narrowly fusiform (arrow-shaped). In addition, the differences observed are in relation to the ARY, which in *Cronius* is similar to the genus *Achelous*, while in *Charybdis*, despite being very thin, remembers the morphology observed in *Portunus* and *Arenaeus*. Furthermore, the length/width ratio of the acrosomal vesicle of *Cronius* is similar to *Achelous*, while *Charybdis* is more similar to the species of the genus *Callinectes*, *Arenaeus* and *Portunus*. However, both the morphology of the perforatorial chamber of *Caphyra* and of *Podophtalmus* remembers the fusiform type that is characteristic of the Thalamitinae described in this work. In this way, the morphology of the perforatorial chamber and the acrosomal ratio of *Podophtalmus* is very similar to *Cronius* (spad-shaped), however the morphology of ARY and the acrosomal ratio are more reminiscent of the genus *Charybis* and the clade of *Callinectes*, *Portunus* and *Arenaeus*. In turn, the ARY of the genus *Caphyra* are similar the *Cronius* and *Achelous* species studied here. In our molecular phylogeny, these species are apparently classified into Thalamitinae, but with not a clear resolution, probably due to the low number of representatives of this group. This ancestral character recovery does not seem to be the most correct. Therefore, we are considering the second most ancestral clade for this classification. The species of the genus *Podophtalmus* are classified as Podophtalminae, but in the vast majority of phylogenetic hypotheses already presented in the literature; this does not have a well-resolved classification (Mantelatto et al., 2009; Spiridonov et al., 2014; Evans et al., 2018). In some cases, this species appears close to the Thalamitinae, but presenting a mixture of characters between the Portuninae and Thalamitinae. In this way, the unique characteristic in common to the Thalamitinae is the morphology of the perforatorial chamber, which is fusiform type. According to Stephenson (1972), Thalamitinae was inserted in Portuninae where it remained until Apel & Spiridonov (1998) reestablished the subfamily and provided a morphological hypothesis of the group. Although Thalamitinae is now represented as a subfamily of portunids with great diversity of representatives and species (the major in species number among Portunidae) (Spiridonov, et al., 2014; Spiridonov, 2017; Evans, 2018), so many authors continue questioning the validity of this group (Davie et al., 2015). This hypothesis is attributable to the genus *Cronius* (*sensu* Mantelatto et al., 2009) which has an intermediate body morphology that varies from *Portunus* (Portuninae) to the genera *Charybdis* (Thalamitinae) (Garth & Stephenson, 1966; Spiridonov et al., 2014). Some researchers (Evans, 2018) have suggested that Thalamitinae may be derived within Portuninae. Furthermore, when

we observe the ultrastructure of spermatozoa of these three species, we can affirm that *Cronius* shares more characters with *Charybdis* (morphology of acrosomal vesicle and acrosome zone) than *Portunus*, as had already been proposed by Garth & Stephenson (1966). Thus, our data are more close to the phylogeny of Mantelatto et al. (2009) and Evans (2018) who proposed a clade composed of the genera *Cronius* + *Laleonectes* + *Charybdis* + other *Thalamitinae*, characterizing Thalamitinae as polyphyletic. However, despite the low support for this work, the spermatozoa ultrastructure seem in accordance to that *Cronius*, *Thalamita* and *Charybdis* remain in the subfamily Thalamitinae, as proposed by molecular studies (Mantelatto et al. 2009; Evans 2018; Spiridonov et al., 2020).

The spermatozoa ultrastructure *Scylla* (Necronectinae) recovery from the literature (Wang et al., 1997) only provides a few and traits we note that they share the same morphology as the perforatorial chamber with Thalamitinae and Podophtalminae, which is the fusiform type, as well as the dilation of the ARY in the central region. Unfortunately, other characters of spermatozoa could not be visualized. So, we highlight the importance of perfectly longitudinal sections showing the thickened ring until the apex of the perforatorial chamber and the operculum are mandatory to describe all Eubrachyura spermatozoa. Therefore, the morphological characters used in this work should be considered the gold standard for the description of spermatophores and spermatozoa ultrastructure. Since, many of these characters recovered here can be seen in micrographs published in the literature, however, they were sometimes, not mentioned by the authors. Therefore, we suggest the use of Table 1 as a systematic guide for a complete description of the spermatozoa ultrastructure of all species of decapod crustaceans.

The characteristic that differentiates Carcinidae from others Portunidae is the acrosome composed of five concentric layers, being in *Xaiva sp.*, the outer layer is a little more difficult to be observed, without physical magnification on the the images of Jamieson & Tudge (2000). All other characteristics found in the spermatozoa of *Carcinus* and *Xaiva* are shared with the Portunidae family (Pearson & Walker, 1975; Reger et al., 1984; Jamieson & Tudge, 2000), which explains the proximity of these families, given the small number of species with spermatozoa described for Carcinidae. At least two perforatorial chamber morphologies were found for Carcinidae (fusiform and ellipsoid) that occur in *Carcinus* and *Xaiva sp.*, respectively. In both, the operculum is practically flat with a delicate central triangular protrusion, being in *Carcinus* observed only in the work of Reger et al. (1984). The morphology of the ARY in *Carcinus* resembles that of *Charybdis*, but in the *Xaiva*, the ARY dilation seems to occur only

in the anterior region. Jamieson & Tudge (2000) proposed that the operculum of *Xaiva sp.* can be perforated, if so, it is a homoplasy with Corystidae and Majoidea and an apomorphy in relation to the other Portunoidea already described.

The spermatozoa of members of the Geryonidae also have five concentric layers in all species studied in this work or from the literature. The general morphology of the perforatorial chamber is ellipsoid with a slightly protruding triangular operculum and the ARY (second layer) is thin but slightly dilated in the middle region, reminiscent of which was described for *Charybdis*, but not as dilated as *Callinectes* as observed in Brown (1966), *Arenaeus* and *Portunus* (Li, 1995; Stewart, 2010). Thus, with few ultrastructure spermatozoa described for these two families (Carcinidae and Geryonidae), the only characteristic shared between them is the five concentric layers, while the Portunidae studied, presents four concentric layers. Thus, this is the probable synapomorphy of Portunidae, based on the eighteen species of Portunidae described, including from literature. In the present work, the family Geryonidae is polyphyletic, with *Ovalipes* inserted in this family, different from what was proposed by Spiridonov (2014), where the family Ovalipidae had been proposed. In this way, our data are closer to the Evans (2018) hypothesis, who suggests *Ovalipes* as polyphyletic forming a group with *Chaceon* and *Geryon* that appears as separate groups (distinct clades), as well as in Evans (2018). Here, the representatives of Geryonidae are species of the genera *Ovalipes* and *Chaceon*, which, due to the ultrastructure of the spermatozoa, are the correctly groupe, since the species of the genus *Ovalipes* have small differences between them, but this genus have a characteristic perforatorial chamber morphology, operculum and accessory opercular ring. However, despite a similar general spermatozoa morphology with *Chaceon*, which has a pyriform perforatorial chamber and protruding round operculum, while *Ovalipes* has a narrowly ellipsoid perforatorial chamber and a triangular protruding operculum.

In conclusion, we provide, for the first time, a comparative description of the ultrastructure of the spermatophores and spermatozoa of some Portunoidea species revealing that morphological characters of the spermatozoa are informative and could be used in the taxonomic and phylogenetic studies. Differently to describe for other decapods the spermatophores proved to be a signal character to separate the main clades within Portunoidea. The type of spermatophore that is ancestral and contains a thick and compact wall occurs only in the sperm plug formers species, which is also related to slower dehiscence (*Callinectes*, *Arenaeus*, *Portunus*, *Ovalipes*, *Chaceon* and *Carcinus*). The results obtained with ultrastructure are in accordance with the molecular data. The mainly characters that differentiated Carcinidae

and Geryonidae from Portunidae is the presence of five concentric acrosomal layers in the acrosomal vesicle. The main informative characters of Portunidae spermatozoa are the perforatorial chamber morphology and the ARY. These characters identify for the *Callinectes* the “*danae*” lineage displaying more characters in common than with those of the “*bocourti*” lineage following the molecular support. In addition, the spermatozoa of *Achelous* have a typical morphology and the new designation of the genus *Achelous* based on molecular phylogeny is aligned with the spermatozoa ultrastructure. Finally, our molecular phylogeny partially corroborates the results already proposed for the Portunoidea by Evans (2018) but corroborates integrally with Portunidae phylogeny of Mantelatto et al. (2009). Despite, some inconsistencies, probably due to the low number of representatives of Thalamitinae in Brazil, our work showed highlights how the spermatozoa ultrastructure is powerful and decisive tool to improve the knowledge regarding phylogenetic analyses. Thus, the Portunidae common ancestor could have a coenospermic spermatophore with a thick wall or pellicle and the spermatozoa probably had four concentric layers in the acrosome vesicle with an ellipsoid or fusiform perforatorial chamber and an ARY enlarged medially, once we could not perfectly solve the *Cronius* position in our phylogeny.

References

- Amadio, L.M. & Mantelatto, F.L., 2009. Description of the male reproductive system of the hermit crab *Calcinus tibicen* (Decapoda: Anomura: Diogenidae). *Journal of Crustacean Biology* 29, 466-475.
- Apel, M. & Spiridonov, V.A., 1998. Taxonomy and zoogeography of the portunid crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae) of the Arabian Gulf and the adjacent waters. *Fauna of Arabia*. 17, 159-331.
- Assugeni, C.O.; Magalhães, T.; Bolanos, J.A.; Tudge, C.C.; Mantelatto, F.L., Zara, F.J., 2017. Ultrastructure of spermatozoa of spider crabs, Family Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura): Integrative analyses based on morphological and molecular data. *Journal of Morphology*, 1-19.
- Brown, G.G., 1966. Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the Decapod *Callinectes sapidus*. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*, 14, 425-440.
- Camargo, T.R.; Rossi, N.; Castilho, A.L.; Costa, R.C.; Mantelatto, F.L.; Zara, F.J., 2015. Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology*.
- Camargo, T.R.; Lobo, M.R.; Mantelatto, F.L.; Tudge, C.C.; Zara, F.J., 2015. Ultrastructure of spermatozoa of members of Calappidae, Aethridae and Menippidae and discussion of their phylogenetic placement. *Acta zoologica*, 1, 89-100.
- Evans, N., 2018. Molecular phylogenetics of swimming crabs (Portunoidea Rafinesque, 1815) supports a revised family-level classification and suggests a single derived origin of symbiotic taxa. *PeerJ*, 6, 42-60.
- 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.
- Faria, S. C.; Augusto, A. MacNamara, J.C., 2011. Intra- and extracellular osmotic regulation in the hololimnetic Caridea and Anomura: a phylogenetic perspective on the conquest of fresh water by the decapod Crustacea. *Journal of Comparative Physiology B*, 181, 175-186.
- Garcia Bento, M.A.; Miranda, I.; Mantelatto, F.L.M.; Zara, F.J., 2018. Comparative spermatozoal ultrastructure and molecular analysis in dromiid crabs and their phylogenetic implications for Dromiidae and Podotremata (Decapoda: Brachyura). *Arthropod Structure & Development*.
- Garcia Bento, M. A., López-Greco, L. S; Zara, F. J., 2019. Seminal fluid production and sperm packaging in dromiid crabs (Brachyura, Podotremata). *Zoology (Jena, Germany)*, 132, 17-30.
- Guinot, D.; Jamieson, B.G.M; Richer de Forges, B., 1994. Relationship of Homolidae and Dromiidae: evidence from spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Acta Zoologica* 75, 255-267.
- Hall T. BioEdit v.7.0.5., 2005. Biological sequence alignment editor for windows. Ibis Therapeutics a division of Isis pharmaceuticals. Available from: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html/>.
- Hartnoll, R. G., 1969. Mating in Brachyura. *Crustaceana*, 16, 161-181.
- 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 Invertebrate Reproduction Development*, 10, 79-87.
- Jamieson, B.G.M., 1989. Ultrastructural comparison of the spermatozoa of *Ranina ranina* (Oxystomata) and of other crabs exemplified by *Portunus pelagicus* (Brachygnatha) (Crustacea, Brachyura). *Zoomorphology* 109, 103-111.

- Jamieson, B. G. M., 1990. Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. *Memoirs of the Queensland Museum*, 31, 109-142.
- Jamieson, B.G.M.; Tudge, C.C.; Scheltinga D.M., 1993. The Ultrastructure of the Spermatozoon of *Dromidiopsis edwardsi* Rathbun, 1919 (Crustacea: Brachyura: Dromiidae): Confirmation of a Dromiid Sperm Type. *Australian Journal of Zoology*, 41, 537-548.
- Jamieson, B.G.M., 1994. Phylogeny of the Brachyura with particular reference to the Podotremata: Evidence from a review of spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 345, 373-393.
- Jamieson, B.G.M.; Guinot, D.; De Forbes, B.R., 1995. Phylogeny of the Brachyura (Crustacea, Decapoda): evidence from spermatozoal ultrastructure. In: Jamieson, B.G.M; Ausio, J.; Justine, J.L. (Eds), *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. Memories Museum Natural History*, 166, 265-283.
- Jamieson, B.G.M. & Tudge, C. C., 2000. Crustacea-Decapoda. In B. G. M. Jamieson, K. G. Adiyodi, & R. G. Adiyodi (Eds.), *Progress in male gamete ultrastructure and phylogeny Reproductive biology of the invertebrates*, 9, 1-95). Chichester, England: John Wiley & Sons.
- Karasawa, H., Schweitzer, C.E & Feldmann, R.M., 2008. Revision of Portunoidea Rafinesque, 1815 (Decapoda: Brachyura) with emphasis on the fossil genera and families. *Journal of Crustacean Biology*, 28, 82-127.
- Klaus, S., Schubart, C.D., Brandis, D., 2009. Ultrastructure of spermatozoa and spermatophores of old world freshwater crabs (Brachyura: Potamoidea: Gecarcinucidae, Potamidae and Potamonautidae). *Journal of Morphology*, 270, 175-193.
- Klaus S, Schubart CD, Streit B, Pfenninger M., 2010. When Indian crabs were not yet Asian-biogeographic evidence for Eocene proximity of India and Southeast Asia. *BMC Evolutionary Biology*. 10, 287.
- Li, T.W., 1995. On spermatogenesis and sperm ultrastructure of blue crab *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda). *Acta Zoologica Sinica*, 41, 41-46.
- Mantelatto, R.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 genus *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae). In: Martin, J.W., Crandall, K.A., Felder, D.L. (Eds.), *Crustacean Issues. Decapod Crustacean Phylogenetics*. CRC Press, Boca Raton, 567-579
- Mantelatto, F.L.; Robles, R.; Wehrtmann, I.S.; Schubart, C.D.; Felder D.L., 2018: New insights into the molecular phylogeny of the swimming crabs of the genera *Portunus* Weber, 1795 and *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae) of the Americas. *Journal of Crustacean Biology*, 38, 190-197.
- Melo, G. A. S., 1996. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Plêiade, São Paulo. 603p.
- Nascimento F.A.; Zara F.J., 2013. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius*, 21, 161-177.
- Ng, P. K. L., Guinót, D., & Davie, P. J. F., 2008. Systema Brachyurorum: Part I. an annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 17, 1-286.

- Nguyen, T.S., 2013. An annotated checklist of the crabs of the superfamily Portunoidea Rafinesque, 1815, from The Philippines (Crustacea: Decapoda: Brachyura). Masters Thesis, National University of Singapore.
- Pardo, L.M., Zara, F.J., Riveros, M.P., Paschke, K., Pretterebner, K., & Mantelatto, F.L., 2019. Integrative depiction of the male reproductive system of the commercial purple crab *Homalaspis plana* (Platyxanthidae): Structure and function. *Journal of Morphology*, 280, 1693-1705.
- Pearse, P.J.; Walker, M.H., 1975. Alteration of cytochrome C oxidase activity during spermatogenesis in *Carcinus maenas*. *Cell Tissue Research*, 164, 401-410.
- Reger, J.F.; Escaig, F.; Pochon-Mason, J.; Fitzgerald, M.E.C., 1984. Observations on crab, *Carcinus maenas*, spermatozoa rapid-freeze and conventional fixation techniques. *Journal of Ultrastructure Research* 89, 12-22.
- Robles, R.; Schubart, C. D.; Conde, J.E.; Carmona-Suárez, C.; Alvarez, F.; Villalobos, J. L.; Felder, D.L., 2007. Molecular phylogeny of the American *Callinectes* Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae), based on two partial mitochondrial genes. *Marine Biology*, 150, 1265-1274.
- Schubart, C.D & Cuesta, J. A., 1998. The first zoeal stages of four *Sesarma* species from Panama, with identification keys and remarks on the American Sesarminae (Crustacea: Brachyura: Grapsidae). *Journal of Plankton Research*, 20, 61-84
- Schubart, C.D. & Reuschel, S., 2009. A proposal for a new classification of Portunoidea and Cancroidea (Brachyura: Heterotremata) based on two independent molecular phylogenies. In: Martin, J.W., Crandall, K. A. & Felder, D.L. (eds.): *Decapod crustacean phylogenetics* [Crustacean Issues, 18]: 533-550. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Spiridonov, V.A.; Neretina, T.V.; Schepetov, D., 2014. Morphological characterization and molecular phylogeny of Portunoidea Rafinesque, 1815 (Crustacea Brachyura): implications for understanding evolution of swimming capacity and revision of the family-level classification. *Zoologicheskiy Zhurnal*, 253, 404-429.
- Spiridonov, V.A., 2020. An update of phylogenetic reconstructions, classification and morphological characters of extant Portunoidea Rafinesque, 1815 (Decapoda, Brachyura, Heterotremata), with a discussion of their relevance to fossil material. *Geologija*, 63, 133-166.
- Stephenson, W. & Campbell B., 1959. The Australian portunids (Crustacea: Portunidae). III. The genus *Portunus*. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 10, 84-129.
- Stephenson, W., 1972. An annotated checklist and key to the Indo-West-Pacific swimming-crabs (Portunidae). *The Royal Society of New Zealand bulletin*, 10, 1-64.
- Stewart, M.J.; Steward, P.; Soonklang, N.; Linthong, V.; Hanna, J.P.; Duan, W; Prasert, S., 2010. Spermatogenesis in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and evidence for histones in mature sperm nuclei. *Tissue and Cell* 42, 137-150.
- Thompson J.D, Higgins D.G, Gibson T.J., 1994. Clustal W, improving position the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific, gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22, 4673-4680.
- Tudge, C.C.; Scheltinga, D.M.; Jamieson, B.G.M.; Guinot, D.; Forges, B.R., 2014. Comparative ultrastructure of the sperm of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. *Acta Zoologica (Stockholm)*, 95, 1-20.
- Wang, Y.; Zhang, Z.; Li, S., 1997. Ultrastructure of spermatogenesis in the crab *Scylla serrata*. *Acta Zoologica Sinica*, 43, 249-254.

Williams, A. B., 1974. The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). Fishery Bulletin, 72, 685-798.

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.

Supplementary material

Table 2. Taxon sampling, GenBank accession numbers and composition of sequence data used for phylogenetic analyses

Taxon	Family/subfamily	COI	16S
Carcinidae			
<i>Carcinus maenas</i>	Carcininae	FJ581597.1	FM208763.1
<i>Portumnus latipes</i>	Platyonichinae	NA	NA
<i>Sirpus zariquieyi</i>	Pirimelinae	NA	FM20784
<i>Liocarcinus depurator</i>	Polybiinae	FJ174948.1	FM208767.1
<i>Thia scutellata</i>	Thiinae	NA	FM208782
Geryonidae			
<i>Ovalipes stephensoni</i>	Ovalipinae	DQ388050	NA
<i>Ovalipes trimaculatus</i>	Ovalipinae	JN315648.1	FM208773.1
<i>Ovalipes ocellatus</i>	Ovalipinae	KU905767.1	FJ716615.1
<i>Chaceon granulatus</i>	Geryoninae	NA	FM208775.1
<i>Chaceon notialis</i>	Geryoninae	KC676760.1	KC676757.1
<i>Geryon longipes</i>	Geryoninae	JQ305902.1	FM208776.1
Portunidae			
<i>Scylla olivacea</i>	Necronectinae	KX959994.1	KY033332.1
<i>Scylla paramamosain</i>	Necronectinae	NA	FJ827761
<i>Scylla serrata</i>	Necronectinae	KM528136.1	KY033319.1
<i>Scylla tranquebarica</i>	Necronectinae	NA	FJ827759
<i>Podophthalmus vigil</i>	Podophthalminae	KT365735	KT365553
<i>Podophthalmus nacreus</i>	Podophthalminae	JX398078	JX398093
<i>Arenaeus cribrarius</i>	Portuninae	JX123444.1	DQ407667.1
<i>Arenaeus mexicanus</i>	Portuninae	JX123450.1	JX123473.1
<i>Callinectes danae</i>	Portuninae	KY940216.1	DQ407680.1
<i>Callinectes ornatus</i>	Portuninae	KY940161.1	AJ298186.1
<i>Callinectes exasperatus</i>	Portuninae	MG462545.1	DQ407682.1
<i>Callinectes bellicosus</i>	Portuninae	MG462556.1	DQ407670.1
<i>Callinectes larvatus</i>	Portuninae	MN184148.1	DQ407678.1
<i>Callinectes sapidus</i>	Portuninae	MG462256.1	JX123477.1
<i>Callinectes rathbunae</i>	Portuninae	MG462524.1	DQ407673.1
<i>Callinectes bocourti</i>	Portuninae	JX123451.1	KY940144.1
<i>Callinectes affinis</i>	Portuninae	NA	DQ407675.1
<i>Achelous spinicarpus</i>	Portuninae	KX060221.1	KX060431.1
<i>Achelous spinimanus</i>	Portuninae	JX123456.1	MG515574.1
<i>Achelous tumidulus</i>	Portuninae	KT365691.1	KT365589.1

<i>Portunus pelagicus</i>	Portuninae	KT158620.1	KU296927.1
<i>Portunus trituberculatus</i>	Portuninae	GU321230.1	GU321228.1
<i>Portunus anceps</i>	Portuninae	KT365736	KT365604
<i>Portunus sayi</i>	Portuninae	KT3657607	KT365745
<i>Caphyra tridens</i>	Thalamitinae	T365701	KT365532
<i>Caphyra rotundifrons</i>	Thalamitinae	KT365698.1	KT365530.1
<i>Charybdis feriata</i>	Thalamitinae	KT365712.1	KT365538.1
<i>Charybdis helleri</i>	Thalamitinae	AY351872.1	DQ407665.1
<i>Charybdis japônica</i>	Thalamitinae	EU586120.1	HM237595.1
<i>Cronius edwardsii</i>	Thalamitinae	NA	FJ152147.1
<i>Cronius ruber</i>	Thalamitinae	KT365725.1	FJ152146.1
<i>Thalamita stephensoni</i>	Thalamitinae	KT365778.1	KT365581.1
<i>Thalamita sima</i>	Thalamitinae	OL876957.1	FJ152166.1
<i>Thalamita crenata</i>	Thalamitinae	KT365763.1	FJ152164.1
<i>Thalamita danae</i>	Thalamitinae	KT365764.1	FJ152165.1
Outgroup			
<i>Sylviocarcinus pictus</i>		KF688092.1	KF688053.1
<i>Valdivia serrata</i>		KU578962.1	KF688052.1

Notes: NA= missing data

Capítulo 2

Produção e transferência do fluido seminal em *Achelous*, *Cronius*, *Arenaeus* e *Ovalipes* (Brachyura, Portunoidea)

Resumo

Os membros da superfamília Portunoidea passaram por diversas alterações em seus arranjos filéticos nos últimos anos. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo realizar a descrição histológica e comparativa do sistema reprodutor masculino de *Achelous spinicarpus*, *Achelous spinimanus*, *Cronius ruber*, *Arenaeus cribrarius* e *Ovalipes trimaculatus* a partir do mapeamento de caracteres morfológicos para contar a história evolutiva do sistema reprodutor em Portunoidea. O sistema reprodutor masculino de todas as espécies estudadas apresentou o padrão usual de Brachyura. A região proximal do vaso deferente anterior (AVDp) recebe a massa de espermatozoides vindos do testículo e na região distal (AVDp) nota-se os espermatozoides empacotados em espermatóforos coenospérmicos. A região média do vaso deferente (MVD) mostra lúmen mais amplo, repleto de espermatóforos, imersos em secreção. A região posterior do vaso deferente (PVD), nos quatro gêneros estudados, apresenta somente secreção em seu lúmen, sem a presença de espermatozoides ou espermatóforos. Representantes de *Arenaeus* possuem características típicas dos formadores de plug-espermático, com a presença de bolsas laterais e grande volume de fluido seminal. Assim, a ausência destas bolsas laterais somado ao pequeno volume do vaso deferente em *Achelous*, *Cronius* e *Ovalipes* indicam uma diferença na produção de fluido seminal o que pode ter reflexo na transferência deste para as fêmeas, levando a formação de pacotes espermáticos e consequente competição espermática. O mapeamento das características do sistema reprodutor indicam que o testículo lobular e ausência de espermatóforos/espermatozoides na PVD é uma característica compartilhada por todos os Portunoidea, sendo assim a sinapomorfia para a superfamília com base em todas as espécies estudadas. O vaso deferente volumoso, com bolsas laterais bem desenvolvidas é a sinapomorfia encontrada em todos os Portunidae formadores de plug-espermático: *Callinectes*, *Arenaeus* e *Portunus*, os quais apresentam GSI acima de 3%. A ausência destas bolsas é a sinapomorfia para as espécies de *Achelous*. Contudo, a presença dela, pouco desenvolvida é um caráter homoplásico uma vez que foram detectadas em *Charybdis*, mas estão ausentes em *Cronius*. O baixo volume de secreção produzida é uma característica compartilhada pelas espécies não formadoras de plug-espermático GSI<1 e pode ser observada nos poucos Thalamitinae estudados, bem como em *Achelous*. Esta característica pode estar ser indicativo de formação de pacotes espermáticos nestas espécies.

Palavras-chave: espermatóforos, espermatozoides, secreção, sistema reprodutor masculino, vaso deferente

Introdução

O sistema reprodutor masculino em Brachyura, geralmente tem a forma da letra “H” e é composto por um par de testículos, um par de *vasa deferentia* e os gonópodos, que são os órgãos copulatórios (Krol et al., 1992). Nos Eubrachyura, os testículos localizam-se na região anterodorsal da carapaça cefalotorácica, acima do hepatopâncreas e são conectados por uma comissura na região posterior do estômago, abaixo do coração (Cronin, 1947; Johnson, 1980; Simeó et al., 2009, 2010; Stewart et al., 2010). Nos testículos ocorre o processo de espermatogênese e espermiogênese, o qual termina na produção dos espermatozoides que são liberados nos dutos seminíferos (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013). De acordo com Nagao & Munehara (2003), o testículo de Brachyura pode ser classificado, morfológicamente, em dois tipos: o lobular e o tubular. O lobular é composto por numerosos lóbulos ou cistos seminíferos, conectados por um ducto seminífero central. Cada lóbulo apresenta células no mesmo estágio da espermatogênese. Esta morfologia é descrita para Majoidea, Xanthoidea e Grapsoidea (Simeó et al., 2010). Enquanto o tipo tubular, que é mais comumente descrito na maioria dos grupos de Brachyura, consiste de um túbulo único e convoluto com células germinativas em diferentes estágios sequenciais de espermatogênese, formando zonas de maturação, com os espermatozoides sendo liberados da zona de evacuação para o túbulo seminífero (Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2010). Os espermatozoides são transportados para o vaso deferente, onde são empacotados no interior dos espermatóforos (Zara et al., 2012; Klaus et al., 2013; Tiseo et al., 2014).

O vaso deferente é dividido em três regiões: anterior (AVD), na qual ocorre a formação dos espermatóforos, média (MVD) e a posterior (PVD), onde ocorre a produção da maior parte do fluido seminal (Johnson, 1980; Krol et al., 1992; Mclay & Becker, 2015). Os locais de produção e armazenamento dos espermatóforos e fluido seminal difere entre grupos de Brachyura (Adiyodi & Anilkumar, 1988; Benhalima & Moriyasu, 2000; Jivoff et al., 2007; Klaus et al., 2013). Associadas ao vaso deferente, principalmente na MVD e/ou PVD, podem ocorrer estruturas anexas chamadas de bolsas laterais, glândulas acessórias, divertículos ou cecos (Johnson, 1980; Simeó et al., 2009; Sal Moyano et al., 2009; Zara et al., 2012; Tiseo et al., 2014). Em Portunidae, as bolsas laterais auxiliam no aumento do volume de fluido seminal produzido. Este aumento do volume de secreção tem importante função na transferência dos espermatóforos e na formação do plug-espermático (Jivoff, et al., 2007; Zara et al., 2012; Nascimento & Zara 2013; Assugeni et al., 2021). Por sua vez em Majoidea, estas expansões do vaso deferente recebem o nome de divertículos, cecos ou glândulas acessórias podendo ocorrer na MVD e PVD como em Inachoididae (Diesel, 1989; Antunes et al., 2018); Oregoniidae (Beninguer et al., 1988; Sainte-

Marie & Sainte-Marie, 1998), Majidae (Simeó et al., 2009) e sendo aparentemente ausente em Epiplatidae (Hinsch & Walker, 1974; Sal Moyano et al., 2009). A função destas glândulas que ocorrem entre a MVD e a PVD é pouco conhecida, mas parece atuar na transferência espermática e na formação de pacotes espermáticos, participando assim na competição espermática, como proposto para Inachoididae e Oregoniidae (Diesel, 1989, 1991; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998; Moriyasu & Benhalima, 2000; Antunes 2016, 2018). Em Grapsoidea e Ocypodoidea essas glândulas podem ocorrer em ambas regiões do vaso deferente ou apenas na PVD (Hartnoll, 1969; Beninger et al., 1988; Garcia e Silva, 2006; Castilho et al., 2008; Simeó et al., 2009; Nicolau et al., 2012). Tal secreção parece ser complementar ao fluido seminal, tendo outra característica química, auxiliando na transferência espermática em *Pachygrapsus* (Tiseo et al., 2014).

Atualmente, a superfamília Portunoidea é dividida em três famílias sendo Portunidae, Carcinidae e Geryonidae (Evans, 2018). Além disso, este último autor reclassificou as espécies do gênero *Ovalipes* em Geryonidae, mantendo a subfamília Ovalipinae proposta anteriormente como Ovalipidae (Spiridonov et al., 2014). Em relação aos Thalamitinae que apresentam muitas controvérsias em sua classificação, Evans (2018) manteve os animais da espécie *C. ruber* nesta subfamília, corroborando o que já havia sido proposto anteriormente por Mantelatto et al. (2009). Uma outra proposta filogenética recente trata-se da mudança dos animais do gênero *Achelous* anteriormente classificados como Portuninae para uma subfamília recentemente proposta: Achelouinae Spiridonov, 2020 (Spiridonov, 2020; Koch et al., 2022).

Apesar de existirem diversos trabalhos envolvendo a distribuição, população, filogenia e maturação sexual de espécies de Portunoidea (Tavares et al., 2017; Sousa et al., 2017; De Carli et al., 2014; Mantelatto et al., 2018), os trabalhos que descrevem a morfologia do sistema reprodutor ainda são escassos frente ao grande número de representantes deste grupo, que possuem grande importância ecológica e econômica no Brasil (Mantelatto & Christofoletti, 2001), incluindo as espécies de *Achelous* De Haan, 1833, *Arenaeus Dana*, 1851, *Cronius* Stimpson, 1860 e *Ovalipes* Rathbun, 1898 que fazem parte da fauna acompanhante da pesca camaroneira (Boschi, 1997; Fracasso, 2002; Mantelatto et al., 2009; Boos et al., 2010). Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo a descrição anatômica e histológica do sistema reprodutor masculino de *Achelous spinicarpus* Stimpson, 1871, *Achelous spinimanus* (Latreille, 1819), *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818), *Cronius ruber* (Lamarck, 1818) e do Geryonidae *Ovalipes trimaculatus* (De Haan, 1833) para uma comparação com outras espécies de Portunoidea descritas, as quais são tradicionalmente produtoras de plug-espermático, com um enfoque evolutivo a partir do mapeamento de caracteres morfológicos integrados a filogenia molecular de Evans (2018).

Material e métodos

Machos de *Ar. cribrarius* foram coletados na baía/estuário de Santos-São Vicente, estado de São Paulo, Brasil, a partir de um barco de pesca de camarão equipado com uma rede de arrasto semi-balão entre março de 2007 e maio de 2008. Machos de *A. spinimanus*, *A. tumidulus* e *O. trimaculatus* foram coletados com auxílio de barco de pesca camaroneira equipado com redes otter-trawl. Os *Cr. ruber* foram coletados por mergulho livre e autônomo, no período noturno, na praia do Félix e do Lamberto. As quatro últimas espécies foram coletadas no município de Ubatuba, Estado de São Paulo, Brasil. A espécie *A. spinicarpus* foi coletada durante expedição pela costa de São Sebastião e Cananéia do Navio de Pesquisa Soloncy Moura (MMA/ICMBio-CEPSUL) em 2015. A identificação dos animais foi realizada com base nas descrições de Melo (1996). Foram obtidos no mínimo cinco exemplares de cada espécie, exceto para *O. trimaculatus* (N=1) e *A. tumidulus* (N = 3), sendo todos mensurados quanto ao tamanho da carapaça (em sua maior largura, desprezando-se os espinhos) utilizando-se paquímetro analógico (0,05 mm). Para a análise morfológica do sistema reprodutor masculino, os animais foram anestesiados por resfriamento (-20°C, por 5 minutos) e dissecados. As espécies *A. spinicarpus* (N=8), *C. ruber* (N = 7) e *Ar. cribrarius* (N = 35) por serem mais abundantes, foram pesados e tiveram seu sistema reprodutor completo (testículo e vasos) dissecado e pesados em balança analítica. O índice gonadossomático (GSI) foi obtido pela divisão do peso do sistema reprodutor pelo peso do animal, o qual foi multiplicado por 100. O sistema reprodutor masculino das seis espécies foi fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 7,4), por no mínimo 24hs. Para análise macroscópica do sistema reprodutor masculino foram analisados no estereomicroscópio Leica® e fotografados, imersos em solução fixadora. No caso da espécie *Ar. cribrarius*, as micrografias da anatomia do sistema reprodutor foram realizadas com amostras preservadas em álcool, o que justifica tal amarelamento. Posteriormente, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em série alcoólica (50-95%), embebidas e incluídas em resina glicol-metacrilato Leica®, segundo rotina indicada pelo fabricante. Após a polimerização, os blocos histológicos foram cortados em micrótomo rotativo. Os cortes com espessura de 5 a 7µm foram recolhidos em lâminas e corados com Hematoxilina & Eosina para descrição geral, de acordo com Junqueira & Junqueira (1983). Para a análise histoquímica foram utilizadas as técnicas de Xylidine ponceau (Melo e Vidal, 1980) para proteínas totais, PAS para polissacarídeos neutros e azul de Alcian para polissacarídeos ácidos segundo descrito por Junqueira & Junqueira (1983).

Análise filogenética

A hipótese filogenética considerada neste trabalho foi a proposta por Evans (2018). Desta maneira foi elaborado um diagrama representativo dos dados moleculares obtidos (filograma) pelo autor por Maximum likelihood (ML).

Posteriormente, foi construída uma matriz contendo os dados do sistema reprodutor masculino. Para esta matriz considerar o diagrama proposto neste trabalho baseado na filogenia acima. Nesta matriz, os caracteres foram selecionados através da morfologia do sistema reprodutor masculino, com a finalidade de indicar caracteres sinal para separar grupos intimamente relacionados. Para designar o estado do caractere, foram atribuídos números, como segue: Caráter 1 “Bolsas laterais”: Ausente (0); Presente (1). Caráter 2 “PVD sem espermatóforos”: Sim (0); Não (1). Caráter 3 “Secreção granular”: Presente (0); Ausente (1), nas espécies com dados insuficientes, o status atribuído foi o símbolo “?”.

Resultados

GSI e Anatomia do sistema reprodutor masculino

Macroscopicamente, nas espécies de *A. spinimanus*, *A. spinicarpus*, *A. tumidulus*, *Cr. ruber* e *Ar. cribrarius*, o sistema reprodutor masculino mostra-se como um órgão bilateral com a forma da letra “H” (Fig. 1A, B e C). Este é composto pelo par de testículos, e os túbulos, que compõem o par de vasos deferentes (Fig. 1A, B e C). O vaso deferente é dividido em região anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD) (Fig. 1A, B e C). Em *A. spinimanus* o vaso deferente é pouco volumoso com GSI de $1,5 \pm 0,2$ (Fig.2). Em todas as espécies de *Achelous* aqui estudados, a AVD é um tubo convoluto, liso e leitoso. A MVD é um túbulo liso, mais translúcido, com material levemente leitoso no lúmen, com a mesma espessura que a AVD na sua porção proximal, tornando-se mais delgado em suas porções mais distais, a qual termina na PVD. A PVD segue a mesma morfologia da MVD distal, porém com menor espessura e mais secreção luminal esbranquiçada (Fig. 1A). Em *C. ruber*, o sistema reprodutor masculino também é bastante delgado e pouco volumoso, com GSI de $0,5 \pm 0,3$ (Fig.2). No vaso deferente, a AVD apresenta-se convoluta com espessura maior em relação as outras regiões do vaso, com aspecto esbranquiçado e leitoso. A MVD tem a porção proximal com a mesma espessura da AVD e torna-se discretamente mais delgada em direção a PVD, porém com a mesma coloração da AVD. A PVD não apresenta diferença macroscópica, exceto por ser mais translúcida devido ao aspecto do fluido seminal (Fig. 1B). Não foram detectados bolsas laterais, cecos, divertículos ou mesmo glândulas acessórias (Fig. 1A e B). O sistema reprodutor de *Ar. cribrarius* é bastante

volumoso com GSI de $3,3\pm 0,5$ (Fig.2), sendo macroscopicamente notado o mesmo aspecto volumoso em *O. trimaculatus*, porém este não foi documentado por se tratar de um único indivíduo. A AVD em *Ar. cribrarius* é bastante delgada, muito enovelada e mais esbranquiçada que as outras regiões do vaso. A MVD é um túbulo espesso, convoluto com muitas e volumosas bolsas laterais ou outpockets (*sensu* Johnson, 1980), que sofre um estreitamento em direção a PVD. Esta última região que também apresenta aspecto menos enovelado, sendo espessa e com bolsas laterais tornando-se bastante afilada distalmente, no ducto ejaculatório (Fig. 1C).

Histologia e histoquímica

Testículo

Os testículos das cinco espécies estudadas apresentam a mesma morfologia classificada como do tipo lobular (ácino). Este tipo de testículo é composto por numerosos lóbulos envoltos por fina camada de tecido conjuntivo e conectados por um ducto seminífero central e no interior encontramos espermatócitos primários no mesmo estágio de maturação (Fig. 3A) Em cortes transversais nota-se espermátides iniciais com núcleos em formato de “C” (Fig. 3B- D). O ducto coletor libera os espermatozoides imersos em secreção para o ducto seminífero. (Fig. 3E).

Vaso deferente

Em todas as espécies analisadas, o vaso deferente apresenta histologicamente três regiões distintas: anterior (AVD), média (médica) e posterior (PVD). A AVD foi dividida em duas porções: a proximal (AVDp) e distal (AVDd). A porção proximal recebe os espermatozoides maduros provenientes do testículo, os quais encontram-se como uma grande massa espermática ocupando todo o lúmen (Fig. 4A-D). Na região distal os espermatozoides encontram-se agrupados em pequenas massas esféricas delimitadas por uma parede que são compactados por secreção basófila, constituindo assim a estrutura do espermatóforo coenospérmico (Fig. 4E-H). Entre a secreção basófila observa-se secreção acidófila, que é adicionada à periferia da massa espermática formando os espermatóforos, o que é mais marcante em *Ar. cribrarius* (Fig. 4G). A AVD apresenta epitélio colunar simples com núcleos variando de arredondados a elípticos, envolto por delgada camada muscular e tecido conjuntivo (Fig. 4A-H). A AVDd apresenta espermatóforos já formados em seu lúmen (Fig. 4E-H).

A MVD mantém a distribuição de tecido conjuntivo, muscular e epitelial (cúbico a pavimentoso simples) com características secretoras, citoplasma acidófilo e núcleos irregulares. Nesta região do vaso deferente é possível distinguir as características morfológicas dos

espermátóforos de cada espécie, sendo os de *A. spinicarpus*, *A. spinimanus*, *A. tumidulus* e *Cr. ruber* muito irregulares em termos de forma e número de espermatozoides com a parede ondulada e uma película frágil irregular muito fina (Fig. 4I-J). Nestas espécies, o principal ponto de armazenamento dos espermátóforos é AVDD ao invés da MVD, como visto na anatomia (Fig. 1A e B) e comprovado pela histologia (Fig. 4E, F, I e J). Para as espécies *Ar. cribrarius* e *O. trimaculatus* os espermátóforos são arredondados, geralmente de tamanho similar e apresentam parede espessa (“pellicle”) compacta (Fig. 4K-L). Os espermátóforos de ambos os gêneros estão imerso em fluido seminal composto por matriz homogênea acidófila contendo muitos grânulos os quais são acidófilos em *Ar. cribrarius* e basófilos em *O. trimaculatus* (Fig. 4K e L). A principal diferença histológica entre a AVD e a MVD para estas últimas duas espécies, foi o aumento do diâmetro luminal do vaso, com consequente aumento de secreção espaçando os espermátóforos nesta região, além do consequente achatamento do epitélio (Fig. 4K e L). Nestas duas últimas espécies, a MVD é o principal ponto de armazenamento dos espermátóforos.

A última região do vaso deferente, a PVD mostra epitélio colunar simples mais espesso em relação a MVD (Fig. 4M-Q). Esta região foi dividida em duas porções nas espécies de *Achelous* spp., a proximal (PVDp) e distal (PVDd), devido a diferente característica das secreções nestas duas porções. No lúmen de todas as cinco espécies aqui estudadas, não foi observado espermatozoides ou espermátóforos no lúmen da PVD, a qual encontra-se preenchida exclusivamente por secreção acidófila (Fig. 4M-Q). Nas espécies de *A. spinimanus*, *A. spinicarpus* e *A. tumidulus*, a PVDp apresenta matriz fluida com a presença de secreção fibrosa mais acidófila (Fig. 4M), enquanto na PVDd, observa-se a modificação desta secreção para grandes grânulos de aspecto coagulado (Fig. 4N). Em *Ar. cribrarius* e *O. trimaculatus* nota-se matriz fluida com presença de pouco material coagulado (Fig. 4P-Q). A única espécie que apresentou bolsas laterais foi *Ar. cribrarius* na região da MVD e PVD (Fig. 4G, K e P), enquanto para todas as outras espécies estudadas não foram observadas bolsas laterais ou glândulas acessórias em nenhuma das regiões do vaso deferente (Fig. 4A-Q).

Histoquímica do fluido seminal

Por meio da histoquímica, pode-se constatar que a AVDP apresenta secreção reativa para proteínas em *Achelous* spp., *C. ruber* e *Ar. cribrarius* (Fig. 5A-C), enquanto em *Ovalipes* na região da AVDP esta secreção é fortemente positiva (Fig. 5D). Na AVDD nota-se a presença de secreção fortemente reativa para proteínas em todas as espécies estudadas, a qual auxilia na

separação das massas espermáticas em espermátóforos (Fig. 5E-H). Os espermátóforos na AVDD são caracterizados pela presença de parede proteica, com reação fortemente positiva para proteínas (Fig. 5E-H). Em *Achelous* e *Cronius* as secreções encontradas na MVD mostram reação fortemente positiva para proteínas (Fig. 5I-J), em *Arenaeus* e *Ovalipes* a secreção matriz é fluida positiva para proteínas com grânulos de reação fortemente positiva (Fig. 5K-L). Nas espécies de *Achelous*, a PVD apresenta secreção com reação positiva para proteínas e foi dividida em duas regiões com características histoquímicas distintas (Fig. 5M-N). Na PVDp (Fig. 5M), esta secreção matriz é fluida com aspecto fibroso e mais reativo para proteínas, enquanto na PVDd (Fig. 5N) esta secreção torna-se um aglomerado de grandes grânulos, sendo os maiores reativos para proteínas e os menores fortemente positivos. Em *Cronius*, as características histoquímicas são iguais a PVDp de *Achelous* (Fig. 5O). Em *Ar. cribrarius*, a secreção é positiva com a presença de coágulos fortemente positivos para proteínas (Fig. 5P). Em *O. trimaculatus*, a secreção é fluida, com aspecto fibroso, sendo esses fortemente positivos (Fig. 5Q).

A AVDP apresenta secreção fracamente positiva para polissacarídeos neutros em *Achelous* spp., *Cronius* e *Arenaeus* (Fig. 6A-C), enquanto em *Ovalipes* (Fig. 6D), esta secreção é positiva. Na AVDD ocorre um aumento na quantidade de secreção, porém com as mesmas características histoquímicas da região anterior (Fig. 6E, F, H), com exceção para *Arenaeus*, em que a secreção se torna fortemente positiva (Fig. 6G). Na MVD de todas as espécies, as características histoquímicas são mantidas (Fig. 6I-K), com exceção de *O. trimaculatus*, em que a secreção granular é positiva para polissacarídeos neutros, sendo que os grânulos luminiais de *Ar. cribrarius* são fortemente positivos (Fig. 6K e L). Os espermátóforos destas duas últimas espécies são intensamente reativos ao PAS (Fig. 6L). A PVDp de *Achelous* spp. mostra secreção fortemente positiva para polissacarídeos neutros (Fig. 6M), e na PVDd os grânulos tornam-se fracamente positivos, aumentam em quantidade e a secreção torna-se positiva (Fig. 6N). Na PVD de *C. ruber*, a secreção apresenta reação fracamente positiva, sendo o aspecto fibroso desta secreção positivos para PAS (Fig. 6O). NA PVD de *Ar. cribrarius* e *O. trimaculatus*, a secreção desta região é positiva e apresenta grânulos fortemente corados (Figs. 6P e Q).

O fluido seminal de *Achelous* spp., *C. ruber* e *O. trimaculatus* apresentaram reação para polissacarídeos ácidos e esta se mantém por todas as regiões do vaso deferente (Fig. 7A-Q), a exceção ocorre na espécie *Ar. cribrarius*, a qual apresenta secreção positiva para polissacarídeos ácidos na AVDP, AVDD e na MVD (Fig. 7K) e fracamente positiva na PVD (Fig. 7P).

Figuras

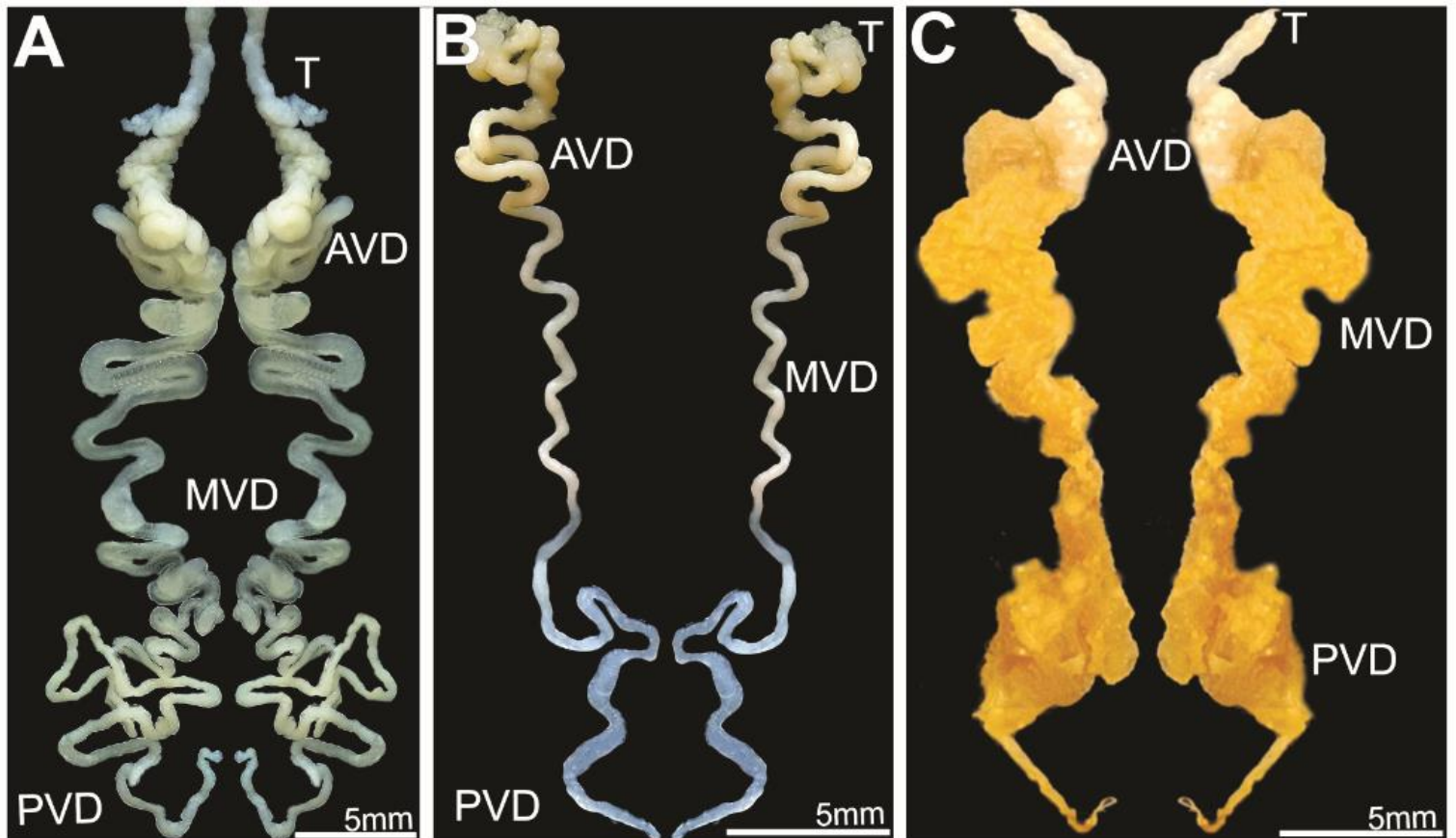


figura 1. Sistema reprodutor masculino. A). Vista macroscópica do sistema reprodutor masculino do gênero *Achelous spinimanus*, no qual pode-se observar o padrão encontrado para as espécies B). Vista macroscópica do sistema reprodutor masculino de *Cronius ruber*. C). Vista macroscópica do sistema reprodutor de *Arenaeus cribrarius*. Nas três imagens nota-se o sistema reprodutor masculino em formato de letra H com os testículos (T) e os vasos deferentes divididos em região anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD). Nesta última espécie pode-se notar as bolsas laterais como saliências da superfície do vaso deferente.

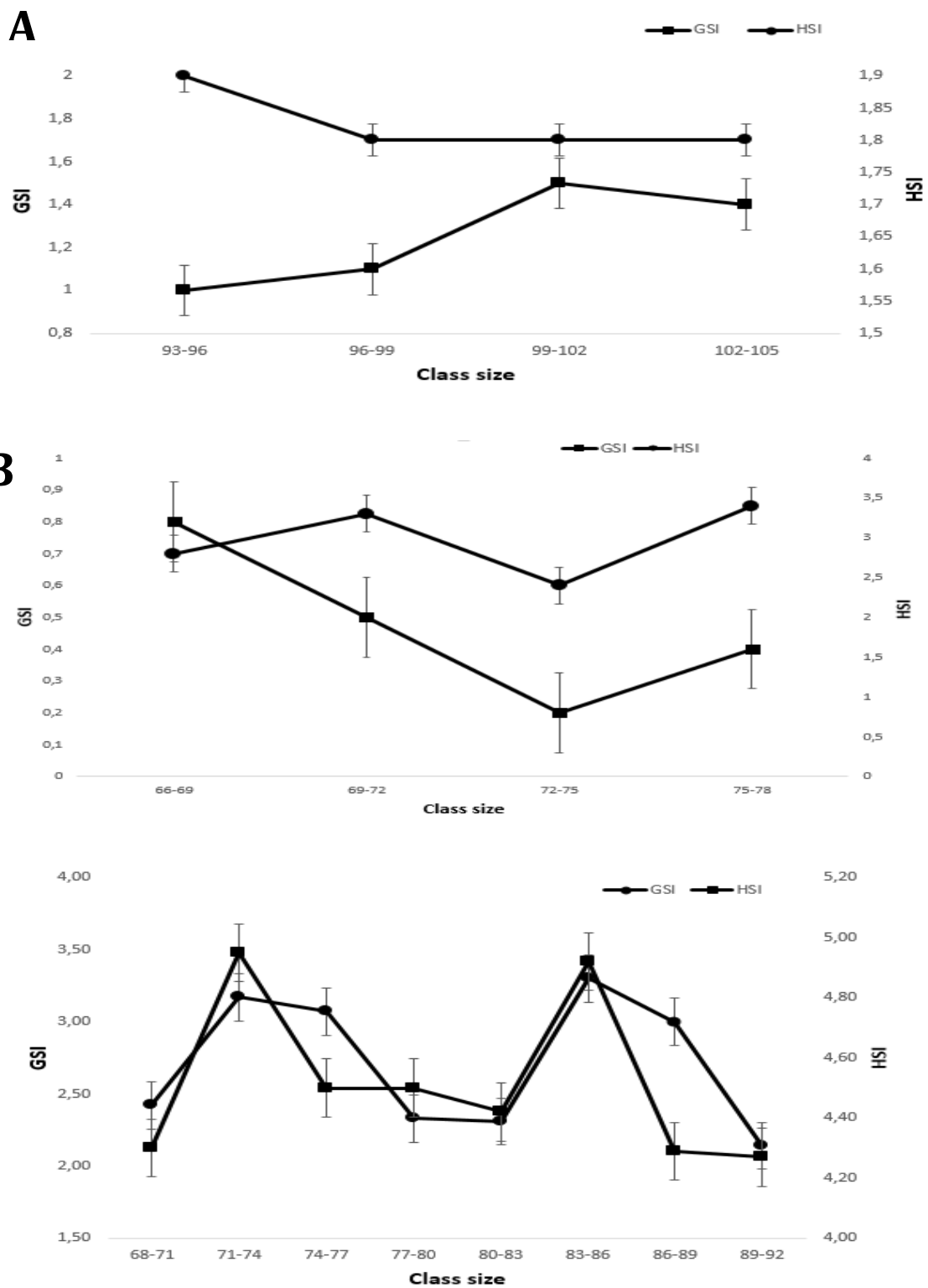


Figura 2. Índice gonadossomático (GSI) e índice hepatossomático (HSI). Variação média de GSI e HSI de machos de *Achelous spinimanus* (a) *Cronius ruber* (b) e *Arenaeus cribrarius* (c).

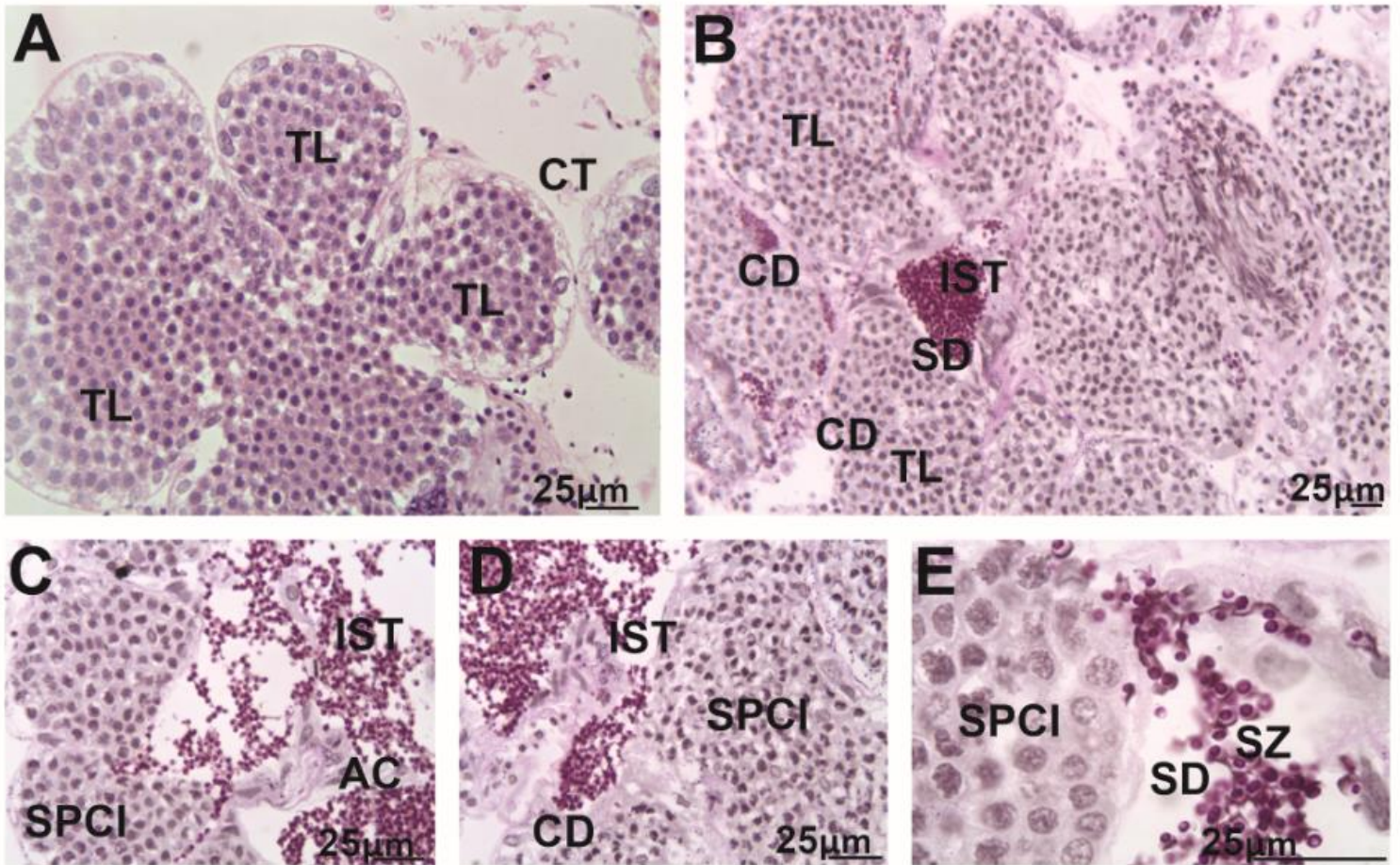


Figura 3. Testículo. A). O testículo tipo lobular de Portunoidea. Cada lóbulo está envolto por fina camada de tecido conjuntivo, células acessórias possuem núcleos variando de achatados a arredondados e conectados por um ducto seminífero central. No interior nota-se os espermatócitos primários no mesmo estágio de maturação. B-D). Espermátides iniciais com núcleos em formato de “C” ocupando os lóbulos E). Ao terminarem a espermiogênese, os espermatozoides são evacuados para o ducto seminífero. AC= células acessórias; CT= tecido conjuntivo; CD= Duto coletor; IST Espermátides iniciais; SD= Duto seminífero; SPCI= espermatócitos primários; SZ= espermatozoides; T=testículo.

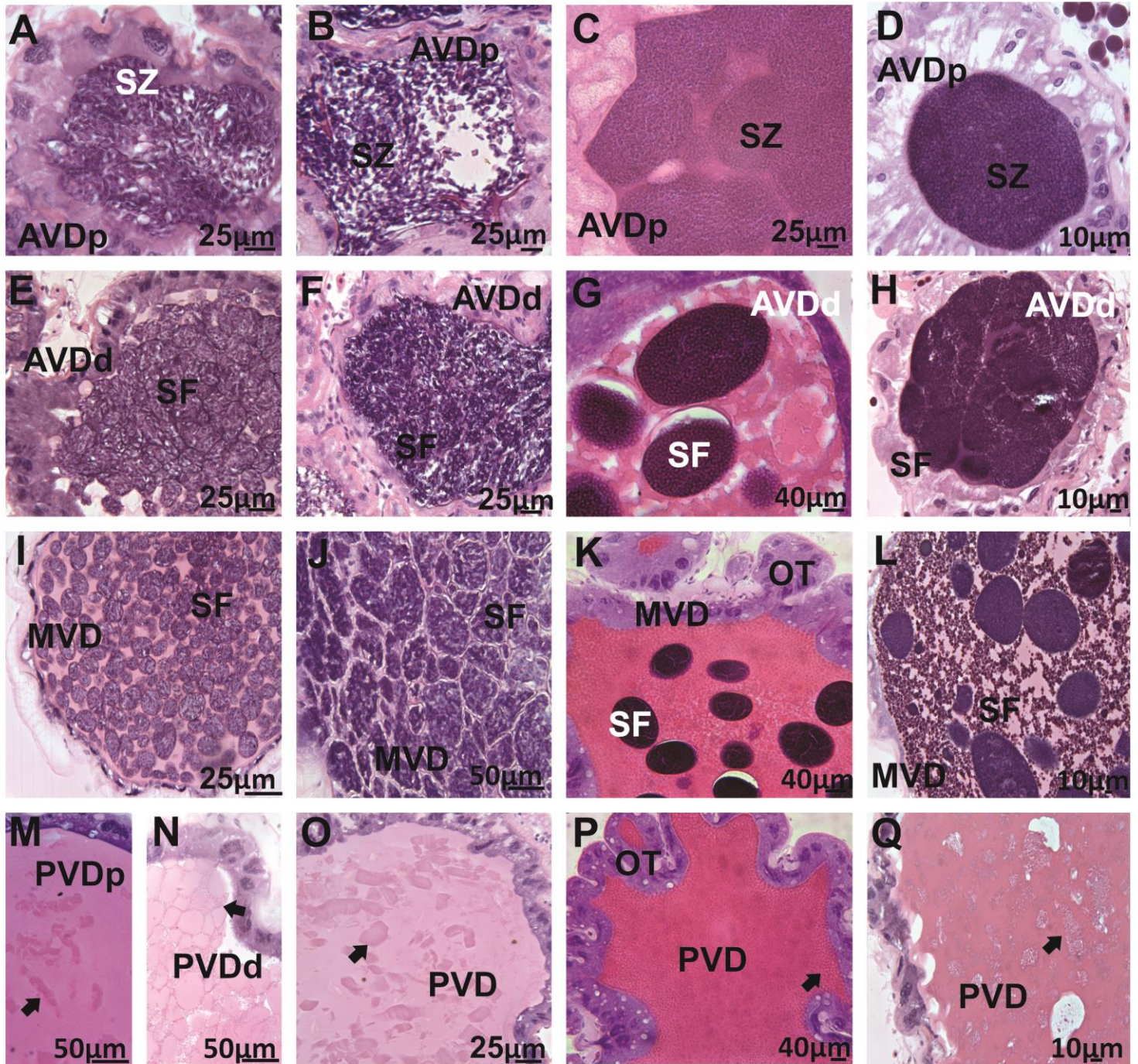


Figura 4. Vasos deferentes. A, B, C, D). Porção proximal do vaso deferente anterior formada por tecido conjuntivo e uma camada muscular onde está acentado o epitélio colunar simples com núcleos arredondados-elípticos. Massa homogênea de espermatozoides maduros preenchendo o lúmen. E, F, G, H). Região distal do vaso deferente anterior com os espermatóforos montados. I, J, K, L). Na região média do vaso deferente nota-se epitélio pavimentoso e a camada de tecido muscular é espessa. Os espermatóforos estão imersos em secreção acidófila, a qual em K e L, também é composta por grânulos basófilos. M, N, O, P, Q.) A região posterior do vaso deferente (PVD) possui epitélio colunar com núcleos irregulares e camada de tecido muscular, envolvidos por tecido conjuntivo, no lúmen deste vaso encontra-se um grande volume de secreção. Em *Achelous*, a PVD foi dividida em proximal (M) e distal (N) devido aos diferentes tipos de secreção. A seta preta evidencia a secreção tipo II que se encontra imersa na matriz. Figura A, E, I, M, N: *Achelous*. Figura B, F, J, O: *Cronius ruber*. Figura C, G, K, P: *Arenaes cribrarius*. Figura D, H, L, Q: *Ovalipes trimaculatus*. AVDd= porção distal da região anterior do vaso deferente; AVDp= porção proximal da região anterior do vaso deferente; MVD=região média do vaso deferente; OT=bolsas laterais; PVD=região posterior do vaso deferente; PVDd= porção distal da região posterior do vaso deferente; PVDp= porção proximal da região posterior do vaso deferente; SF= espermatóforos; SZ: espermatozoides.

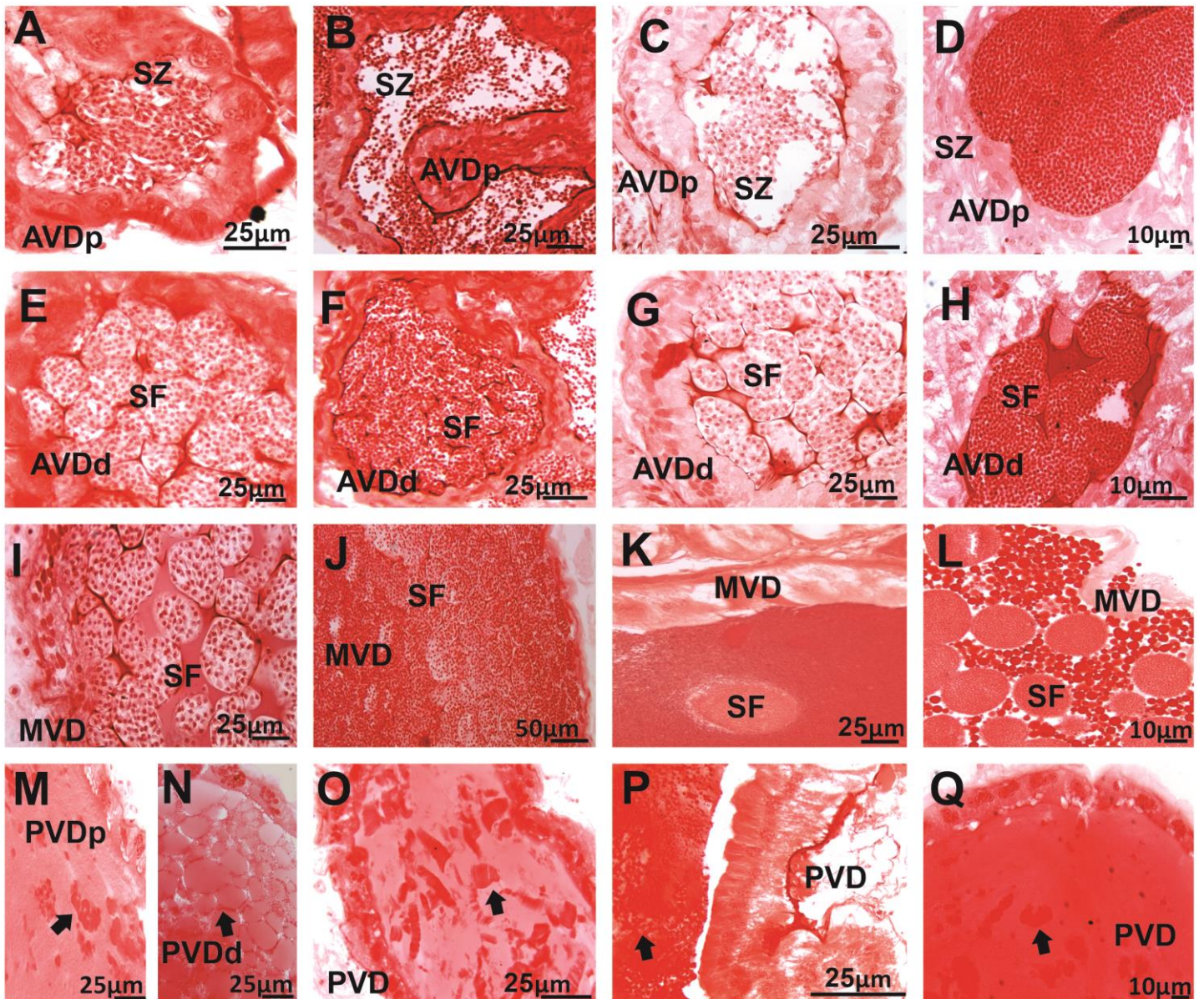


Figura 5. Histoquímica dos vasos deferentes (proteínas). A, B, C, D). AVDp com secreção positiva para proteínas com exceção de *Arenaeus cribrarius*. E, F, G, H). Região distal do vaso deferente anterior com reação fortemente positiva para proteínas em todas as espécies. I). MVD com reação positiva para proteínas; J). Secreção da MVD fortemente positiva para proteínas; K). MVD com secreção granular e fortemente positiva para proteínas; L). Secreção com grandes grânulos fortemente positivos para proteínas. M, N, O). As secreções da matriz apresentam reação fortemente positiva para proteínas, enquanto a secreção tipo II (seta) apresenta reação fortemente positiva. P, Q.) A PVD possui epitélio colunar pseudoestratificado com núcleos irregulares e camada de tecido muscular, envolvidos por tecido conjuntivo, no lúmen deste vaso encontra-se um grande volume de secreção. Em *Achelous* a PVD foi dividida em proximal (M) e distal (N) devido aos diferentes tipos de secreção. A seta preta evidencia a secreção tipo II que encontra-se imersa na matriz. Figura A, E, I, M, N: *Achelous*. Figura B, F, J, O: *Cronius ruber*. Figura C, G, K, P: *Arenaeus cribrarius*. Figura D, H, L, Q: *Ovalipes trimaculatus*. AVDp= porção proximal da região anterior do vaso deferente; AVDd= porção distal da região anterior do vaso deferente; MVD=região média do vaso deferente; PVD=região posterior do vaso deferente; PVDd= porção distal da região posterior do vaso deferente; PVDp= porção proximal da região posterior do vaso deferente; SF= espermatozoides; SZ: espermatozoides.

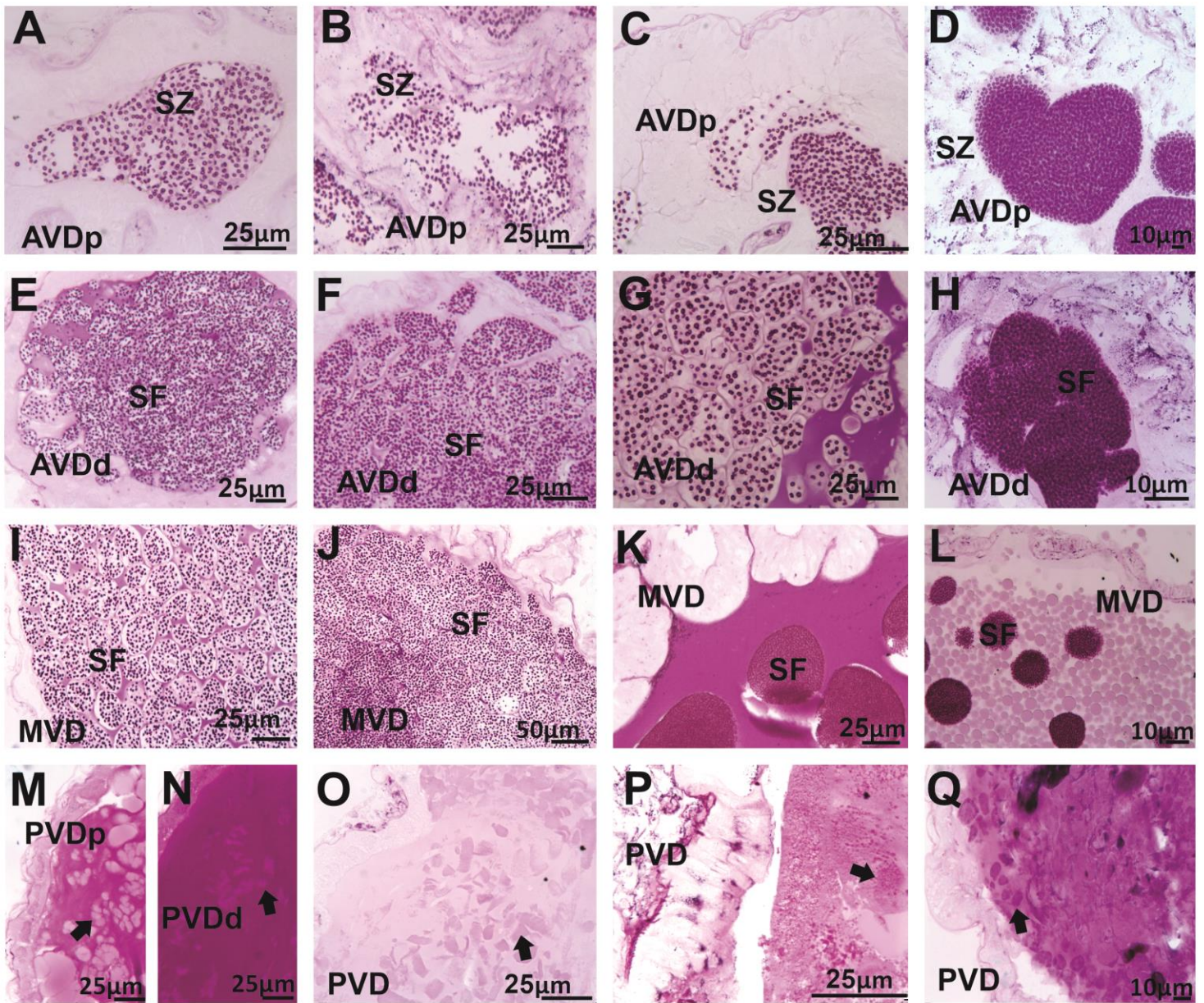


Figura 6. Histoquímica dos vasos deferentes (polissacarídeos neutros). A, B, C, D). AVDp com secreção fracamente positiva para PAS com exceção de *Ovalipes trimaculatus* que apresenta reação fortemente positiva. E, F, G, H). AVDd com reação positiva para polissacarídeos neutros em todas as espécies. I e J). MVD com reação positiva para proteínas; K). Secreção da MVD fortemente positiva para PAS; L). MVD com secreção granular e fracamente positiva polissacarídeos neutros; M, N). As secreções da matriz da PVD apresentam reação fortemente positiva para polissacarídeos neutros, enquanto a secreção tipo II (seta) apresentam fraca reação. O). Secreção da matriz fracamente positiva para polissacarídeos neutros e a secreção tipo II positiva (seta). P, Q.) Secreção granular fortemente positiva pra polissacarídeos neutros e, a matriz se mostra positiva. Figura A, E, I, M, N: *Achelous* spp. Figura B, F, J, O: *Cronius ruber*. Figura C, G, K, P: *Arenaeus cribrarius*. Figura D, H, L, Q: *Ovalipes trimaculatus*. AVDp= porção proximal da região anterior do vaso deferente; AVDd= porção distal da região anterior do vaso deferente; MVD= região média do vaso deferente; PVD= região posterior do vaso deferente; PVDd= porção distal da região posterior do vaso deferente; PVDp= porção proximal da região posterior do vaso deferente; SF= espermátóforos; SZ: espermatozoides.

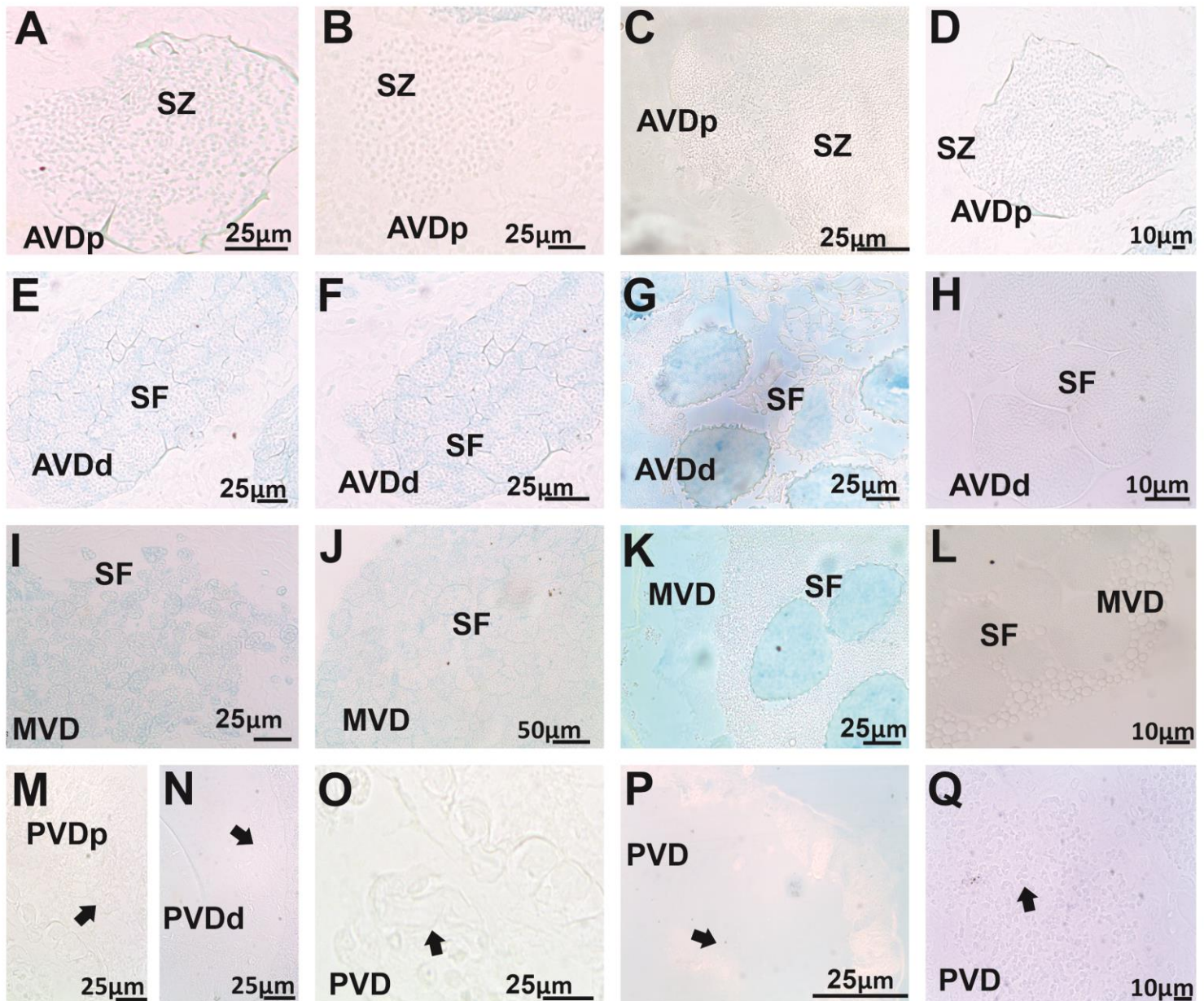


Figura 7. Histoquímica dos vasos deferentes (polissacarídeos ácidos). A, B, C, D). AVDp com secreção fracamente positiva azul de Alcian com exceção de *Arenaeus cribrarius* que apresenta reação fortemente positiva. E, F, G, H). AVDd com secreção fracamente positiva azul de Alcian com exceção de *Arenaeus cribrarius* que apresenta reação fortemente positiva ao redor dos espermatóforos. I e J). MVD fracamente positiva para polissacarídeos ácidos; K). Secreção da MVD positiva para Alcian; L). MVD com secreção granular sem reação para polissacarídeos ácidos; M, N, O). As secreções da PVD não apresentam reação alcianofílica. P). Secreção fracamente positiva para polissacarídeos ácidos. Q.) Secreção sem reação para polissacarídeos ácidos. Figura A, E, I, M, N: *Achelous* spp. Figura B, F, J, O: *Cronius ruber*. Figura C, G, K, P: *Arenaeus cribrarius*. Figura D, H, L, Q: *Ovalipes trimaculatus*. AVDp= porção proximal da região anterior do vaso deferente; AVDd= porção distal da região anterior do vaso deferente; MVD= região média do vaso deferente; PVD= região posterior do vaso deferente; PVDd= porção distal da região posterior do vaso deferente; PVDp= porção proximal da região posterior do vaso deferente; SF= espermatóforos; SZ: espermatozoides.

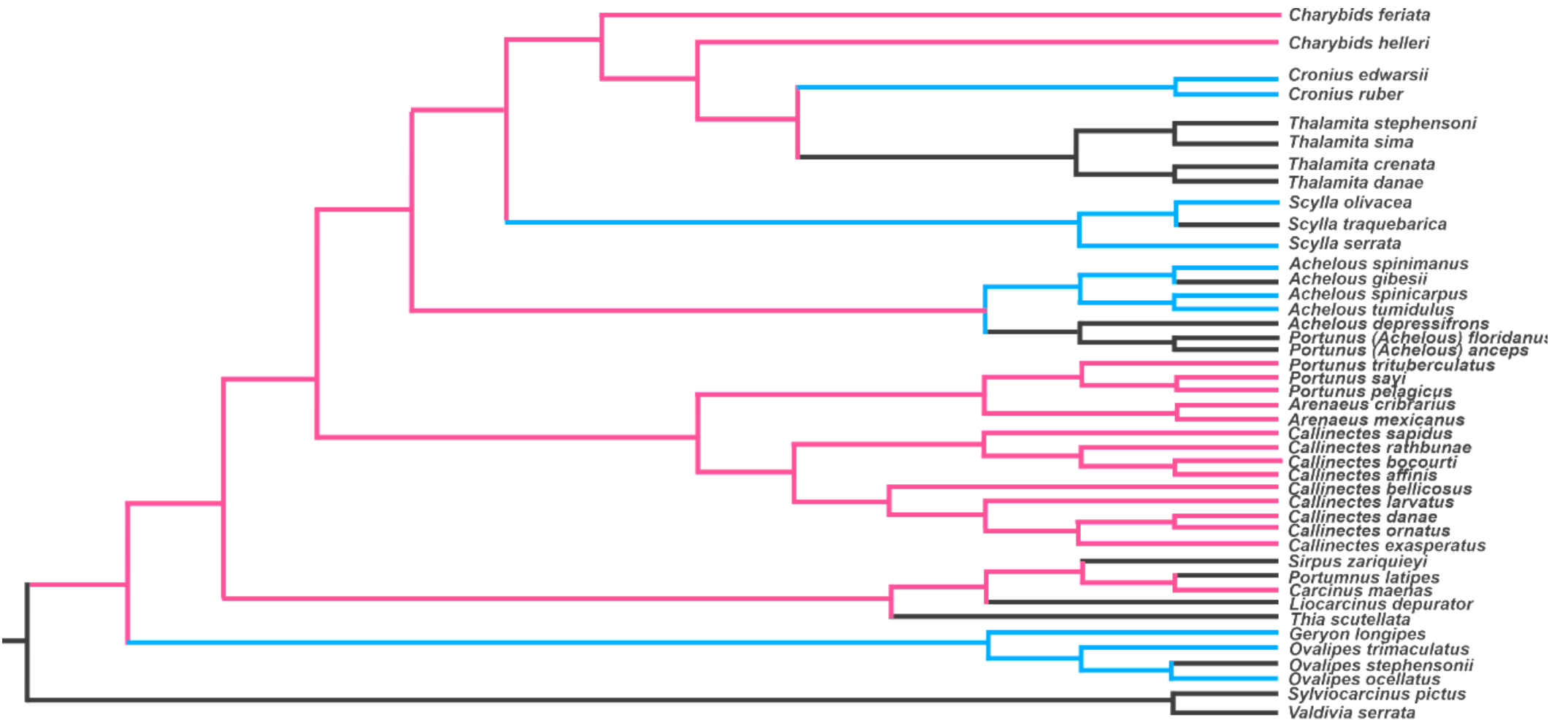


Figura 8. Diagrama de mapeamento do caráter morfológico 1 (Bolsas laterais) traçado com base no filograma de Evans (2018). Estados de caráter: Ausente (blue); Presente (pink); not described (black).

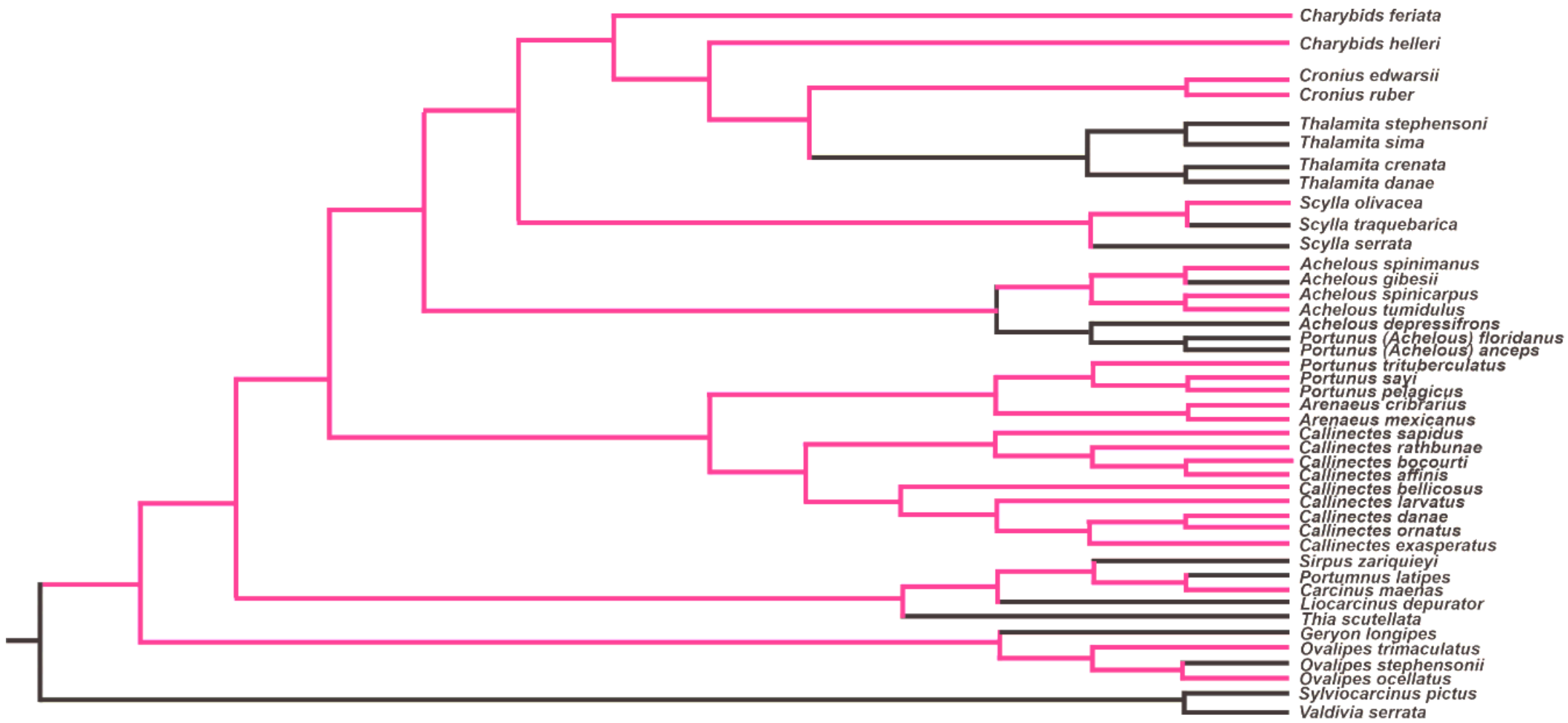


Figura 9. Diagrama de mapeamento do caráter morfológico 2 (Espermatóforos na PVD) traçado com base no filograma de Evans (2018). Estados de caráter: Presente (Blue); Ausente (Pink); Not described (Black).

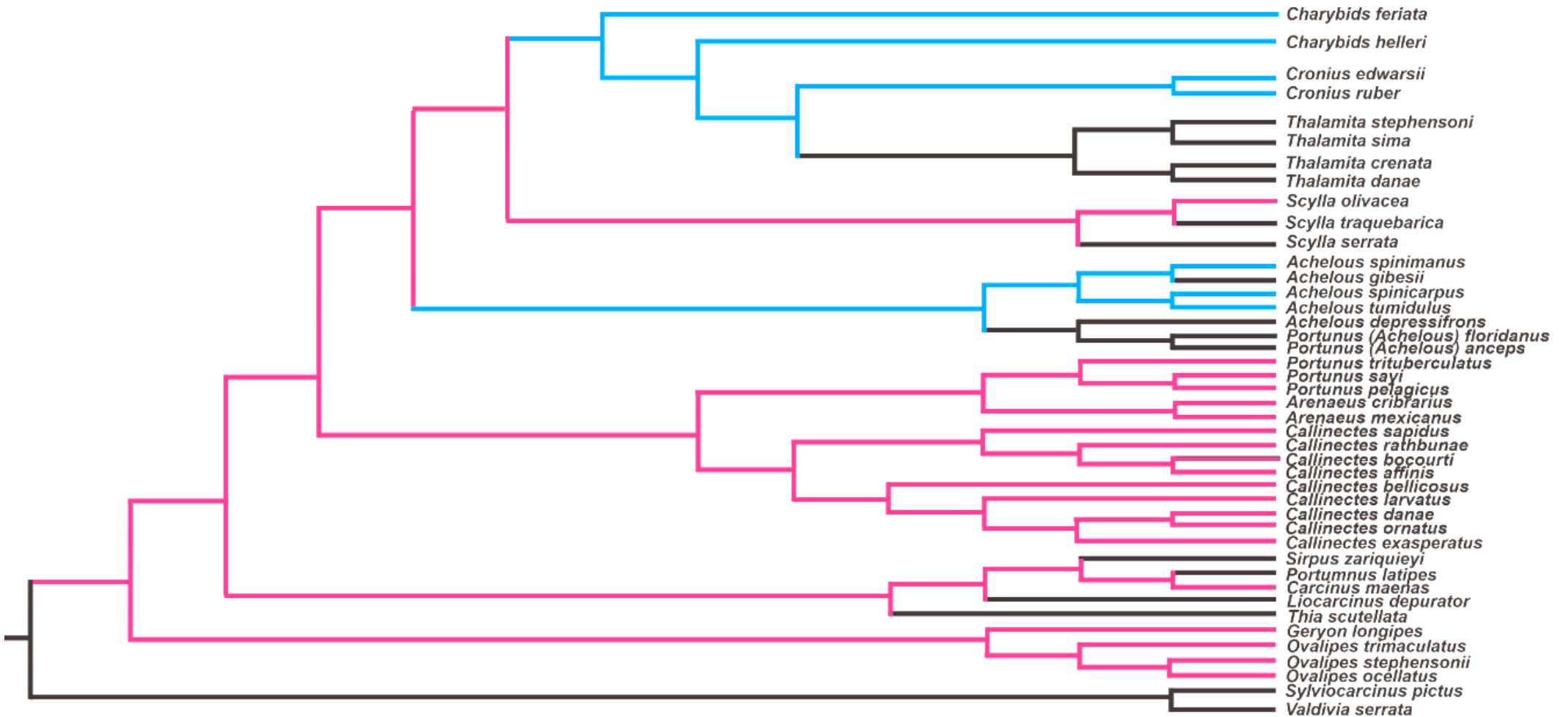


Figura 10. Diagrama de mapeamento do caráter morfológico 3 (Secreção granular na MVD) traçado com base no filograma de Evans (2018). Estados de caráter: Presença (Pink); Ausência (Blue), Not described (Black)

Discussão

Este estudo revelou que as espécies *A. spinimanus* e *Cr. ruber* apresentam um padrão diferente da maioria dos Portunidae em relação a produção de fluido seminal e espermátóforos. O GSI destes animais possui um valor médio de 1,5% e 0,5% respectivamente. O resultado encontrado para *Cr. ruber* se assemelha com o descrito para o também Thalamitinae *Ch. helleri* que apresenta GSI médio de 0,4% (Watanabe et al., 2022). Em relação a *A. spinimanus*, o valor encontrado não se assemelha a nenhum outro Portunoidea. Uma vez que, o padrão descrito até o momento para os Portuninae formadores de plug-espermático revela um alto GSI, no qual a média fica acima de 3%. Tal resultado foi verificado em *Ar. cribrarius* neste trabalho que mostrou GSI acima de 3% e é também um formador de plug-espermático, bem como *Calinectes danae* Smith 1869, *Callinectes bocourti* A. Milne-Edwards 1879, *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 e *Portunus pelagicus* Linnaeus 1758 (Bawab e El-Sherief, 1988; Zara et al., 2012; Nascimento e Zara, 2013; Watanabe et al., 2020). O baixo GSI encontrado nos Thalamitinae *Cr. ruber* e *Ch. helleri*, e também no Portuninae *Achelous spinimanus* apontam para um padrão diferente de produção de fluido seminal e armazenamento que podem desempenhar um papel fundamental durante a transferência para a fêmea receptáculo seminal. Neste estudo não analisamos diferentes estágio de desenvolvimento dos machos, mesmo para *A. spinimanus* utilizamos apenas machos maduros. Assim, os machos tiveram GSI e HSI muito semelhantes independente de sua classe de tamanho, o que mostra que mesmo os machos menores são morfologicamente e fisiologicamente capazes de copular. Este resultado também foi encontrado para os Thalamitinae do gênero *Thalamita* e *Charybdis helleri*, o que pode ocasionar um aumento na competição pelas fêmeas para copular (Norman, 1996; Norman et al., 1997, 1999; Watanabe et al., 2022).

As espécies de *A. spinicarpus*, *A. spinimanus*, *A. tumidulus*, *Cr. Ruber*, *Ar. cribrarius* e *O. trimaculatus* apresentam o sistema reprodutor masculino dividido em testículo e vaso deferente, com a forma da letra “H” seguindo o que foi descrito para Portunidae (Zara et al., 2014; Watanabe et al., 2020), além disso, segue o padrão de organização anatômica descrito para outros Eubrachyura (Fasten, 1918; Ryan, 1967; Johnson, 1980; Moriyasu & Benhalima, 1998; Simeó et al., 2009; Stewart et al., 2010; Antunes et al., 2018). Os testículos das seis espécies estudadas foi classificado como do tipo lobular (Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2009) e este é o padrão típico registrado entre os Portunidae (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013, Watanabe et al., 2020) e também para a maioria dos outros caranguejos braquiúros (Johnson, 1980; Batoy et al., 1989; Diesel, 1989; Moriyasu e Benhalima, 1998;

Castilho et al., 2008; Erkan et al., 2009; Santos et al., 2009, Simeó et al., 2009). Assim, como proposto por Nagao & Munehara (2003), as células germinativas possuem um padrão de maturação característico do tipo lobular de testículo uma vez que, apresenta regionalizações aleatórias, contendo células do mesmo estágio de desenvolvimento em cada túbulo. Dentro dos lóbulos testiculares onde a espermatogênese ainda não está avançada, as células acessórias são semelhantes as observadas em *Callinectes* (Johnson, 1980) e *Portunus* (Ryan, 1967; Batoy et al., 1989; Stewart et al., 2010) com núcleos arredondados. No final da espermiogênese nas espécies deste trabalho, apenas espermatozoides maduros são liberados para os dutos seminíferos, assim como em outras espécies de Portunidae (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013, Watanabe et al., 2020) e em *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788) (Antunes et al., 2018) sendo, o contrário do observado nos testículos tubulares de *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius, 1788) e *Eriphia verrucosa* (Forskål, 1775), no qual as espermatídes maduras ainda são observadas no lúmen dos testículos (Sainte-Marie e Sante-Marie, 1998; Erkan et al., 2009). Desta maneira, o testículo do tipo lobular é um caráter comum compartilhado por todos os Portunoidea estudados.

Os vasos deferentes são divididos em região anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD) seguindo o padrão descrito para Brachyura (Diesel, 1989; Krol et al., 1992; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998; Benhalima & Moriyasu, 2000; Simeó et al., 2009; Sal Moyano et al., 2009; Zara et al., 2012; Antunes et al., 2018; Watanabe et al., 2020). A AVD apresenta epitélio colunar simples com núcleos irregulares envolto por camada muscular e tecido conjuntivo. Esta mesma organização tecidual foi descrita para outros membros de Portunidae, como exemplo para espécies do gênero *Callinectes* e *Charybdis*, e para Ocypodoidea e Majoidea (Castilho et al., 2008; Simeó et al., 2009; Sal Moyano et al., 2009; Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013, Antunes et al., 2018; Watanabe et al., 2020, 2022). A AVD das espécies estudadas é dividida em duas porções: a proximal (AVDp) e a distal (AVDd). Esta divisão é baseada na formação dos espermatóforos coenospérmicos. A divisão da AVD em duas porções já foi descrita para outros Portunidae, Grapsoidea e Majoidea (Cronin, 1947; Ryan, 1967a; Santos et al., 2009; Nicolau et al., 2012; Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013; Antunes et al., 2018; Watanabe et al., 2020). A AVD é a região onde ocorre a formação dos espermatóforos. No caso da maioria dos Portunoidea, este processo se inicia na porção proximal e termina na porção distal, assim como descrito para todas as espécies do gênero *Callinectes*, *Arenaeus*, *Portunus*, *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758), *Ovalipes ocellatus* (Herbst, 1799) e *Geryon fenneri* Manning & Holthuis, 1984 (Spalding, 1942; Hinsch, 1986, 1988; Zara et al., 2012;

Nascimento & Zara et al., 2013; Zara et al., 2014; Watanabe et al., 2020), Majoidea (Sal Moyano et al., 2009; Antunes et al., 2018) e Grapsoidea (Garcia & Silva, 2006; Tiseo et al., 2014). Entretanto, assim como descrito por Watanabe et al. (2022) para o Thalamitinae *Ch. hellerii*, em *Achelous* spp e *Cr. ruber* a AVDd com amplo lúmen é o principal sítio de armazenamento de espermátóforos maduros, ao contrário do que foi observado em todos os outros Portunidae, Geryonidae e Carcinidae, até o momento, incluindo os aqui estudados *Ar. cribrarius* e *O. trimaculatus*. As secreções luminais da AVD desempenham um papel central na formação do espermátóforo e na polimerização do plug-espermático (Watanabe et al., 2020; Assugeni et al., 2021), o que parece ser o caso de *Ar. cribrarius* e *O. trimaculatus*. Porém, tais secreções não parecem ter esta função em *Achelous* e *Cr. ruber*, sendo estas mais parecidas a *Ch. hellerii*, o qual não parece ser produtor de plug-espermático (Watanabe et al., 2022).

Nas cinco espécies estudadas a formação do espermátóforo mostra o mesmo padrão, porém com características histoquímicas distintas. Assim, dois tipos de secreções luminais são encontrados no AVD. A secreção matriz (tipo I) basófila aumenta a densidade espermática e forma pequenas cristas entre a massa de espermatozoides e a secreção acidófila (tipo II) que aparece predominantemente na AVDd, separa os espermatozoides em massas (formando as paredes dos espermátóforos), o que se confirma pelas particularidades histoquímicas dos espermátóforos. Estes mesmos tipos de secreção com a mesma funcionalidade foram descritos para outros Portunoidea, como *Callinectes*, *Charybdis* e para o Carcinidae, *Car. maenas* (Nascimento & Zara, 2013; Ravi et al., 2014; Ryan, 1967; Spalding, 1942; Waiho et al., 2017; Zara et al., 2012, Watanabe et al., 2020, 2022). Nas espécies de *Achelous* e de *Cronius* a secreção tipo I (matriz) da AVDp, a qual separa os espermatozoides em massas, é acidófila e glicoproteica com a reação fracamente positiva para polissacarídeos ácidos. Em *Ovalipes*, a diferença se dá pela presença de uma secreção basófila e glicoproteica com reação fracamente positiva para polissacarídeos ácidos, que separa os espermatozoides em massas, similar ao observado para *Ch. helleri* (A. Milne-Edwards, 1867) (Watanabe et al., 2022). Porém, em *Arenaeus* o padrão histoquímico de formação dos espermátóforos é o mesmo descrito para *Callinectes*, o qual nota-se que a secreção que envolve a massa de espermatozoides da AVDp é acidófila, fortemente reativa para polissacarídeos ácidos, polissacarídeos neutros e proteínas (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara et al., 2013; Watanabe et al., 2020). As mesmas características histoquímicas de secreção são mantidas na AVDd com exceção de *Arenaeus* uma vez que, ocorre a adição de proteínas e polissacarídeos ácidos, os quais são misturados a secreção da AVDp, sendo este novo composto presente também na parede do espermátóforo.

Além disso, conforme descrito para a maioria dos membros de Brachyura, as secreções basófilas e acidófilas na AVDp são uma característica comum relatada para formação de espermatóforos (Spalding, 1942; Uma e Subramoniam, 1979; Johnson, 1980; Sainte-Marie, 1999; Simeó et al., 2009; Stewart et al., 2010). Na AVDd das cinco espécies aqui estudadas, massas espermáticas já envoltas pela parede do espermatóforo continuam a receber glicoproteínas, sempre separadas por polissacarídeos neutros, como relatado para outras espécies de braquiúros (Johnson, 1980; Garcia e Silva, 2006; Erkan et al., 2009). Anilkumar & Subramoniam (1999) sugeriram que a parede do espermatóforo é composta por proteínas ligadas a glicosaminoglicanos, enquanto Garcia & Silva (2006) sugeriram que a parede é composta de polissacarídeos neutros. Em nosso estudo, a secreção apresentou polissacarídeos neutros e proteínas, com reação fortemente positiva para polissacarídeos ácidos em *Arenaeus*, assim como foi observado em *Callinectes* (Nascimento & Zara, 2013; Zara et al., 2012; Watanabe et al., 2020). Esse padrão, ou seja, duas substâncias com diferentes compostos secretados na AVD para formar os espermatóforos, parece ser a forma mais geral e padrão de Eubrachyura, uma vez que tem sido observado em muitas espécies (Adiyodi & Anilkumar, 1988; Cronin, 1947; Johnson, 1980; Nascimento & Zara, 2013; Ravi et al., 2014; Ryan, 1967; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1999; Simeó et al., 2009; Stewart et al., 2010; Tiseo et al., 2014; Zara et al., 2012). Assim, propomos que a secreção positiva para polissacarídeos ácidos que ocorre nas espécies formadoras de plug-espermático deste trabalho e de outras já descritas na literatura, pode atuar também na catalização deste, uma vez que já existe a comprovação de que a secreção da AVD também participa na formação do plug-espermático (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013; Assugeni et al., 2021). Além disso, nas espécies que possuem a secreção da AVD com fraca reação para os polissacarídeos ácidos, como *Achelous* e *Cronius*, este parece atuar juntamente com os polissacarídeos neutros, na compactação das massas espermáticas para formação dos espermatóforos. Em *Charybdis*, a secreção possui reação positiva para polissacarídeos ácidos ao longo de todo o vaso deferente, assim este deve atuar tanto na compactação dos espermatóforos, como na manutenção destes no receptáculo seminal (Watanabe et al., 2022). As substâncias basófilas e acidófilas da AVDp são uma característica comum relatada para a produção de espermatóforos tanto para Portunidae (Spalding, 1942; Uma e Subramoniam, 1979; Johnson, 1980; Stewart et al., 2010) quanto para Majoidea (Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1999; Simeó et al., 2009).

A MVD de todas espécies aqui estudadas apresenta epitélio secretor colunar simples com núcleos irregulares e basais, e com menor espessura que as outras regiões do vaso

deferente, devido ao grande volume de secreção e espermatozoides que fazem com que o epitélio fique mais achatado. À medida que o fluido seminal aumenta na MVD, os espermatóforos estão mais distantes uns dos outros. Esta mesma morfologia foi descrita para espécies do gênero *Callinectes* (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara et al., 2013; Watanabe et al., 2020), para Majoidea (Sal Moyano et al., 2009; Simeó et al., 2009), e Ocypodidae (Castilho et al., 2008). No lúmen da MVD, encontram-se espermatóforos imersos em fluido seminal acidófilo. Em *Achelous* e *Cronius*, a secreção da MVD é intensamente reativa para proteínas e reativa para polissacarídeos neutros e para os ácidos, similar ao que foi observado nos *Charybdis* (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara et al., 2013; Watanabe et al., 2020, 2022). Em *Ar. cribrarius*, os espermatóforos estão imersos em secreção granular basófila com pequenos grânulos acidófilos, com reação fortemente positiva para proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos. Este mesmo padrão foi observado para *O. trimaculatus*, no qual a MVD apresenta grânulos imersos em secreção acidófila em meio aos espermatóforos. Em Portunoidea, tais grânulos estão relacionados a formação de plug-espermático, uma vez que ocorre na MVD de todas as espécies descritas até o momento e que se utilizam desta estratégia: *Callinectes*, *Arenaeus*, *Portunus*, *Chaceon fenneri* e *Car. maenas* e *Ovalipes* (Spalding, 1942; Hinsch et al., 1986, 1988; Stewart et al., 2010; Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013; Zara et al., 2014; Watanabe et al., 2020; Assugeni et al., 2021). Tal característica de secreção não foi observada nos Portunidae do gênero *Achelous* e *Cronius* (deste trabalho) e nem nas espécies do gênero *Charybdis* descritas na literatura (Wong & Swell, 2015; Watanabe et al., 2022). Esta secreção granular parece ser sinapomorfia dos grupos de Portunoidea que realizam a formação de plug-espermático e a ausência desta secreção a apomorfia dos grupos que não a possuem (*Achelous*, *Cronius* e *Charybdis*). Estes grânulos possuem reação fortemente positiva para proteínas e polissacarídeos neutros, sem reação para o polissacarídeos ácidos. Na MVD, os espermatóforos estão completamente formados e permanecem armazenados até a transferência para o receptáculo seminal feminino. A finalização da formação de espermatóforos na AVD e o armazenamento principalmente na MVD ocorre em todas as espécies estudadas neste trabalho e em outras como as do gênero *Callinectes*, *Charybids*, *Ovalipes*, *Geryon*, e também *Cancriidae* e Majoidea, assim, nestas a PVD mostra apenas secreção com resquícios ou ausência de espermatozoides ou espermatóforos. Desta maneira, este tipo de transferência espermática na qual a MVD é a principal região de armazenamento de espermatóforos, parece ser padrão para as espécies que produzem plug-espermático ou pacotes espermáticos em Brachyura (Beninger et al., 1988; Diesel, 1989; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998; Sainte-Marie et al., 2000;

Benhalima & Moriyasu, 2000; Sal Moyano et al., 2010; Antunes et al., 2016, 2018; Oliveira & Zara, 2018). Nas espécies que produzem pacotes espermáticos, a secreção da PVD separa o fluido seminal mais antigo do mais recente, assim, formando dois ou mais estratos espermáticos. Desta maneira, o que estrato que fertilizará os ovócitos dependerá do tipo de receptáculo seminal (abertura do oviduto) (Antunes et al., 2016; Antunes et al., 2018; Diesel, 1989, 1991). Até o momento, as espécies já descritas na literatura e que produzem pacotes espermáticos possuem glândulas acessórias associadas ao vaso, cuja secreção se mistura com as secreções da PVD criando um gel que agrupa o fluido seminal em pacotes dentro do receptáculo seminal (Antunes et al., 2016, 2018). Geralmente, em espécies que não possuem pacotes espermáticos ou plug-espermático, os espermatóforos são encontrados ao longo de todo o vaso deferente, incluindo a PVD (Sant'Anna et al., 2007; Castilho et al., 2008; Assugeni & Zara, 2022).

A espécie *Ar. cribrarius*, que também é formadora de plug-espermático, possui sistema reprodutor masculino muito similar ao descrito para *Callinectes* (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013; Watanabe et al., 2020). Desta maneira, acreditava-se que as bolsas laterais ocorriam nos vasos deferentes de todos os Portunidae; no entanto, estas bolsas parecem ser mais características, numerosas e maiores em todas as espécies que produzem plug-espermático como *Arenaeus*, *Callinectes* e *Portunus* e no Carcinidae *Car. maenas* (Spalding, 1942; Ryan, 1967a, b; Johnson, 1980; Hinsch, 1988; Zara et al., 2012; Nascimento e Zara, 2013; Ravi et al., 2014; Watanabe et al., 2020). Além disso, as espécies de *Charybdis* descritas na literatura, até o momento, apresentam tais bolsas laterais, porém em menor tamanho e quantidade, além disso, é creditado que estes animais não são formadores formadores de plug-espermático (Wong & Sewell, 2015; Watanabe et al., 2022). Ademais, as bolsas laterais estão ausentes nos formadores de plug-espermático *Scylla olivacea* (Herbst, 1796) e *Scylla serrata* (Forskål, 1775) (Uma & Subramoniam, 1984; Waiho et al., 2017) e também nas espécies do gênero *Ovalipes*, tanto na espécie estudada neste trabalho, como em *O. ocellatus* já publicado na literatura (Hinsch, 1986). Estes animais que são pertencentes a família Geryonidae possuem o sistema reprodutor masculino muito similar ao descrito para *Chaceon*, também formador de plug-espermático (Hinsch, 1988), porém, em *Ovalipes trimaculatus* nota-se ausência de tais bolsas. Sendo assim, a ausência destas a apomorfia deste gênero e de *Scylla*. Desta maneira, pode-se considerar ainda, a presença de bolsas laterais e ausência de espermatóforos na PVD uma sinapomorfia compartilhada por alguns Portunoidea, recentemente rearranjados nesta família (Evans, 2018), independentemente de produzir plug-espermático ou não.

O epitélio da PVD torna-se mais espesso nesta região, em relação a MVD, provavelmente devido a presença de apenas secreção, sem a presença de espermátóforos, além disso, apresenta epitélio cúbico simples com núcleos irregulares. Esta mesma organização tecidual também foi verificada em outros Portunidae (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013; Watanabe et al., 2020, 2022), Majoidea, (Hinsch & Walker, 1974; Simeó et al., 2009; Sal Moyano et al., 2009), e Eriphiidae (Erkan et al., 2009). A PVD volumosa e sem espermátóforos é uma característica ancestral e comum aos Portunoidea descritos na literatura até o momento, sendo que estes realizam a formação de plug-espermático (Spalding, 1942; Ryan, 1967a, b; Johnson, 1980; Hinsch, 1988; Zara et al., 2012; Nascimento e Zara, 2013; Ravi et al., 2014; Watanabe et al., 2020). Em contraposição, a PVD menos volumosa e sem espermátóforos pode ser também indicativa da formação de pacotes espermáticos, que seriam descritos pela primeira vez neste grupo. A secreção em todas as espécies estudadas possui característica acidófila, assim como descrito para *Callinectes*, *Portunus* e *Scylla*. Na região proximal nota-se que a matriz é acidófila, glicoproteica com reação fortemente positiva para polissacarídeos neutros e não reativa para polissacarídeos ácidos, além de apresentar grandes grânulos com aspecto coagulado. Já a região distal da PVD apresenta secreção matriz acidófila, com aspecto fibrilar, glicoproteica com reação positiva para polissacarídeos neutros, sendo a parte fibrilar desta secreção com reação fortemente positiva para proteínas. Estas secreções não possuem reação para polissacarídeos ácidos. A PVD de *Cronius*, *Ar. cribrarius* e *O. trimaculatus* apresenta secreção com as mesmas características fibrilares da PVD de *Achelous*. Este mesmo tipo de secreção foi descrito para *Callinectes*, *Charybids*, *Car. maenas*, *O. ocellatus* e também *Chaceon fenneri* (Hinsch 1986, 1988; Wong & Sewell, 2005; Watanabe et al., 2022). As características histoquímicas desta secreção são as mesmas descritas para *Callinectes* (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013; Watanabe et al., 2020), sendo a secreção acidófila, a matriz com reação positiva para proteínas e polissacarídeos neutros, enquanto a mais fibrilar mostra reação fortemente positiva. A PVD de *Ovalipes* mostra secreção similar ao descrito para *Ch. helleri* com algumas regiões amorfas (sem reação para nenhuma coloração), porém com matriz acidófila, fortemente reativa para proteínas e polissacarídeos neutros e sem reação para polissacarídeos ácidos. Assim, pode-se considerar esse tipo de secreção de aspecto fibrilar que ocorre na PVD da maioria dos Portunoidea a sinapomorfia do grupo.

Em conclusão, a morfologia do sistema reprodutor masculino segue o padrão geral proposto para Brachyura. O principal sítio de armazenamento dos espermátóforos nas espécies aqui estudadas é na AVDP. A característica ancestral trata-se da formação de plug-

espermático, sendo este um caráter plesiomórfico a ausência deste, pode levar a formação de pacotes espermáticos e ocorre de maneira homoplásica em Thalamitinae e *Achelous*, sendo este aspecto uma sinapomorfia para o gênero *Achelous*. Ademais, a PVD apresenta somente secreção, com ausência de espermatóforos ou espermatozoides, o que parece ser a sinapomorfia dos Brachyura formadores de plug-espermático ou pacote espermático. A secreção granular na MVD parece ser uma característica exclusiva dos animais formadores de plug-espermático. Além disso, pela primeira vez foi proposto a divisão da PVD em duas regiões: proximal e distal para o gênero *Achelous*. Os *Arenaeus* possuem caracterização típica dos Portunoidea formadores de plug-espermático, com a presença de bolsas laterais. Assim, a ausência destas estruturas (bolsas laterais) em *Achelous*, *Cronius* e *Ovalipes* indica que este é um caráter homoplásico entre gêneros de Portunoidea uma sinapomorfia para os Portuninae *A. spinimanus*, *A. spinicarpus* e *A. tumidulus*.

Referências

- Adiyodi, K. G. & Anilkumar, R. G., 1988. Accessory sex glands. In K. G. Adiyodi & R. G. Adiyodi (Eds.), Reproductive biology of invertebrates, 3, 261-318. Kerala, India: John Wiley and Sons.
- Anilkumar, K. S. & Subramoniam, T., 1999. Spermatophore transfer and sperm structure in the brachyuran crab *Metopograpsus messor* (Decapoda: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*, 19, 361-370.
- Antunes, M.; Zara, F. J.; López-Greco, L. S.; Negreiros-Fransozo, M. L., 2016. Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea. *Invertebrate Biology*, 135, 75-86.
- Antunes, M.; Zara, F. J.; López-Greco, L. S.; Negreiros-Fransozo, M. L., 2018. Male reproductive system of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* (Inachoididae). *Invertebrate Biology*, 137, 171-184.
- Assugeni, C.O.; Toyama, M.H.; Zara, F.J., 2021. From sperm plug formation to ovulation: morphological and ultrastructural modifications in the seminal receptacle of the blue crab *Callinectes danae*. *Zoologische Anzeiger*, 291, 45-60.
- Assugeni, C.O. & Zara, F.J., 2022. Functional morphology of the seminal receptacle of *Mithrax*, *Mithraculus* and *Omalacantha* spider crabs (Brachyura: Mithracidae). *Tissue and Cell*, 76.
- Batoy, C. B.; Sarmago, J. F.; Pilai, B. C., 1989. Breeding season, sexual maturity and fecundity of the blue crab *Portunus pelagicus* (L.) in selected coastal waters in Leyte and Vicinity, Phillipines. *Annals of Tropical Research* 9, 157-177.
- Bawab, F.M. & El-Sherief, S.S., 1988. Stages of the reproductive cycle of the female crab *Portunus pelagicus* (L., 1758) based on the anatomical changes of the spermatheca (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Crustaceana* 54, 139-148.
- Benhalima, K. & Moriyasu, M., 2000. Structure and function of the posterior vas deferens of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 37, 11-23.
- Beninger, P. G.; Elnor, R. W.; Foyle, T. P.; & Odense, P. H., 1988. Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermathecae in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *Journal of Crustacean Biology*, 8, 322-332
- Boschi, E.E., 1997. Las pesquerías de crustáceos decápodos em El litoral de La República Argentina. *Investigação Marinha de Valparaíso*, 25, 19-40.
- Boos, H.; Oliveira, M.M. & Delfim, R., 2010. Novos registros do siri exótico *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) (Crustacea, Portunidae), no litoral do Estado de Santa Catarina, Brasil. *Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha*, 1, 1-7.
- Castilho, G.; Ostrensky, A. M.; Pie, R & Boeger, W. A., 2008. Morphohistology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica*, 89, 157-161
- Cronin, L.E., 1947. Anatomy and histology of male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of Morphology*, 81, 209-239.
- De-Carli B.P.; Severino-Rodrigues, E.; Rotundo, M.M.; Musielo-Fernandes, J. & Ancona, M.C., 2014. Fecundidade e morfometria de *Achelous spinimanus* (Latreille, 1819) (Brachyura, Portunidae) capturado no litoral do estado de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 40, 487-495.
- Diesel, R., 1989. Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangiium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage and spawning. *Journal of Crustacean Biology*, 9, 266-277.

- Diesel, R., 1991. Sperm competition and mating behavior in Brachyura. In R. T. Bauer & J. W. Martin (Eds.), *Crustacean sexual biology*, 145-163. New York, NY: Columbia University Press.
- Erkan, M.; Tunali, Y.; Balkis, H.; Oliveria, E., 2009. Morphology of Testis and Vas Deferens in the Xanthoid Crab, *Eriphia verrucosa* (Forsk., 1775) (Decapoda: Brachyura). *Journal of Crustacean Biology*, 29, 458-465.
- Evans, N., 2018. Molecular phylogenetics of swimming crabs (Portunoidea Rafinesque, 1815) supports a revised family-level classification and suggests a single derived origin of symbiotic taxa. *PeerJ*, 6, 42-60.
- Fasten, N., 1918. Spermatogenesis of the Pacific Coast Edible Crab, *Cancer magister* Dana. *Biological Bulletin*, 34, 277-306.
- Fracasso, H.A.A., 2002. Carcinofauna acompanhante na pesca artesanal do camarão sete-barbas na Armação do Itapocoroy, Penha, SC. Itajaí, 43p. (Trabalho de conclusão de curso. Oceanografia, UNIVALI).
- Garcia Bento, M. A.; López-Greco, L. S. & Zara, F. J., 2018. Seminal fluid production and sperm packaging in dromiid crabs (Brachyura, Podotremata). *Zoology (Jena, Germany)*, 132, 17-30.
- Garcia, T. M., & Silva, J. R. F., 2006. Testis and vas deferens morphology of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 339-345.
- Hartnoll, R. G., 1969. Mating in Brachyura. *Crustaceana*, 16, 161-181.
- Hinsch, G. W. & Walker, M. H., 1974. The vas deferens of the spider crab, *Libinia emarginata*. *Journal of Morphology*, 143, 1-20.
- Hinsch, G. W., 1986. A comparison of sperm morphologies, transfer and sperm mass storage between two species of crab, *Ovalipes ocellatus* and *Libinia emarginata*. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 10, 79-87.
- Hinsch, G.W., 1988. Morphology of the reproductive tract and seasonality of reproduction in the golden crab *Geryon fenneri* from the Eastern Gulf of Mexico.
- Jivoff, P.; Hines, A.H.; Quackenbush, L.C., 2007. Reproductive Biology and Embryonic Development. In, Cronin, L. E.; Kennedy, V. S. (eds.), *The Blue Crab Callinectes sapidus*. Maryland, Maryland Sea Grant College, 255-286.
- Johnson, P. T., 1980. *Histology of the blue crab (Callinectes sapidus): A model for the Decapoda*. New York, NY: Praeger Scientific.
- Junqueira, L. C. U. & Junqueira, L. M. M. S., 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. São Paulo, Brazil. Ed Santos.
- Klaus, S.; Münzner, S.; Modenbach, A.; Streit, B. & Tudge, C. C., 2013. Spermatophore formation and sperm ultrastructure of *Sundathelphusa philippina* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 94, 267-272.
- Krol, R.M.; Hawkins, W.E.; Overstreet, R.M., 1992. Reproductive components. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Humes AG & Harrison FW, eds. Wiley-Liss, New York, 10, 295-343.
- Koch, M., Spiridonov, V.A., Ďuris, Z., 2022. Revision of the generic system for the swimming crab subfamily Portuninae (Decapoda: Brachyura: Portunidae) based on molecular and morphological analyses. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1-49.

- Mantelatto, F. L. & Christofolletti, R. A., 2001. Natural feeding activity of the crab *Callinectes ornatus* (Portunidae) in Ubatuba Bay (São Paulo, Brazil): Influence of season, sex, size, and molt stage. *Marine Biology*, 138, 585-594.
- Mantelatto, F.L.; Robles, R.; Schubart, C.D.; Felder, D.L., 2009. Molecular phylogeny of the genus *Cronius* Stimpson, 1860, with reassignment of *C. tumidulus* and several American species of *Portunus* to genus *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae). In: Martin, J.W., Crandall, K.A., Felder, D.L. (Eds.), *Crustacean Issues. Decapod Crustacean Phylogenetics*. CRC Press, Boca Raton, 567-579.
- Mantelatto, F.L., Robles, R.; Wehrtmann, I.S., Schubart, C.D.; Felder, D.L., 2018. New insights into the molecular phylogeny of the swimming crabs of the genera *Portunus* Weber, 1795 and *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae) of the Americas. *Journal of Crustacean Biology*, 38, 190-197.
- Mantelatto, L.F.M. & Christofolletti, R.A., 2001. Natural feeding activity of the crab *Callinectes ornatus* (Portunidae) in Ubatuba Bay (São Paulo, Brazil): influence of season, sex, size and molt stage. *Marine Biology*, 138, 585-594.
- McLay, C.L. & Becker, C., 2015. Reproduction in Brachyura. In: *Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea*.
- Mello, M. L. S. & Vidal, B. C., 1980. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo, Brazil: Edgar Blucher FUNCAMP.
- Melo, G.A.S., 1996. *Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do Litoral Brasileiro*. São Paulo, Brazil: Plêiade/FAPESP.
- Moriyasu, M. & Benhalima, K., 1998. Snow crabs, *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius, 1788) (Crustacea: Majidae) have two types of spermatophore: Hypotheses on mechanism of fertilization and population reproductive dynamics in the southern Gulf of St. Lawrence, Canada. *Journal of Natural History*, 32, 1651-1665.
- Moriyasu, M.; Benhalima, K.; Duggan, D.; Lawton, P. & Robichaud, D., 2002. Reproductive biology of male jonah crab, *Cancer borealis* Stimpson, 1859 (Decapoda, Cancridae) on the Scotian Shelf, Northwestern Atlantic. *Crustaceana*, 75, 891-913.
- 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* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius*, 21, 161-177.
- Negri, M.; Schubart, C.D.; Mantelatto, F.L., 2018. Tracing the introduction history of the invasive swimming crab *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) in the Western Atlantic: evidences of high genetic diversity and multiple introductions. *Biological Invasions* 20, 1771-1798.
- Nicolau, C.F.; Nascimento, A.A.; Machado-Santos, C.; Sales, A.; Oshiro, L.M.Y., 2012. Gonads of males and females of the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Grapsidae: Brachyura: Decapoda): a histological and histochemical view. *Acta Zoologica (Stockholm)*, 93, 222-230.
- Norman, C.P., 1996. Reproductive biology and evidence for hard-female mating in the brachyuran crab *Thalamita sima* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology* 16, 656-662.
- Norman, C.P., Hirano, Y.J., Miyazaki, T., 1997. Hard-female mating in the brachyuran crab *Thalamita prynna* (Portunidae). *Crustacean Research* 26, 62-69.
- Norman, C.P., Nuka, T., Miyazaki, T., 1999. Mating behavior in *Thalamita picta* (Brachyura: Portunidae) and comparisons with congeneric species. *Crustacean Research* 28, 16-23.

- Pinheiro, M.A.A.; Boos, H.; Reigada, A.L.D.; Severino-Rodrigues, E.; Rocha, S.S.; Hereman, M.J. & Souza, M.R., 2016. Avaliação dos Caranguejos Portunídeos (Decapoda: Portunoidea: Ovalipidae, Polybiidae e Portunidae). Cap. 26. In: Pinheiro, M. & Boos, H. (Org.). Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014. Porto Alegre, RS, Sociedade Brasileira de Carcinologia, SBC.
- Ravi, R.; Manisseri, M. K.; Sanil, N.K., 2014. Structure of the male reproductive system of the blue swimmer crab *Portunus pelagicus* (Decapoda: Portunidae). *Acta Zoologica*, 95, 176-185.
- Ryan, E. P., 1967. Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* Herbst (Brachyura: Portunidae). I. The male system. Proceedings of the Symposium on Crustacea at Erkulán, Índia, 1965. Part II. Symposium, Series 2, 522-544.
- Sainte-Marie, G. & Sainte-Marie, B., 1998. Morphology of the spermathecal, oviduct, intermediate chamber, and vagina of the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). *Canadian Journal of Zoology*, 76, 1589-1604.
- Sainte-Marie, G. & Sainte-Marie, B., 1999. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). I. Observations on spermiogenesis and spermatophore formation in the vas deferens. *Canadian Journal of Zoology*, 77, 440-450.
- Sainte-Marie, G.; Sainte-Marie, B.; Sévigny, J.M., 2000. Ejaculate storage patterns and the site of fertilization in female snow crabs (*Chionoecetes opilio*; Brachyura, Majidae). *Canadian Journal of Zoology*, 78, 1902-1917.
- Sal Moyano, M.P.; Gavio, M.A.; Cuartas, E.I., 2009. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. *Helgoland Marine Research*, 64, 213-221.
- Santos, C. M.; Lima, G. V.; Nascimento, 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.
- 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, 345-36.
- Simeó, C. G.; Kurtz, K.; Chiva, M.; Ribes, E.; Rotllant, G., 2010. Spermatogenesis of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Journal of Morphology*, 271, 394-406.
- Souza, L.P.; Ogawa, C.Y.; Silva, J.R.F.; Camargo-Mathias, M.I., 2017. Comparative morphology of the female genital ducts of seven Eubranchyuran crabs (Saint Laurent, 1980). *Acta Zoologica (Stockholm)* 98, 125-135.
- Spalding, J.F., 1942. The nature and formation of the spermatophores and sperm plug *Carcinus maenas*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 83, 399-422.
- Spiridonov, V.A.; Neretina, T.V.; Schepetov, D., 2014. Morphological characterization and molecular phylogeny of Portunoidea Rafinesque, 1815 (Crustacea Brachyura): implications for understanding evolution of swimming capacity and revision of the family-level classification. *Zoologische Anzeiger*, 253, 404-429.
- Spiridonov, V.A., 2020. An update of phylogenetic reconstructions, classification and morphological characters of extant Portunoidea Rafinesque, 1815 (Decapoda, Brachyura, Heterotremata), with a discussion of their relevance to fossil material. *Geologija*, 63, 133-166.
- Stewart, M. J.; Stewart, P.; Soonklang, N.; Linthong, V.; Hanna, P. J.; Duan, W.; Sobhon, P., 2010. Spermatogenesis in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and evidence for histones in mature sperm nuclei. *Tissue and Cell*, 42, 137-150.

- Talbot, P. & Beach, D., 1989. Role of the vas deferens in the formation of the spermatophore of the crayfish (*Cherax*). *Journal of Crustacean Biology*, 9, 9-24.
- Tavares, R. G., Ferreira, K. de A., Nunes, E. T., & Braga, A. A., 2017. Diversidade e distribuição dos portunídeos (Crustacea, Brachyura) no litoral de Anchieta, Espírito Santo, Brasil. *Revista Univap*, 22, 278.
- Tiseo, G. R.; Mantelatto, F. L. M.; 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.
- Uma, K. & Subramoniam, T., 1979. Histochemical characteristics of spermatophore layers of *Scylla serrata* (Forsk.) (Decapoda: Portunidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 1, 31-40.
- Vallina, M.; Sal Moyano, M. P.; Cuartas, E. I.; Gavio, M. A., 2014. Reproductive system and size of maturity of paddle crab *Ovalipes trimaculatus* (Brachyura: Portunidae) along the argentine coast. *Journal of Crustacean Biology*, 34, 357-366.
- Waiho, K.; Fazhan, H.; Jasmani, S; Ikhwanuddin, M., 2017. Gonadal development in males of the orange mud crab *Scylla olivacea* (Herbst, 1796) (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Crustaceana*, 90, 1-19.
- Watanabe, T.T.; Nascimento, F.A.; Mantelatto, F.L.; Zara, F.J., 2020. Ultrastructure and histochemistry of the male reproductive system of the genus *Callinectes* Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae). *Journal of Morphology*, 281, 1660-1678.
- Watanabe, T.T.; López-Greco, L.S.; Zara, F.J., 2022. Seminal fluid and spermatophore production in a western Atlantic invasive swimming crab, *Charybdis hellerii*, reveals a different pattern to Portunoidea. *Arthropod Structure & Development*, 66, 1467-8039.
- Wong, N. A., & Sewell, M. A., 2015. The reproductive ecology of the invasive Asian paddle crab, *Charybdis japonica* (Brachyura: Portunidae), in northeastern New Zealand. *Invertebrate Biology*, 134, 303-317.
- Zara, F.J.; Toyama, M.H.; Caetano, F.H.; López-Greco, L.S., 2012. Spermatogenesis, Spermatophore, and Seminal Fluid Production in the adult Blue Crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*, 32, 249-262.
- Zara, F.J.; Pereira, R.R.; Sant'anna, B.S., 2014. Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribarius*. *The Biological Bulletin*, 227, 19-32.

Capítulo 3

Do plug-espermático a ovulação: modificações morfológicas e ultraestruturais do receptáculo seminal no siri azul *Callinectes danae*

Artigo publicado na Zoologische Anzeiger (Apêndice 1)

Resumo

Durante a transferência espermática em *Callinectes* ocorre a produção de um plug, o qual evita a transferência de material adicional de outros machos. Neste trabalho examinamos a morfologia, histoquímica e ultraestrutura do receptáculo seminal (RS) de *Callinectes danae* em fêmeas juvenis e adultas durante o desenvolvimento ovariano. Além disso, descrevemos desde a formação histoquímica do plug-espermático até a fertilização no interior do RS. Adicionalmente, analisamos o volume de ejaculado recebido pelas fêmeas durante a cópula. O RS seminal seguiu o padrão descrito para Portunidae, sendo inicialmente do tipo dorsal. O plug-espermático é formado pela deposição ordenada do fluido seminal do vaso deferente anterior misturada ao da região média, influenciando na secreção da região posterior, produzindo assim estratos quimicamente distintos. Ao mesmo tempo que ocorre a dissolução do plug, ocorre a deiscência dos espermatóforos, em sincronia com o desenvolvimento ovariano. O plug é dissolvido por meio de secreção holócrina de células com vesículas eletrondensas e eletronlúcidas da camada densa. O plug está totalmente dissolvido em fêmeas com estágio ovariano intermediário. A camada densa se dobra, criando a câmara lateral. O oviduto dorsal, continuo a camada densa passa a uma posição ventro-lateral, porém em oposição a vagina. Os ovócitos em fêmeas maduras, durante a ovulação, passam por este canal e a fertilização ocorre praticamente sobre a vagina. O macho ejacula todo o material espermático em uma única cópula, levando a depleção total do esperma. Assim, o plug-espermático é derivado exclusivamente do macho, por interação dos compostos das regiões do vaso deferente, inclusive da região anterior, nunca antes descrita, levando a depleção total de esperma. A fêmea dissolve o plug, levando a uma modificação morfológica crucial para fertilização e liberação dos ovos. Assim, fica claro a co-evolução dos sistemas reprodutores masculino e feminino, onde o macho investe todo seu potencial reprodutivo para formar o plug e a fêmea ao contrário, para dissolvê-lo.

Palavras-chave: armazenamento, desenvolvimento ovariano, espermatozoide, fêmea, fluido seminal, oviduto.

Introdução

A família Portunidae inclui os siris azuis dentre os quais *Callinectes danae* Smith, 1869 é uma das espécies mais facilmente coletadas, considerada como bom modelo para estudo entre os Portunidae brasileiros (Zara et al., 2012). Esta espécie ocorre no Atlântico Ocidental, desde Golfo do México, Antilhas, Colômbia, Venezuela e Brasil (Melo, 1996), ocorrendo em estuários até o mar em profundidades de até 75m, com alta tolerância a variações de salinidade (Williams, 1984). *Callinectes danae* faz parte da fauna acompanhante da pesca camaroneira e é importante para a pesca artesanal, sendo considerado um recurso econômico ainda pouco explorado para a alimentação no Brasil (Mantelatto e Fransozo, 1999; Severino-Rodrigues et al., 2001; Zara et al., 2012). Segundo Pita et al. (1985), *C. danae* é o mais abundante portunídeo brasileiro capturado em bacias com influxo moderado a grande de água doce, como o complexo estuarino de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo e o quinto Brachyura mais abundante em Ubatuba, Estado de São Paulo, (Costa e Negreiros-Fransozo, 1998; Branco e Masunari, 2000).

Nas fêmeas de Brachyura, material seminal proveniente do macho é estocado em uma porção modificada do ducto genital, o receptáculo seminal (RS) ou em uma invaginação do exoesqueleto, sem ligação com o oviduto/ovário, a espermateca (Guinot & Quenette, 2005; McLay & López-Greco, 2011; Garcia-Bento et al., 2018). Os podotrematas possuem espermateca que é considerada uma sinapomorfia do grupo, diferente caranguejos Eubrachyura, os quais possuem RS, que tem conexão com o oviduto e a vagina. A vagina abre-se mais medialmente no sexto esternito torácico, distante da coxa como nos podotremata (Guinot & Tavares, 2001; McLay & López-Greco, 2011). O RS é uma estrutura de origem mista, ectomesodérmica, com a função de armazenar os espermatóforos e/ou espermatozoides após a cópula (Hartnoll, 1968; McLay & López-Greco, 2011; Zara, et al., 2014; Antunes et al., 2016). A porção mesodérmica do RS conecta-se ao ovário por meio do oviduto, sendo denominada esta de região dorsal. A região ventral, tem origem ectodérmica, recoberta por cutícula, sendo contínua à vagina, a qual se abre na abertura genital ou vulva (Hartnoll, 1968; McLay & López-Greco, 2011; Zara, et al., 2014). Em *Callinectes danae*, a vagina é do tipo arredondada com os gonóporos assimetricamente ovoides (Hartnoll, 1968; Williams, 2007). Diesel (1991) classificou o RS de acordo com a abertura do oviduto em dois tipos: dorsal e ventral. No tipo dorsal a abertura do oviduto encontra-se numa posição relativamente dorsal ao RS estando assim oposta à abertura da vagina. O tipo ventral tem como característica apresentar o oviduto e a vagina próximos um ao outro, sendo portanto, o oviduto posicionado ventralmente, abrindo pouco

antes, na região dorsal, próxima a camada cutícula ventral. Um terceiro tipo de RS foi proposto, o intermediário, demonstrando que a abertura do oviduto no receptáculo seminal encontra-se entre os extremos dorso-ventral (McLay & López-Greco, 2011; Gonzáles - Pisani et al., 2012; Guinot et al., 2013). Assim, a presença de conexões intermediárias, além de outras morfologias, como o oviduto se abrindo na vagina como observado em Dorippidae sinalizam para uma diversidade morfológica de pontos de abertura do oviduto (hayer, et al., 2016; vehof et al., 2017). Neste trabalho utilizaremos classificação tipo ventral e tipo dorsal tendo em vista a literatura tradicional para Portunidae (Ryan, 1967; Jonhson, 1980; Zara et al., 2014). Uma outra estrutura acessório de armazenamento de espermatozóides é a bursa (Jensen et al., 1996; Jensen & Bentzen, 2012). Nas espécies que apresentam esta estrutura, o oviduto abre-se em um canal cuticular específico entre o receptáculo seminal e a bursa o que parece estar restrito a espécies pertencentes às famílias Cancridae Latreille, 1802 e Dorippidae MacLeay, 1838 (Jensen et al., 1996; Jensen & Bentzen, 2012; Vehof et al., 2017). Em Portunidae o padrão do receptáculo seminal é majoritariamente dorsal, como ocorre em *Arenaeus cribarius* (Lamarck, 1818), *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 e *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) sendo que para *Portunus hawaiiensis* (Stephenson, 1968) in Ryan (1967) como *Portunus sanguinolentus*, o RS foi descrito como intermediário (Johnson 1980; Bawab & El-Sherief 1988; Diesel, 1991; McLay e López Greco, 2011; Zara et al., 2014).

Spiridonov et al. (2014) realizou estudo morfológico e molecular com a superfamília Portunoidea levando a mudanças substanciais na classificação das famílias, sendo *Ovalipes* antes em Geryonidae Colossi, 1923, elevado a nova família Ovalipidae Spiridonov, Neretina & Schepetov, 2014. As espécies *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758) e *Portumnus latipes* (Pennant, 1777) foram retirados de Portunidae Rafinesque, 1815 e inseridos na reavivada Carcinidae MacLeay, 1838, sendo o mesmo realizado com o gênero *Liocarcynus* Stimpson, 1871 que agora está inserido em Polybiidae Ortmann, 1893. Em particular para as famílias Portunidae, Carcinidae e Cancridae Latreille, 1802, o fluido seminal dos machos forma o plug-espermático no interior do RS (Hartnoll 1969; Hinsch 1988; Spalding, 1942). O plug impede ou dificulta a introdução dos gonópodos não permitindo a transferência de material genético de outros machos (Hartnoll 1969, Hines et al., 2003; Wolcott et al., 2005; Zara et al., 2012, 2014). Durante o desenvolvimento ovariano, o plug-espermático desaparece do RS, o qual se torna menor e flácido no Carcinidae *Car. maenas*, Ovalipidae *Ovalipes ocellatus* (Herbst, 1799), Portunidae *Portunus pelagicus* *P. hawaiiensis*, *A. cribrarius*, *Callinectes ornatus* Ordway 1863 *C. sapidus* e *C. danae* (Spalding, 1942; Ryan, 1967; Johnson, 1980; Hinsch, 1986; Bawab and

El-Sherief, 1988; Costa and Negreiros-Fransozo, 1998; Mantelatto and Fransozo; Hines et al., 2003; Wolcott et al., 2005). Porém as alterações morfológicas no RS com relação ao desenvolvimento ovariano, as quais parecem ser um padrão para Portunidae formadores de plug-espermático, foram somente estudadas na histologia e ultra-estrutura para *A. cribrarius* (Zara et al., 2014) Por sua vez, nos Portunidae (Thalamitinae) *Charybdis smithii* MacLeay, 1838, *Thalamita prymna* (Herbst, 1803), *Thalamita sima* H. Milne Edwards, 1834 e *Thalamita picta* Stimpson, 1858 não foi detectada a evidência de plug no RS por meio de análises macroscópicas (Balasubramanian & Suseelan, 1998; Norman, 1996; Norman et al., 1997, 1999). Em várias espécies de majoids ocorre a presença de estratos ou pacotes espermáticos e a posição do oviduto pode ser crucial para a competição espermática, onde o último macho terá preferência para a fertilização dos ovócitos, uma vez que o RS é majoritariamente do tipo ventral (Diesel, 1989, 1991; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998, Sainte-Marie et al., 2000; Sal Moyano et al., 2009; Antunes et al., 2016, 2018). Porém, para as espécies que apresentam plug-espermático, esta condição de competição espermática pode ser reduzida ou ausente (Parker, 1970).

Neste trabalho caracterizamos as alterações do RS desde a formação do plug-espermático e como este encontra-se organizado até a fertilização em *C. danae*, por meio da histologia, histoquímica e ultraestrutura.

Material e métodos

Os animais foram coletados de março de 2007 a fevereiro de 2008 no complexo Estuário/baía de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo, Brasil, com auxílio de barco de pesca equipado com rede otter-trawl semi-balão, amostrados nos mesmos pontos utilizados por Sant'Anna et al. (2012). Adicionalmente, casais com fêmeas em estágio pré-copulatório foram coletadas com armadilhas ring net com iscas na desembocadura do Rio Branco (Rio Boturoca) no Rio Santana (23°55'59.4"S 46°27'11.0"W) entre novembro de 2018 a fevereiro de 2019. Todos os animais foram transportadas vivos em caixa de plástico com água do local de coleta aerada para o laboratório. A espécie foi identificada de acordo com Melo (1996) e diferenciada quanto ao estágio de desenvolvimento, juvenil (JUV) ou adulto (AD) por meio da morfologia e aderência do abdômen ao esterno (Zara et al., 2013). Todos os indivíduos tiveram a largura da carapaça cefalotorácica (CW) medida, excluindo-se os espinhos laterais, utilizando paquímetro analógico (0,05 mm).

Para análise macroscópica do sistema reprodutor, os animais foram anestesiados por choque térmico e em seguida dissecados. Casais (N=6) com fêmeas JUV em abraço pré-copulatório (Pinheiro and Fransozo, 1999) foram mantidas em aquários aerados com filtração externa, salinidade de 25, temperatura da sala (24°C) e foto período (12L;12D) controlados. Cada aquário de 36x36x64cm teve como substrato areia e conchas, além de rochas vivas, sendo alimentados com pedaços de camarão peneídeo duas vezes ao dia (adaptado de Antunes et al., 2016). O estágio ovariano em fêmeas adultas foi classificado macroscopicamente de acordo com a coloração e volume relativo ao hepatopâncreas. Os estágios ovarianos foram classificados em: rudimentar (RUD), em desenvolvimento (DEV), intermediário (INT), maduro (MAT) e ovígera (OV) (Costa e Negreiros-Fransozo, 1998; Zara et al., 2014). Neste estudo, apenas os receptáculos seminais de fêmeas ovígeras com ovários rudimentares, i. e. em pré-vitelogênese ou vitelogênese endógena (Mollemberg et al., 2017), foram utilizadas, seguindo os mesmos critérios adotados para *A. cribrarius* (Zara et al., 2014).

Para análise histológica após a fixação, os RS foram desidratados em séries crescentes de álcool (40-100%), imersos em xilol por 2h e em seguida embebidos em parafina (56°C). Após a polimerização e seccionamento, os cortes histológicos foram coletados em lâminas, desparafinados em xilol, reidratados e corados com Hematoxilina & Eosina para descrição morfológica de acordo com Junqueira & Junqueira (1983). Para a análise histoquímica, os cortes foram corados com a técnica do Xylidine ponceau (Melo e Vidal, 1980) para proteínas, PAS para polissacarídeos neutros, azul de Alcian, para os polissacarídeos ácidos e a técnica conjugada PAS/azul de Alcian para determinar a preponderância de um tipo de polissacarídeo em detrimento de outro, segundo protocolo proposto por Junqueira & Junqueira (1983).

Para determinar o volume de fluido seminal transferido durante a cópula e formação do plug-espermático, bem como a depleção do vaso deferente nos machos, foi realizado um experimento baseado em Jivoff (1997) e Wolcott et al. (2005). Casais (n=6) de *C. danae* (machos CW:70,8-86,1mm) (fêmeas CW:63,7-73,7mm) em abraço pré-copulatório foram separados e os machos anestesiados por choque térmico. Foi realizada a ablação do gonópodo esquerdo, em seguida utilizou-se iodo para evitar infecções, e posteriormente os animais foram devolvidos para os aquários. Os machos prontamente retomaram ao abraço pré-copulatório. Após a muda da puberdade e cópula, os animais em estágio de guarda pós-copulatória foram separados, anestesiados por choque térmico e dissecados. Ambos vasa deferentia e RS esquerdo e direito foram retirados e pesados separadamente em balança analítica (0,001g). Para fins de cálculo, foi subtraído o peso do vaso deferente que não transferiu o material (esquerdo, sem o

gonópodo) em relação ao do valor referente ao peso do vaso deferente que transferiu o material seminal (lado direito, com gonópodo intacto). Para as fêmeas os cálculo foi exatamente o oposto, contabilizado o peso do RS que recebeu o ejaculado (esquerdo) excluindo o peso da estrutura vazia que não recebeu o material espermático (direito), resultando assim no peso total de ejaculado transferido. Para isto realizamos o teste de normalidade de dados Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) e de homocedasticidade ($p \geq 0.05$). Para comparação das variáveis foi realizado o teste T pareado no Software Origin Pro8.

Resultados

Anatomia

O RS em fêmeas juvenis caracteriza-se pela morfologia auricular, com aspecto flácido e colapsado das paredes laterais do órgão. A região dorso-anterior do RS apresenta uma dobra natural direcionada para a margem externa da cavidade cefalotorácica. O ovário abre-se, por meio do oviduto em posição dorsal, oposta a vagina. Porém devido à disposição antero-posterior do RS, o oviduto encontra-se no 1/3 dorso-posterior ao corpo (Fig. 1A). Em fêmeas RUD, em abraço pós-copulatório, o RS sofre ampla distensão devido a presença do plug-espermático. Anatomicamente, o órgão passa a um formato riniforme com ampla distensão da porção do 1/3 anterior. O oviduto continua dorsal em oposição a vagina (Fig. 1B). Em fêmeas DEV após 14 dias do término do abraço pós-copulatório, a estrutura do RS começa a sofrer modificação pela redução do volume do 2/3 posteriores (caudais). O RS ainda encontra-se volumoso, devido ao plug-espermático em dissolução. O oviduto continua dorsal, em oposição a vagina, porém sua posição relativa encontra-se mais deslocada lateralmente, pela modificação da região dorsal associadas a remoção do plug-espermático da porção 2/3 posterior (Fig. 1C). Nas fêmeas com estágios ovarianos variando de INT, MAT e OV nota-se que o volume do RS reduziu drasticamente. O receptáculo, o qual fica totalmente inserido na região ventral da cavidade cephalotorácica, mostra-se com o lobo anterior como principal câmara, quase excêntrico ao oviduto. Os 2/3 posteriores encontram-se bastante modificados e contínuos com o oviduto dorsal, o qual encontra-se em oposição a vagina, porém como um canal quase lateral. O material seminal esbranquiçado encontra-se no interior da câmara formada pela porção anterior (Fig.1D).

Histologia e histoquímica

Ao microscópio de luz nota-se que o RS em fêmeas JUV de *C. danae* mostra a porção dorsal anterior destacada e dobrada mas contínua com o restante dos 2/3 posteriores. O RS mostra duas regiões distintas: a dorsal, onde abre-se o oviduto e a ventral contínua com a vagina (Fig.2A). A região dorsal do RS é composta por três camadas distintas: camada conjuntiva (connective layer) externa, camada colágena intermediária e camada densa, mais interna a qual é um epitélio estratificado (Fig. 2B). A camada conjuntiva mostra amplos espaços hemais, com hemócitos (Fig. 2C). A camada colágena tem menos espaços hemais e muitas fibras (Fig. 2B). Em fêmeas JUV o RS mostra a camada densa com epitélio estratificado muito espesso composto de pequenas células com núcleos variando de arredondado a elípticos (Fig. 2B). A região basal da camada densa, junto ao tecido conjuntivo apresenta células em divisão (Fig.2B). As células mais apicais da camada densa apresentam núcleo extremamente compacto e com citoplasma basófilo, com algumas células em descamação (Fig. 2B)

A inserção do oviduto ocorre na margem posterior dorsal da região de origem mesodérmica, caracterizado pela presença de um tampão de células com núcleos arredondados (Fig. 2D). A inserção do oviduto no RS ocorre exatamente na região oposta a vagina, sendo assim, classificado como receptáculo do tipo dorsal (Fig. 2A e 2D). Na transição entre a região dorsal e ventral notam-se dobras, as quais progridem para o interior do lúmen (Fig. 2A e E). Esta transição é marcada por células altas, com aspecto vacuolizado e a camada cuticular progressivamente torna-se mais espessa em direção à região ventral (Fig. 2E). O epitélio da região ventral é colunar com núcleos elípticos mediano-basais recobertos por espessa camada de cutícula (Fig. 2E e F). Semelhante ao epitélio dorsal, o epitélio ventral também encontra-se assentado sobre a camada conjuntiva (Fig. 2F). A vagina é composta por epitélio simples recoberto por cutícula mais espessa que da região ventral (Fig. 2F). O RS apresenta secreção luminal basófila e com aspecto fibrilar (Fig.2A e G). Esta secreção é fracamente positiva para proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 2H-K).

Em fêmeas RUD após o término do abraço pós-copulatório, o RS encontra-se totalmente distendido pela presença do plug-espermático. O plug apresenta três tipos de secreção organizados em dois estratos. O estrato 1 ocupa uma parte dos 2/3 da porção posterior do receptáculo, enquanto a estrato 2 ocupa toda a porção anterior e uma parte da posterior, compreendendo cerca de 50% do volume do RS. O estrato I apresenta a secreção tipo I acidófila enquanto o estrato II, basófilo possui duas secreções: tipo II e III. A secreção tipo III é fortemente acidófila e está em contato com o epitélio dorsal, principalmente da porção anterior.

Os espermátóforos encontram-se especialmente imersos nesta secreção (Fig. 3A e B). A secreção tipo I é intensamente reativa para proteínas e positiva para polissacarídeos neutros, sendo negativa para os ácidos (Fig. 3 C-E). A secreção tipo II, mais central ao estrato 2 na porção anterior dorsal, é fortemente positiva para proteínas, porém com reação ligeiramente menos intensa que na secreção I (Fig. 3C). Por sua vez, o oposto da reação para proteínas é observada para polissacarídeos neutros, sendo a secreção tipo II mais positiva que a tipo I (Fig. 3D). A secreção tipo II é positiva para polissacarídeos ácidos (Fig. 3E). A secreção I, periférica no estrato 1, é glicoproteica, porém ligeiramente menos intensa que a secreção II (Fig. 3C e D). Esta secreção tipo I é fortemente reativa para polissacarídeos, principalmente quando comparada com a II (Fig. 3E). Esta intensa reatividade da secreção tipo I é confirmada pela técnica conjugada do PAS/azul de Alcian, mostrando preponderância de polissacarídeos ácidos, enquanto a tipo II é mais reativa para neutros (Fig. 3F e G). Entre os dois estratos, junto a região dorsal, ocorre uma área lucida, sem reação para nenhum dos corantes testados (Fig. 3 A, C-F). O epitélio da camada densa mostra muitas camadas celulares e, nos estratos apicais, muitas células em descamação, configurando a secreção holócrina. O citoplasma das últimas camadas celulares e nas células em descamação é acidófilo, intensamente marcado para proteínas e polissacarídeos neutros. A camada densa, epitelial, está assentada sobre a camada colágena, com as fibras marcadas para proteínas e polissacarídeos neutros (Fig. 3H-L). A camada mais interna da parede do espermátóforo, mais espessa possui composição glicoproteica com reação para polissacarídeos ácidos na camada mais interna (Fig. 3L-O).

O estágio DEV mantém as mesmas características de RUD, porém o plug-espermático tem menor volume, com amplos espaços lúcidos entre a camada densa e plug, e os espermátóforos encontram-se presente. No estágio INT, os espermátóforos estão deslocados para a região ventral do receptáculo seminal (Fig. 4A e B). A região dorsal está contínua ao oviduto (Fig. 4A). As células da transição entre a região dorsal e ventral, transformam-se em um epitélio modificado derivado das células da camada dorsal mesodérmica. Assim, o receptáculo mostra duas áreas de transição, uma entre a região ventral recoberta por cutícula (ectodérmica) e outra entre o epitélio modificado e as células da camada densa da região dorsal, em descamação (Fig. 4B-D). O epitélio modificado dorsal é simples, colunar e alto, com células apresentando mais de um núcleo e longas microvilosidades semelhantes a cílios ao microscópio de luz. O citoplasma encontra-se positivo para proteínas e polissacarídeos neutros, sendo as microvilosidades fortemente positivas para ambos os compostos (Fig. 4E and F). Este epitélio fica dobrado sobre a região ventral do RS, formando o teto do RS. Esta dobra faz parte da antiga

porção anterior dorsal nas fêmeas RUD e o RS transforma-se em uma câmara excêntrica ao eixo região dorsal e oviduto em relação a vagina (Fig. 4A). A camada densa dorsal, permanece contínua com o oviduto, e o epitélio dorsal estratificado, ligado ao oviduto, possui menor número de células em descamação, as quais mostram-se bastante vacuolizadas, com reação menos intensa para glicoproteínas (Fig. 4 G-I). Este material das células em descamação auxiliam na migração dos espermátóforos sem parede, portanto massas compactas de espermatozoides os quais fundem-se uns aos outros formando massas maiores na região ventral do RS (Fig. 4A e B).

Em fêmeas MAT e OV, o receptáculo apresenta somente espermatozoides livres no interior do RS, o qual mostra-se como uma câmara excêntrica ao eixo oviduto em oposição vagina. Assim, o RS é classificado como tipo dorsal, porém a maior parte do receptáculo forma uma câmara excêntrica ou lateral ao oviduto-vagina. (Fig. 5A). Duas fêmeas foram coletadas durante o processo de ovulação devido ao estresse de transporte para o laboratório. Nestas fêmeas, os ovócitos caminham pelo canal do oviduto e antiga camada densa da região dorsal do RS (Fig. 5A e B). No interior deste canal nota-se a presença de espermatozoides livres (Fig. 5B). O epitélio estratificado da camada densa apresenta poucas células em descamação, assentadas sobre a camada colágena e conjuntiva, as quais se mantêm espessas (Fig. 5A e C). Os ovócitos, entram na câmara lateral do RS, recoberta pelo epitélio dorsal modificado, e nesta passagem, observa-se muitos espermatozoides livres entre o oviduto e a câmara do RS (Fig. 5C-E). Uma forte musculatura está associada ao tecido conjuntivo na base da ligação do oviduto a câmara do RS (Fig. 5A). No interior da câmara, os espermatozoides livres estão armazenados e muitos deles são observados em contato com as longas microvilosidades semelhantes à cílios (Fig. 5E). Os ovócitos entram em contato com os espermatozoides livres, os quais formam uma nuvem sobre o cório (Fig. 5F). A região ventral do RS mantém a mesma característica dos estágios anteriores, sendo um epitélio simples variando de cúbico a pavimentoso, recoberto por cutícula sobre a camada colágena. O epitélio ventral está associado a muitos feixes de fibras musculares paralelos ao epitélio e um forte feixe perpendicular são encontrados (Fig. 5G). Esta descrição é a mesma para a vagina, a qual termina na vulva. A secreção do RS entre os espermatozoides é glicoproteica com a presença de polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 5H-J).

Ultraestrutura

Durante o ciclo ovariano, o RS de fêmeas de *C. danae* com ovários (RUD), apresentam-se volumosas devido ao grande volume de líquido seminal do macho, introduzido durante a cópula. Em fêmeas RUD recém copuladas ocorre a redução em espessura da parede do RS, devido à pressão exercida pelo plug-espermático (Fig. 6A). Assim ambas as camadas densa e colágena encontram-se delgadas (Fig. 6A). A camada colágena, mais externa, apresenta os fibroblastos achatados devido à configuração dos seus núcleos. Por entre estes, notam-se vários pacotes de fibras colágenas, com a maioria das fibras alinhadas em uma só direção, devido à pressão exercida pelo fluido seminal (Fig. 6C e B). A porção mais externa da camada colágena é ligeiramente distinta do restante, apesar de claramente estirada devido ao líquido seminal. Nesta porção, observam-se alguns amplos espaços hemais, com a presença de hemócitos e vasos sanguíneos (Fig. 6D). A camada densa com epitélio estratificado, mostra núcleos centrais que variam de alongados a arredondados, com heterocromatina geralmente periférica e nucléolo evidente (Fig. 6E). Nas células das camadas mais externas e em descamação, o citoplasma está preenchido por RER e apresenta dois tipos de vesículas tipo I eletrondensas e tipo II eletrnlúcidas (Fig. 6E e F). No citoplasma encontram-se vesículas com membranas concêntricas e material eletrondenso semelhante a lisossomos (Fig. 6G e H). No lúmen, os espermatozóides encontram-se no interior dos espermatóforos alojados dorsalmente. A secreção luminal é formada por três tipos de secreção: (1) eletrondenso e finamente granular; (2) homogêneo e menos eletrondenso e (3) fibroso, misturado aos outros dois tipos (Fig. 6I-J).

O RS de fêmeas com o ovário no estágio em desenvolvimento (ED) e intermediário (INT) apresentaram as mesmas características ultraestruturais. Quando comparada ao estágio RUD, a camada colágena encontra-se mais espessa, com feixes de fibras colágenas de mesma eletrondensidade, dispostos em diferentes sentidos. Os fibroblastos, ainda achatados, apresentam muitas ramificações citoplasmáticas (Fig. 7A). A camada colágena é marcada pela presença de vasos sanguíneos calibrosos (Fig. 7B). Junto a estes vasos e no interior dos espaços hemais, é comum a presença de células com inclusões de reserva ou células RI, com função de produção e estocagem de hemocianina. Tais células são caracterizadas por uma única e grande vesícula eletrondensa, a qual ocupa boa parte do citoplasma (Fig. 7B e C). A camada densa torna-se bastante espessa e estende-se até o oviduto. As células desta camada tornam-se mais frouxas e com muitos espaços hemais preenchido com hemolinfa e algumas parecem soltas na luz do oviduto. O citoplasma está preenchido por retículo endoplasmático rugoso (RER), apresentam núcleos centrais irregulares, com heterocromatina periférica e nucléolo central (Fig

7D). As células da região dorsal do RS, mostram o epitélio modificado, intimamente unidas por complexos juncionais. O citoplasma apresenta núcleos basais, com pouca heterocromatina, discreto RER e muitas mitocôndrias (Fig. 7E). Tais organelas são particularmente abundantes no pólo apical, onde são encontradas projeções filiformes repletas de microtúbulos (Fig. 7F). Abaixo do epitélio modificado dorsal, o lumén do RS armazena espermátóforos circundados apenas por secreção fibrosa e delgada (Fig. 7G). A região ventral, em oposição ao epitélio modificado, possui células pequenas, com envoltório nuclear bastante irregular, recoberto com cutícula. Justaposto ao epitélio, vários feixes de fibras colágenas e espaços hemais podem ser observados no tecido conjuntivo (Fig. 7H e I).

A camada densa, contínua com o oviduto mantém o mesmo aspecto das células descritas no estágio INT. O RS é marcada pela presença da câmara lateral, cuja o teto, na região dorsal mostra o epitélio modificado. As células são bastante semelhantes aos estágio INT (Fig. 8A e B). A principal característica destas células é a presença de grande quantidade de mitocôndrias no pólo apical, além de projeções filiformes e longas, projetadas para o lúmen da câmara, aqui descritas como microvilosidades. Tais estruturas mostram diferentes ângulos de inclinação em relação à superfície do epitélio transversal (Fig. 8B-D). Estas projeções são ancoradas no citoplasma por meio de corpos eletrondensos, lembrando um corpúsculo basal ciliar, porém sem presença de trincas de microtúbulos (Fig. 8D-F). Tal elemento de citoesqueleto preenche toda a extensão da projeção filiforme (Fig. 8G). Em corte transversal, pode-se identificar elementos de citoesqueleto com 24 nm e 5 nm que parecem ser actina e microtúbulos com pouca ordem entre elementos periféricos e centrais, não organizados em axonema (Fig. 8H e I). Os espermatozóides encontram-se livres na câmara lateral imersos em secreção eletrondensa (Fig. 8B, C e J). A região ventral continua marcada pela camada cuticular, bastante espessa nestes estágios (Fig. 8L), sendo as células que compõem esta camada, ricas em mitocôndrias sob a cutícula (Fig. 8K).

Experimento de cópula

O peso médio dos vasa deferentia com ablação do gonópodo I (lado esquerdo) foi de $1,50 \pm 0,06$ g, enquanto que o vaso funcional (gonópodo direito) foi $0,42 \pm 0,04$ g ($t = -44.31$; $p < 0.05$), com o volume de $1,08 \pm 0,06$ g transferido para a fêmea. O RS que recebeu o plug-espermático teve peso médio de $1,64 \pm 0,25$ g enquanto que o RS que não recebeu material devido a ablação do gonópodo I, teve peso médio de $0,52 \pm 0,11$ g ($t = -17.66$; $p < 0.05$). O peso médio do plug-espermático, ou seja a diferença entre o volume do RS cheio e vazio foi de

1,12±0.07g. Assim, não existe diferença entre o volume transferido e o recebido pela fêmea na forma de plug-espermático ($t = -1,16$; $p > 0.05$). Portanto, o macho transfere 100% do fluido seminal presente no vaso deferente para o RS da fêmea. Nota-se ainda uma diferença de 3% de volume de material adicional, produzindo incremento de peso, calculado pela subtração do volume recebido em relação ao volume transferido. O tamanho dos machos não influenciou na quantidade de fluido seminal transferido para fêmea, bem como fêmeas de diferentes tamanhos armazenaram a quantidade total de fluido seminal transferido pelo macho independente do seu tamanho.

Figuras

Juvenile female

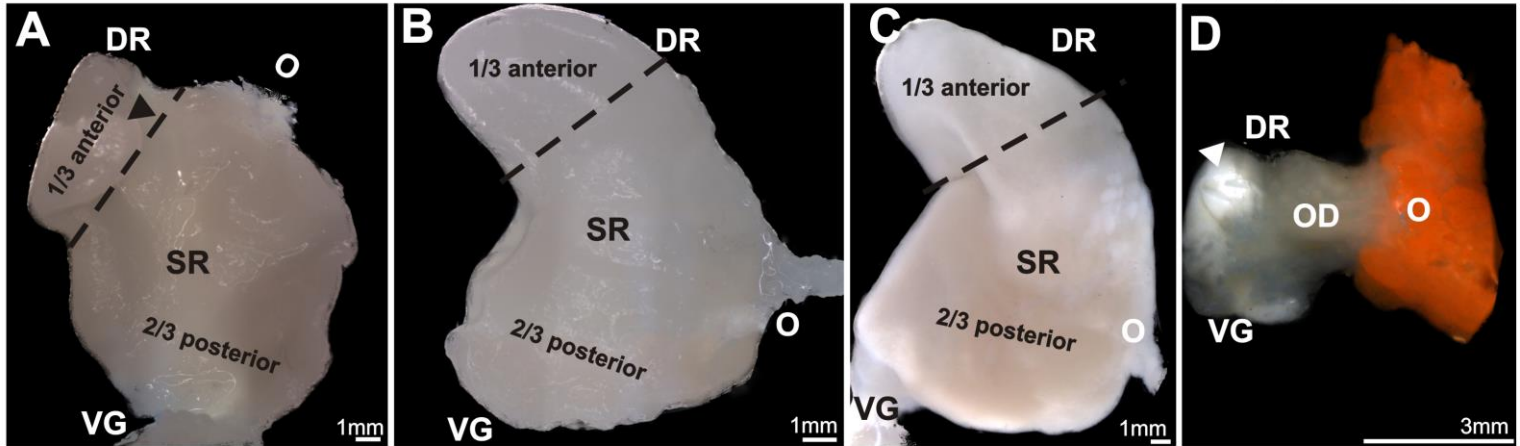
Adult female

Ovarian stages

RUD

DEV

INT, MAT, OV



Pre-copulatory
mate guarding

Post-copulatory
mate guarding

Free female

Figura 1. Alterações morfológicas macroscópicas do receptáculo seminal (RS) de *Callinectes danae* ao longo do desenvolvimento ovariano. (A) RS em forma de auricular de fêmeas JUV em abraço pré-copulatório; a região dorso-anterior do RS é naturalmente dobrada (ponta de seta preta) e o ovário se conecta ao oviduto que se abre dorsalmente, oposto à vagina. (B) O RS das fêmeas RUD em abraço pós-copulatório é alargado, devido à presença de um plug-espermático em forma de rim, e distendido no terço anterior. (C) Em DEV livre Nas fêmeas, o volume SR do terço anterior começa a diminuir à medida que o plug-espermático se dissolve. Embora o oviduto dorsal ainda esteja em oposição à vagina. (D) em INT, MAT e OV livre Nas fêmeas o volume do RS é drasticamente reduzido e as dobras da região dorsal formam a câmara principal do RS, excêntrica ao oviduto dorsal. O líquido seminal esbranquiçado dentro da câmara localiza-se na região anterior do SR (ponta de seta branca). DEV: em desenvolvimento; RD: região dorsal; INT: intermediário; MAT: maduro; O: ovário; OD: oviduto; OV: ovígero; RU: rudimentar; RS: receptáculo seminal; VG: vagina.

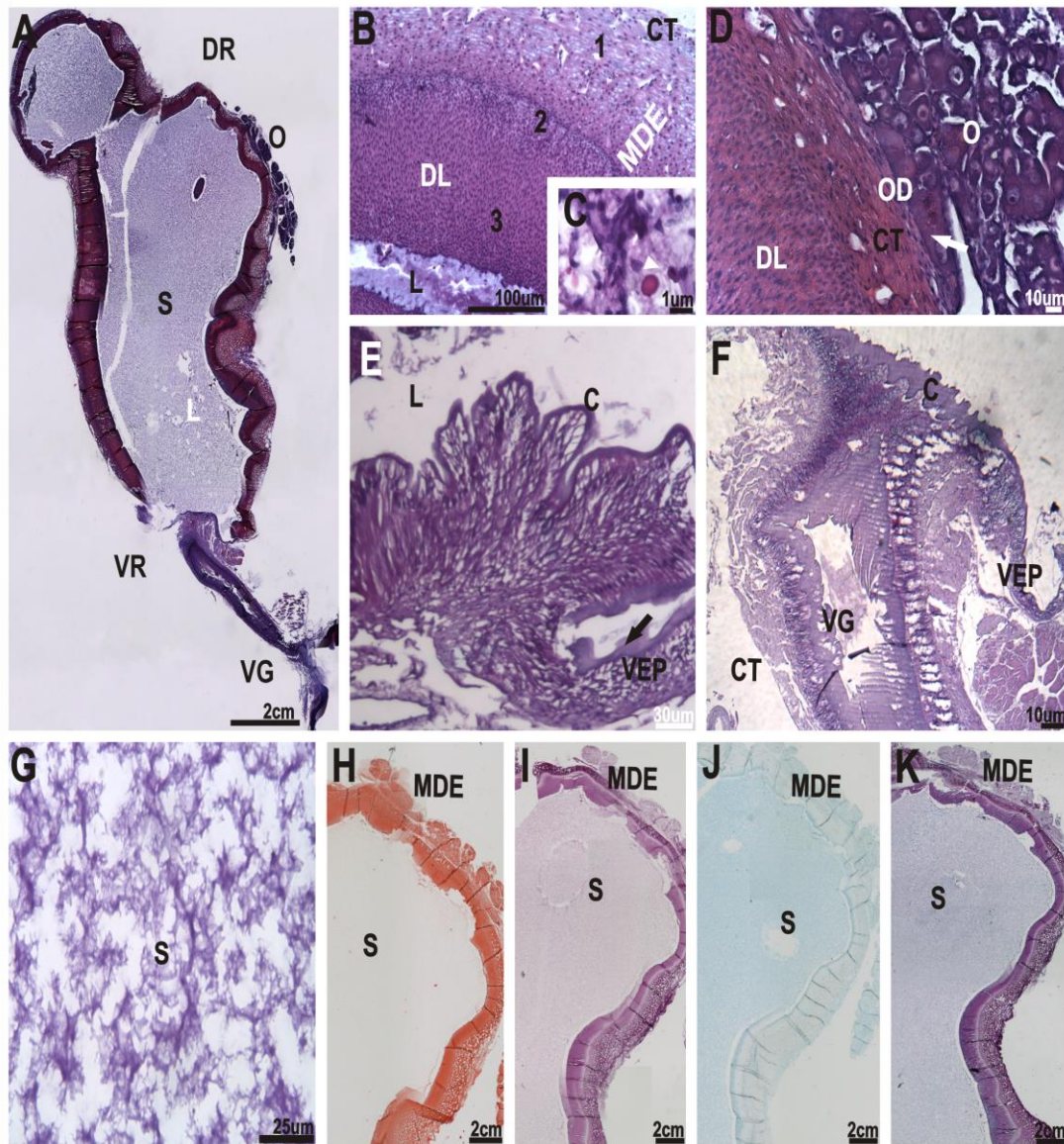


Figura 2. Receptáculo seminal fêmea juvenil de *Callinectes danae*. (A) Sob microscopia de luz, o RS nessas fêmeas tem duas regiões diferentes: a região dorsal onde o oviduto se abre e a região ventral conectada à vagina. (B) A região dorsal possui três camadas: uma camada externa conjuntiva (1), uma camada intermediária de colágeno (2) e uma camada interna densa (3), com epitélio estratificado. O epitélio estratificado é muito espesso e as células são pequenas com núcleo arredondado a elíptico. As células mais apicais do epitélio estratificado apresentam núcleo extremamente achatado e citoplasma basofílico; algumas das células estão sofrendo descamação. (C) Detalhe da camada conjuntiva com amplos espaços hemais preenchidos com hemócitos (ponta de seta branca). (D) Nas fêmeas JUV, o oviduto está inserido na margem posterior posterior da região mesodérmica e é caracterizado pela presença de tampão celular (seta branca) com núcleo arredondado. (E) Detalhe da transição entre as regiões dorsal e ventral com pregas que se estendem até a luz do RS. Essa transição é caracterizada por células longas de aspecto vacuolizado e a camada cuticular torna-se progressivamente mais espessa em direção à região ventral (seta preta). A região ventral apresenta epitélio colunar com núcleo elíptico mediano-basal recoberto por espessa camada cuticular. (F) A vagina é composta por um epitélio simples recoberto por uma cutícula mais espessa que a região ventral. (G) Secreção luminal basofílica de aspecto fibrilar. (H) Secreção luminal fracamente positiva para proteínas. (I) Secreção do SR fracamente positivo para polissacarídeos neutros. (J) Secreção luminal fracamente positiva para polissacarídeos ácidos. DL: camada densa; RD: região dorsal; C: cutícula; TC: tecido conjuntivo. L: lúmen. MDE: epitélio dorsal modificado; O: ovário; OD: oviduto; S: secreção; VEP: epitélio ventral; RV: região ventral; VG: vagina

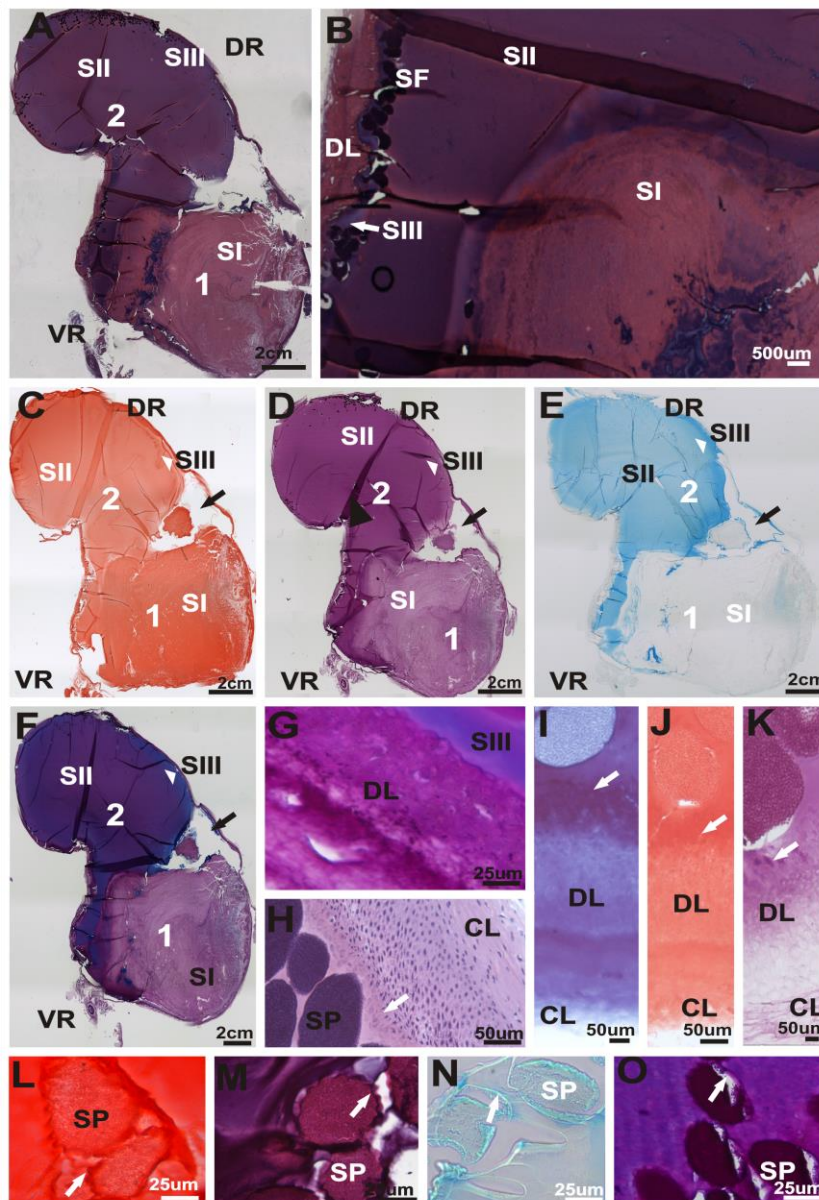


Figura 3. Receptáculo seminal em fêmeas RUD de *C. danae*. (A) RS completamente distendido pela presença do plug-espermático. O plug apresenta três tipos de secreções organizados em dois estratos. O estrato I ocupa uma porção de 2/3 da porção posterior do receptáculo, enquanto o estrato II ocupa toda a porção anterior e uma pequena porção da região posterior. A secreção tipo I acidofílica, enquanto a do estrato II, o basófilo possui duas secreções: tipo II e III. (B) A secreção do tipo III é fortemente acidófila e está em contato com o epitélio dorsal. Os espermatóforos estão especialmente imersos nessa secreção. (C) A secreção do tipo I é intensamente reativa para proteínas, a secreção do tipo II é reativa e a do tipo III é menos reativa para proteínas. (D) A secreção I é positiva para polissacarídeos neutros, a secreção tipo II é intensamente reativa e a secreção tipo III é reativa para esses polissacarídeos neutros. (E) A secreção I é negativa para polissacarídeos ácidos, enquanto a secreção do tipo II é positiva e a do tipo III é intensamente reativa. (F e G) A intensa reatividade da secreção do tipo III é confirmada pela técnica do conjugado PAS/Alcian blue, mostrando preponderância de polissacarídeos ácidos, enquanto o tipo II é mais reativo para neutros. Em todas as últimas imagens há uma área lúcida próxima à região dorsal entre os dois estratos que não reagiu a nenhuma das técnicas de coloração (seta preta). (H) O epitélio da camada densa possui numerosas camadas de células e muitas células descamativas nos estratos apicais, compreendendo uma secreção holócrina (seta branca). (I e J) O citoplasma das duas últimas camadas celulares e das células descamativas é acidófilo e muito reativo para proteínas. (K) Células descamativas da camada densa intensamente reativas a polissacarídeos neutros. (L) A camada externa dos espermatóforos é intensamente reativa para proteínas, enquanto a camada interna é reativa. (M) Camada externa do espermatóforo intensamente reativa ao PAS (polissacarídeos neutros) e a camada interna é reativa. (N) Camada externa do espermatóforo intensamente reativa para polissacarídeos ácidos, enquanto a camada interna é apenas reativa. (O) Predominância dos polissacarídeos ácidos na camada externa do espermatóforo e predominância dos neutros na camada interna.

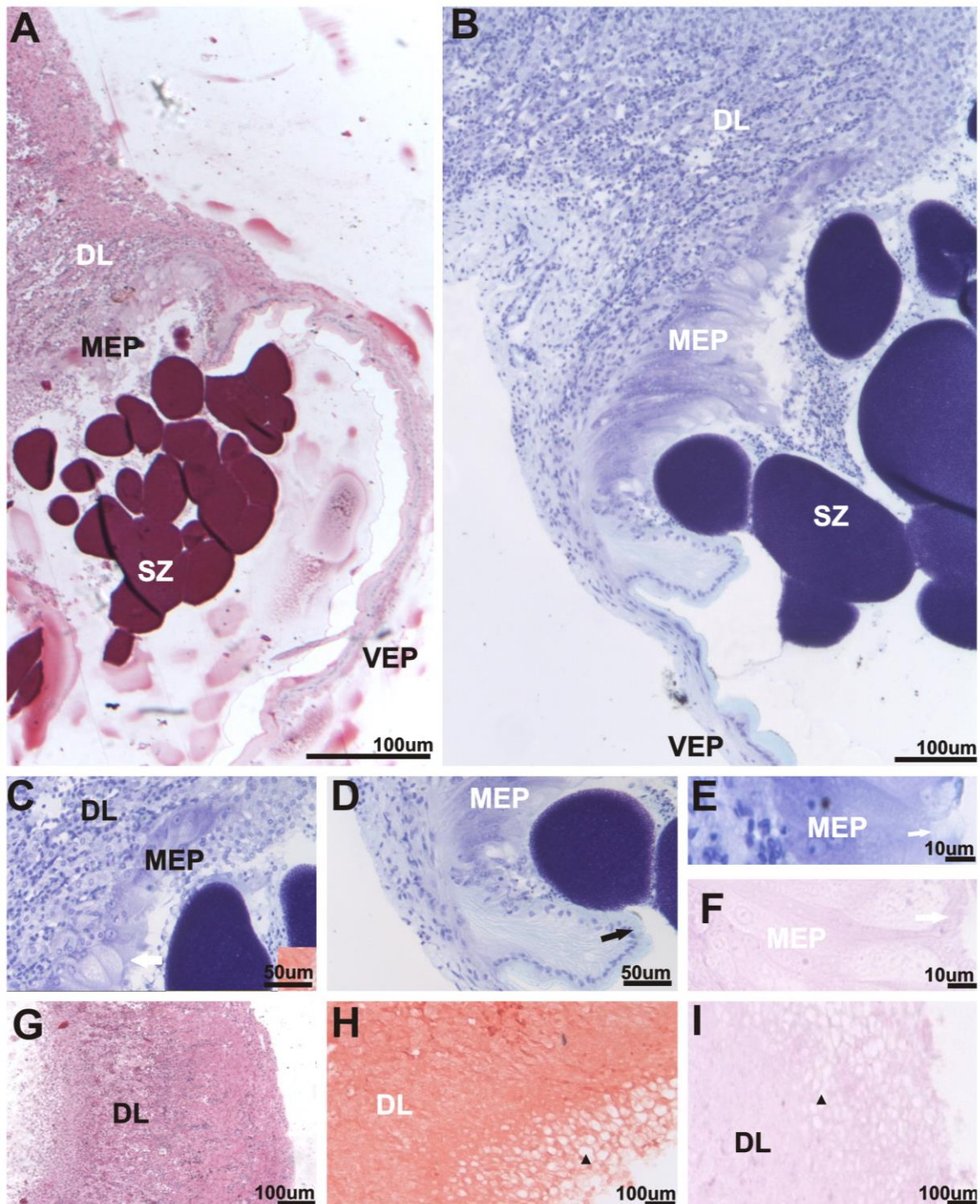


Figura 4. Receptáculo seminal de fêmeas INT. (A) O RS com plug-espermático menos volumoso e com amplos espaços lúcidos entre o epitélio estratificado de camada densa e o plug-espermático. Há espermatozoides livres no RS dessas fêmeas e a região dorsal do RS está ligada ao oviduto. (B) Nas fêmeas INT, os espermatozoides são deslocados para a região ventral do RS. As células na transição entre as regiões dorsal e ventral tornaram-se um epitélio modificado originado de células da camada mesodérmica dorsal. (C) Detalhe do epitélio modificado que é colunar simples com células longas, possuindo mais de um núcleo e microvilosidades longas que lembram cílios (seta branca). (D) Detalhe da transição entre a região dorsal e ventral. Essas dobras progridem para o lúmen e são recobertas por cutícula espessa (seta preta). (E e F) O citoplasma dessas células é positivo para proteínas e polissacarídeos neutros e as microvilosidades são fortemente positivas para ambos. (G, H e I) Detalhe da camada densa, contínua ao oviduto com células de descamação muito vacuolizadas (ponta de seta preta) e menos reativas a glicoproteínas e polissacarídeos neutros. DL: camada densa; MEP: epitélio modificado; VEP: epitélio ventral; SZ: espermatozoides.

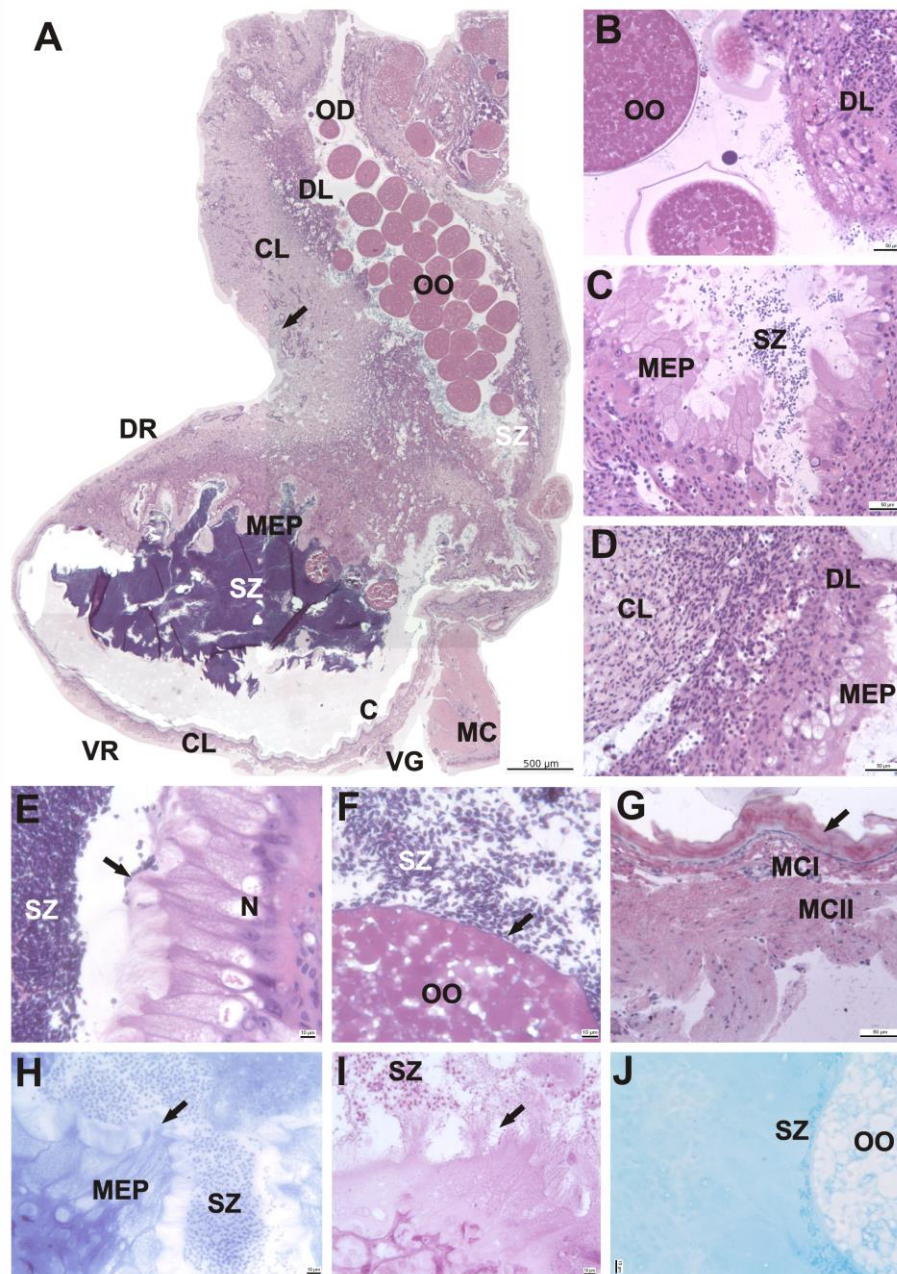


Figura 5. Receptáculo seminal de fêmeas MAT e OV. (A) O RS contém apenas espermatozoides livres, esta estrutura mostra-se como uma câmara excêntrica ao eixo do oviduto em oposição à vagina. O RS é classificado como do tipo dorsal, a maior parte dele forma uma câmara lateral ou excêntrica ao oviduto. O epitélio estratificado da camada densa apresenta poucas células de descamação sobre o colágeno e as camadas conectivas, que permanecem mais espessas (seta preta). Uma forte camada muscular está associada ao tecido conjuntivo na base da conexão entre o oviduto e a câmara SR. (B) Detalhe dos oócitos atravessam o oviduto e atingem a camada densa da região dorsal do RS. (C e D) Os oócitos entram na câmara lateral do RS que é recoberta pelo epitélio dorsal modificado; muitos espermatozoides livres são vistos entre o oviduto e a câmara SR. (E) Os espermatozoides livres são armazenados dentro da câmara e muitos deles estão em contato com microvilosidades longas semelhantes a cílios (seta preta). (F) Espermatozoides livres circundam os ovócitos, formando uma estrutura turva sobre o cório (seta preta). (G) A região ventral apresenta o epitélio simples variando de cúbico a estratificado e é recoberto por uma cutícula (seta preta). A região ventral conectou-se a vários feixes de fibras musculares em paralelo e perpendicular ao epitélio. (H, I, J) A secreção entre os espermatozoides dentro do RS é glicoproteica com polissacarídeos neutros e ácidos. As microvilosidades são reativas para polissacarídeos neutros e ácidos. C: cutícula; CL: camada conectiva; DL: camada densa; DR: região dorsal; MC: musculatura; MCI: musculatura paralela; MCII: musculatura perpendicular; MEP: epitélio modificado; N: núcleo; OD: oviduto; OO: oócito; SZ: espermatozoides; VG: vagina; VR: região ventral.

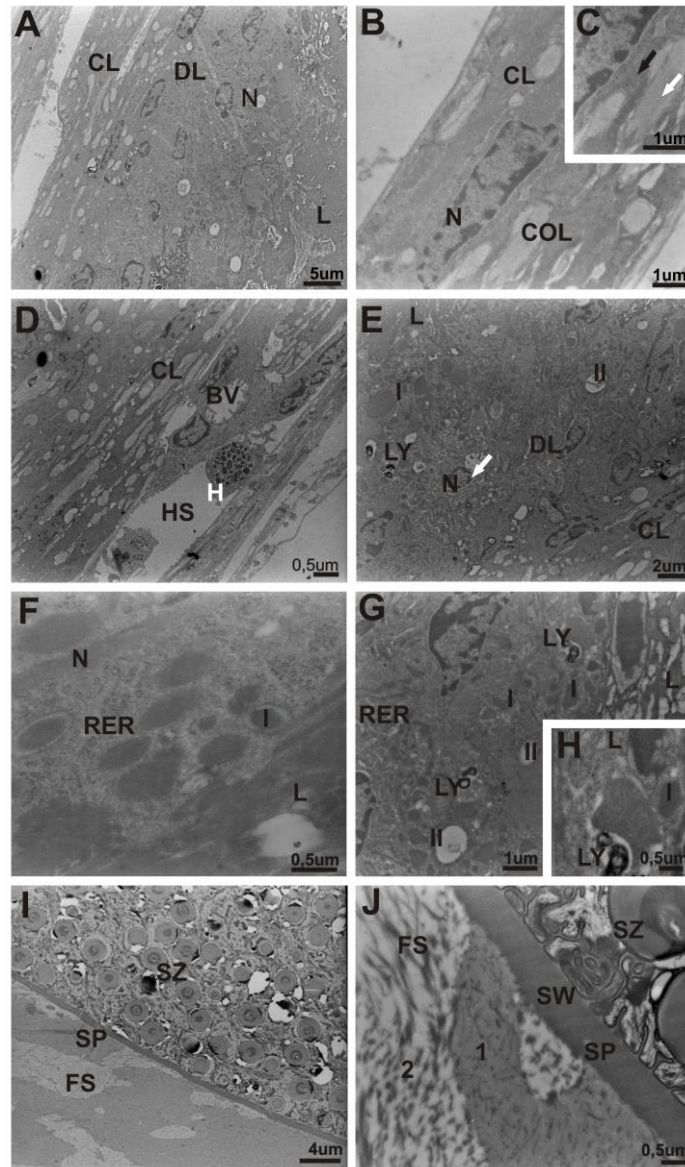


Figura 6. Ultraestrutura do receptáculo seminal de fêmeas RUD. (A) A parede do RS torna-se mais fina devido à pressão exercida pelo plug-espermático. Tanto a camada densa estratificada quanto a de colágeno são delgadas. (B e C) A camada externa de colágeno tem fibroblastos achatados devido à configuração do núcleo. Entre os fibroblastos existem vários feixes de fibras colágenas, a maioria das fibras alinhadas na mesma direção (seta branca e preta) devido à pressão exercida pelo líquido seminal. (D) Além de ser achatada pelo fluido seminal, a camada externa de colágeno é ligeiramente diferente das demais camadas: existem alguns espaços hemais amplos com hemócitos e vasos sanguíneos. (E) As células do epitélio estratificado têm um núcleo central alongado a arredondado, heterocromatina muitas vezes periférica (seta branca) e um núcleo evidente. (F) O citoplasma das células de descamação das camadas mais externas é preenchido com retículo endoplasmático rugoso (RER) e vesículas eletrodensa tipo I e eletrolúcida tipo II. (G) O citoplasma possui vesículas com membranas concêntricas e materiais eletrodensos que lembram lisossomos. (H) Detalhe do material eletrodenso. (I) No lúmen, os espermatozoides são armazenados dentro dos espermatóforos. (J) A secreção luminal possui dois tipos de secreção: 1) uma secreção de secreção eletrodensa e fibrosa; 2) uma secreção menos eletrodensa e homogênea. BV: vasos sanguíneos; CL: camada conectiva; COL: camada de colágeno; DL: camada densa; FS: secreção fibrosa; H: hemócitos; HS: espaços hemais; L: lúmen; LY: lisossomos; N: núcleo; SP: espermatóforo; SW: Parede do espermatóforo; SZ: espermatozoide

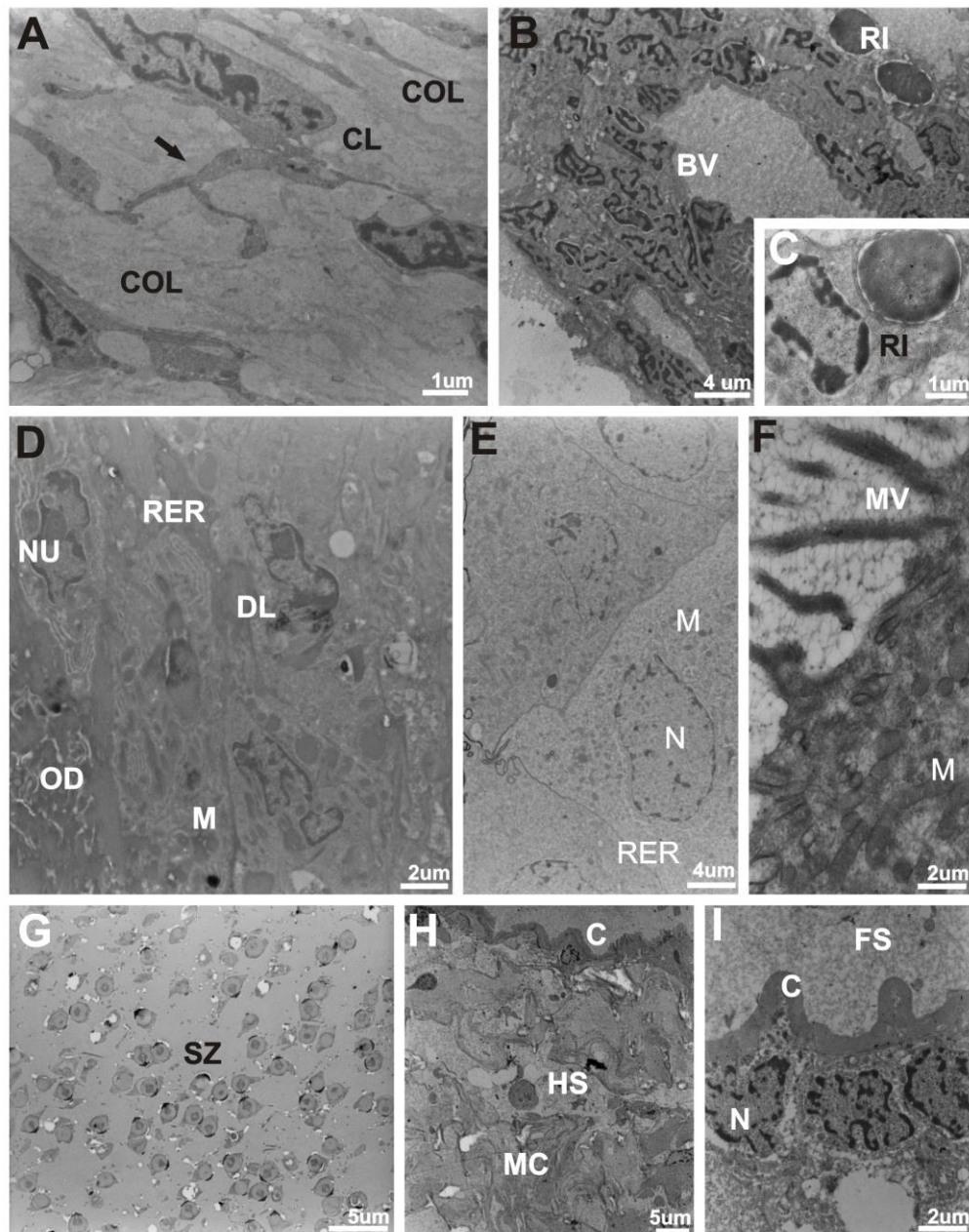


Figura 7. Ultraestrutura do receptáculo seminal de fêmeas DEV e INT. (A) As características ultraestruturais do receptáculo seminal das fêmeas ED e INT são as mesmas. A camada de colágeno é mais espessa, com feixes de fibras de colágeno de mesma densidade eletrônica, dispostos em direções diferentes. Os fibroblastos engordados apresentam diversas ramificações citoplasmáticas (seta preta). (B) A camada de colágeno tem vasos sanguíneos largos e várias células de inclusão de reserva (células RI) são vistas nos espaços hemais próximos aos vasos sanguíneos. (C) Detalhe de uma única grande vesícula elétron-densa que ocupa a maior parte do citoplasma. (D) A camada densa é muito mais espessa e se estende até o oviduto. Esta camada tem células soltas e vários espaços hemais preenchidos com hemolinfa. O citoplasma tem muitos RER, um núcleo central irregular com heterocromatina periférica e um núcleo central. (E) O citoplasma dessas células apresenta núcleo basal com poucas heterocromatinas, RER e muitas mitocôndrias. (F) Detalhe do polo apical com tantas mitocôndrias e muitas projeções filiformes preenchidas com microvilosidades. (G) O lúmen SR contém espermatozoides livres. (H) A região ventral em contraste com o epitélio modificado apresenta pequenas células com membrana nuclear altamente irregular, recoberta por uma cutícula. (I) Detalhe da região ventral coberta por uma cutícula mais espessa e no lúmen uma secreção fibrosa. BV: vasos sanguíneos; C: cutícula; CL: camada conectiva; COL: camada de colágeno; DL: camada densa; FS: secreção fibrosa; HS: espaços hemais; M: mitocôndrias; MC: musculatura; MV: microvilosidades; NU: nucléolo; OD: oviduto; SZ: espermatozoides.

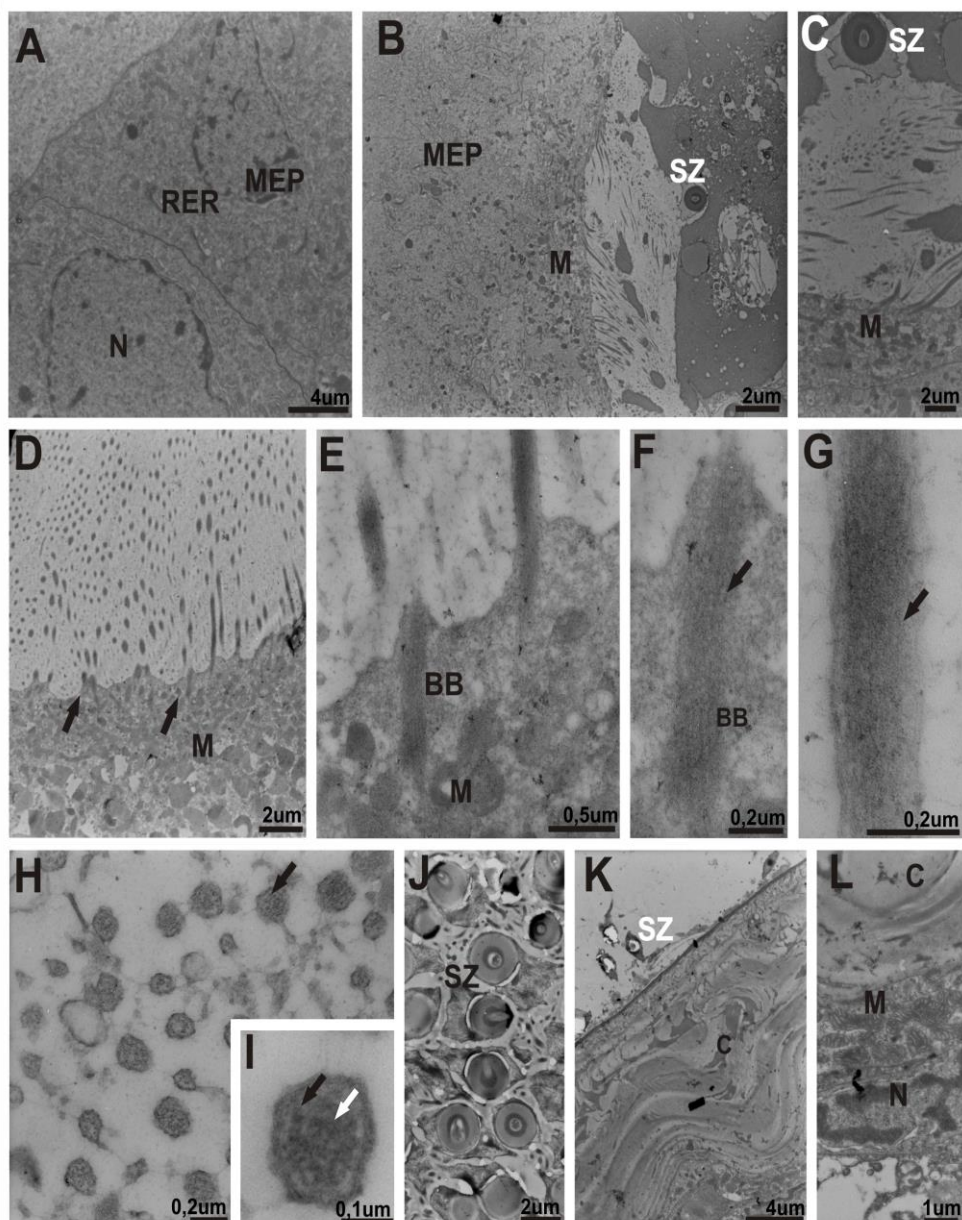


Figura 8. Ultraestrutura do RS de fêmeas MAT e OV. (A) O RS possui uma câmara lateral; o teto da porção dorsal desta câmara apresenta um epitélio modificado. (B e C) A principal característica dessas células é a presença de muitas mitocôndrias no polo apical e projeções longas e filiformes, em direção ao lúmen da câmara. (D) Detalhe dessas projeções apresentam ângulos diferentes em relação à superfície do epitélio. (E) Nota ancorada ao citoplasma por estruturas eletrodensas que se assemelham a um corpo basal, mas não possuem os microtúbulos triplos. (F e G) Este elemento do citoesqueleto preenche toda a extensão das microvilosidades (seta preta). (H) Em corte transversal, é possível identificar elementos do citoesqueleto de 5 nm e 24 nm que parecem ser actina e microtúbulos desorganizados entre os elementos periféricos e centrais (seta preta). (I) Detalhe desses elementos do citoesqueleto não organizados em um axonema (seta preta e branca). (J) Os espermatozoides estão livres na câmara lateral. (K e L) A região ventral do RS apresenta uma espessa camada cuticular com células ricas em mitocôndrias. BB: corpo basal; M: mitocôndrias; MEP: epitélio modificado; N: núcleo; RER: retículo endoplasmático rugoso; SZ: espermatozoides.

Discussão

O RS de *C. danae* foi classificado como dorsal, seguindo o padrão previamente descrito para outros para Portunidae como *Callinectes bocourti* A. Milne-Edwards, 1879, *C. ornatus*, *C. sapidus*, *A. cribrarius*, *Portunus pelagicus* e também para outros Portunoidea *Ovalipes catharus* (White e Doubleday, 1843), *Liocarcinus depurator* (Linnaeus, 1758) e *Car. maenas* (Spalding, 1942; Hartnoll, 1968; Bawab & El Sherief, 1988; Diesel, 1991; McLay e Lopéz Greco, 2011; Zara et al., 2014). Assim, a oposição entre o oviduto e a vagina é mantida durante todo ciclo ovariano, o que caracteriza o tipo dorsal (McLay & Lopez Greco, 2011). Por meio da gross anatomy, pode-se confundir a classificação do tipo de RS, pois com o desenvolvimento ovariano e desaparecimento do plug-espermático ocorre alteração da camada densa que fica contínua ao oviduto o qual desemboca lateralmente a câmara onde estão armazenadas as células germinativas, porém em oposição a vagina, assim como o close relative *A. cribrarius* (Zara et al., 2014). Desta maneira, a descrição de Souza et al. (2016) para *C. bocourti* com o RS do tipo ventral trata-se de um engano anatômico e histológico, confirmando assim, por meio de *C. danae*, as observações prévias de McLay & Lopez Greco (2011). O oviduto é composto por um tipo de tampão celular em forma de fenda, idêntico ao descrito para *C. sapidus* e *P. hawaiiensis* (Ryan, 1967; Johnson, 1980). Desta maneira, o oviduto relembra o que foi descrito para *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788), porém sem vesículas lipídicas, sendo também semelhante a *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853 com tecido celular nesta passagem (Lee & Yamazaki, 1990; Antunes et al., 2016). Este tampão parece funcionar de maneira semelhante ao proposto para os Pinnotheridae, o qual se abre no momento da ovulação, muito provavelmente por mecanismo holócrino (Becker et al., 2011). Apesar de não ter sido observado neste trabalho, mas como RS é uma especialização do oviduto (McLay & Lopes Greco, 2011), o mecanismo holócrino deve ser também o padrão para *C. danae*. Suportando esta proposição, todas as células da camada densa, as quais tornam-se contínuas ao oviduto nos estágios finais da maturação ovariana, sofrem descamação ou secreção holócrina, acentuada principalmente nos estágios INT e MAT. Contudo, Hayer et al. (2016) demonstrou que as células que formam o canal do oviduto no caranguejo *Dorippe sinica* Shen, 1980 liberam seus produtos por secreção apócrina. Porém, neste Eubrachyura basal, o oviduto se abre diretamente na vagina, sendo bastante distinto de *C. danae*.

Em fêmeas JUV em abraço pré-copulatório, o RS está totalmente formado, com a camada densa apresentando muitos estratos celulares. O ovário encontra-se com ovócitos em pré-vitelogênese ou vitelogênese endógena (Zara et al., 2013). Logo após a cópula, as fêmeas

em estágio ovariano RUD mostram o RS completamente preenchido por espermátóforos imersos na periferia do plug-espermático, em contato com a camada densa, semelhante ao observado para a maioria dos Portunidae (Ryan, 1967; Johnson, 1980; Bawab & El-Sherif, 1988; Zara et al., 2014). O plug-espermático encontrado em Portunoidea é considerado interno, sendo diferente do caranguejo *Metacarcinus edwardsii* (Bell, 1835) e *Metacarcinus magister* (Dana, 1852). Nestas espécies, o plug é considerado do tipo externo, o qual obstrui apenas o canal vaginal e uma parte pode ser visualizada através da vulva (Hartnoll, 1969; Jensen et al., 1996; Pardo et al., 2014). Em *C. danae*, o plug-espermático leva ao achatamento das várias células do epitélio estratificado dorsal da camada densa. Além disso, a participação da camada colágena e conjuntiva é crucial para a manutenção da integridade do órgão, o que pode ser percebido pela estruturação paralela das fibras do tecido conjuntivo tanto ao microscópio de luz quanto ao eletrônico de transmissão. Como reflexo da grande dilatação sofrida pelo órgão, tanto o tecido conjuntivo quanto o epitelial do RS trabalham de maneira semelhante ao epitélio de transição dos vertebrados (Spalding, 1942).

Em Portunidae, Carcinidae, Ovalipidae e Cancridae o plug-espermático é formado pelas secreções seminais transferidas pelo macho para o RS no momento da cópula (Spalding 1942; Edwards, 1966; Ryan, 1967; Hinsch, 1986; Jivoff, 1997a, b; Zara et al., 2012; Nascimento e Zara, 2013, Zara et al., 2014). Em Portunoidea o plug-espermático é caracterizado pela presença de estratos distintos sendo dois em *Ca maenas* e três em *P. hawaiiensis* (Spalding, 1942; Ryan, 1967). O plug em *C. danae* claramente apresenta estratificação, a qual é congruente com as diferentes secreções produzidas nas diferentes regiões anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD) do vaso deferente dos machos. Em *C. danae*, o primeiro estrato é composto por secreção do tipo I, glicoproteica e é acumulado na metade dorso-posterior do RS. Esta secreção tem exatamente a mesma composição química da PVD descrita para *C. danae* e *C. ornatus* (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013). Por sua vez, o estrato II, o qual preenche toda a metade antero-dorsal do RS, é glicoproteico com polissacarídeos ácidos. Este estrato possui dois tipos de secreção, a tipo II, na medula, é glicoproteica com menor intensidade de reação para polissacarídeos ácidos. A secreção tipo III, na córtex, mostra os mesmos componentes, porém mais fortemente positiva para polissacarídeos aniônicos. Esta secreção encontra-se junto a camada densa e nela estão os espermátóforos intactos. As secreções provenientes da AVD, principalmente a porção posterior, onde os espermátóforos são formados e separados uns dos outros, é rica em polissacarídeos ácidos, enquanto as secreções da MVD constituem um composto glicoproteico

e granular, sem componentes aniônicos (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013). A AVD é descrita simplesmente como uma região para a montagem dos espermatóforos em *Portunoidea* (Spalding 1942; Ryan 1967; Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013; Ravi et al., 2014; Waiho et al., 2017). Tradicionalmente é descrito que somente as secreções da MVD e PVD participam da formação do plug (Ryan, 1967; Johnson, 1980). Assim, fica claro que o estrato II é produzido pela mistura da secreção da AVD com a MVD, o que parece catalisar o processo de formação do plug-espermático, sendo então esta secreção produzida na AVD do sistema reprodutor masculino, vital para que ocorra a polimerização do Wax-like plug in *Callinectes* and probably to all other close relative sperm plug *Portunoidea*.

Nossos resultados mostram pela primeira vez em *Callinectes*, que os machos de *C. danae* transferem todo o fluido seminal armazenado no vaso deferente e, por isso, o plug-espermático apresenta o mesmo volume correspondente. Na verdade, o RS tem 3% a mais de material adicional do que o observado no vaso deferente, o que julgamos, sem uma análise bioquímica mais aprofundada, que possa ser resultante da entrada de água durante a transferência espermática. Esta proposta tem por base a evidência de uma área sem nenhuma coloração, observada na mesma posição do RS para todas as fêmeas analisadas, a qual é bastante semelhante ao reportado para o formador de pacotes espermáticos *Ch. opilio* (Sainte-Marie et al., 2000). Segundo estes autores, a água suavizaria a interação dos compostos seminais masculinos e femininos, o que pode contribuir para a formação dos pacotes neste animal, onde o último macho tem vantagem na fertilização dos ovócitos (Diesel, 1991; Sainte-Marie et al., 2000). Esta função não pode ser atribuída para *C. danae*, onde a competição espermática não deve ocorrer pela presença do plug ou é reduzida como sugerido por Parker (1970) e Jivoff (1997b). A participação de água na transferência espermática de caranguejos tem sido amplamente relatada e discutida (Beninguer et al., 1988; Sainte-Marie et al., 2000; Becker et al., 2011). Beninguer et al. (1988) propõe que existe a necessidade de água para a diluição do fluido seminal a ser transferido para o RS, sendo esta inserida durante a atuação dos gonópodos I e II. Por outro lado, a atuação dos músculos da vagina também podem permitir a entrada de água (Hartnoll, 1968). Desta maneira, o plug-espermático interno atua de maneira distinta do plug externo de *M. magister*, onde a água não entra no RS (described as spermatheca) in Jensen et al. (1996).

Outro aspecto interessante observado foi os machos delivered todo o material seminal para a formação do plug-espermático, tornando-se totalmente depleted of sperm. Esta entrega de todo material seminal está relacionada com o tipo de comportamento de cópula em

Callinectes, o qual é amplamente estudado (para revisão ver Jivoff et al., 2007). Em *C. danae*, os machos entregam todo o seu ejaculado, não economizando para uma cópula subsequente, como também observado para o formador de pacote espermático, *M. edwardsii* (Pardo et al., 2015, 2018). A guarda pós-copulatória em *Callinectes* é associada com a proteção da fêmea contra predadores, uma vez que esta encontra-se em soft-shelled molting condition e, também para evitar o acasalamento com outros machos (Jivoff, 1997a). Jivoff (1997b) discute a importância da guarda pré-copulatória para o reabastecimento de ejaculado no caso de cópulas sucessivas. Desta maneira, com a transferência de 100% do ejaculado para o RS em *C. danae*, evidenciamos que a guarda pós-copulatória também é vantajosa para os machos, uma vez que este período vai ser importante para recarregar o vaso deferente. Assim, nossos resultados são complementares as evidências de redução do volume de fluido seminal transferido para fêmeas em experimentos com cópulas sucessivas (Jivoff, 1997b; Wolcott et al., 2005). Além disso, nossos resultados comprovam o que foi sugerido para *C. sapidus*, em que os machos também se beneficiam do abraço post-copulatório, não somente pelo aumento do risco de competição espermática o que é influenciado pela razão sexual (Jivoff, 1997a, b, Jivoff et al., 2007).

O desaparecimento do plug-espermático em *C. danae* está associado com a descamação das células do epitélio estratificado da camada densa dorsal, como observado em *A. cribrarius* (Zara et al., 2014). Esta camada apresenta vários estratos celulares nas fêmeas JUV, o que parece antecipar a rápida atividade para a dissolução do plug após a muda da puberdade e cópula. Claramente, as secreções glicoproteicas acumuladas em vesículas eletrondensas e eletron-lúcidas em *C. danae* devem atuar como enzimas liberadas por mecanismo holócrino, levando a dissolução do plug-espermático. No portunídeo *Scylla serrata* (Forsk., 1775) a dissolução do plug-espermático ocorre por meio da ação de enzimas, devido a detecção de atividade proteolítica, sendo uma provável serino-protease (Jayasancar & Subramonian, 1997). Secreção holócrina na região dorsal do RS é reportada para muitos caranguejos como os filogeneticamente relacionados Portunidae, Carcinidae, Cancridae (Spalding, 1942; Ryan, 1967; Zara et al., 2014; Souza et al., 2016) ou mais distantes, como majídeos (Hartnoll, 1968; Beninger et al., 1988; González Gurriarán et al., 1998; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998; González-Pisani & López Greco, 2007; Sal Moyano et al., 2009; González-Pisani, 2012), Leucosiidae (Hayer et al., 2015) e Eriphidae (Souza et al., 2016). Desta maneira, a presença de epitélio estratificado com células em descamação não é característica exclusiva para a dissolução de plug-espermático, uma vez que o mecanismo holócrino ocorre em espécies sem plug e/ou formadoras de pacotes espermáticos (Sant'Anna et al., 2007; Hayer et al., 2015;

Antunes et al., 2018). Em Portunidae, Carcinidae e Cancridae o desaparecimento do plug-espermático é coincidente com o desenvolvimento ovariano e está associado, também com a ampliação de espaço na cavidade cefalotorácica (Spalding, 1942; Ryan, 1967; Hines, 1982; Bawab & El-Sherif, 1988; Jensen et al., 1996; Wolcott et al., 2005; Zara et al., 2014). A duração do plug é variável entre as espécies, sendo três semanas em *C. sapidus* e um mês em *A. cribrarius* (Johnson, 1980; Pinheiro e Fransozo, 2002; Wolcott et al., 2005).

Adicionalmente, ao mesmo tempo que ocorre a dissolução do plug-espermático, os espermatóforos são encaminhados para a região mais ventral do RS, particularmente acumulados junto na margem do epitélio modificado, sendo bastante semelhante à outros Portunidae e Carcinidae (Spalding, 1942; Ryan, 1967; Zara et al., 2014). Ao mesmo tempo em que o plug é dissolvido por compostos da camada densa, a parede (ou pellicle) dos espermatóforos parecem ser desorganizadas, o que acreditamos ser promovida pela ação dos mesmos componentes que dissolvem o plug-espermático. Zara et al. (2012) e Nascimento & Zara (2013) não detectaram polissacarídeos ácidos na composição da parede do espermatóforo. Porém, neste trabalho, observa-se a presença de polissacarídeos aniônicos como uma delgada camada mais externa na parede do espermatóforo. A camada mais interna da parede, mais espessa, possui a composição glicoproteica anteriormente descrita para *C. danae* e *C. ornatus*. Desta maneira, Zara et al. (2012) e Nascimento & Zara (2013) não detectaram esta camada externa por avaliarem a parede na AVD posterior, onde ocorre a formação dos espermatóforos no vaso deferente. Nesta porção, as secreções do tipo I, ricas em polissacarídeos ácidos, afastam os espermatóforos uns dos outros e, portanto, mascaram a visualização desta delgada camada espermatofórica externa. Assim, em futuros trabalhos com sistema reprodutor masculino, recomenda-se a observação dos espermatóforos acumulados na MVD ou preparações com espermatóforos retirados do vaso deferente e centrifugadas em tampão, para posterior análise histoquímica. Em *S. serrata*, a parede do espermatóforo tem exatamente a mesma característica histoquímica e foi detectado que esta composição é quitina, ou seja polissacarídeos ácidos (N-acetilglicosamina), ocorrendo exclusivamente na camada mais externa (Uma & Subramonian, 1979). A atividade de enzimas detectadas no plug-espermático *S. serrata* também poderia participar da liberação dos espermatozoides dos espermatóforos, por meio da ação de enzima caseolítica (caseinolytic) e gelatinolíticas (gelatinolytic) como encontrado nos plugs copulatórios de roedores (Wilson et al., 1993; Jayasankar & Subramonia, 1997). Desta maneira, nos parece bastante plausível que a mesma enzima que atua na degradação do estrato II glicoproteico com polissacarídeos ácidos, também deva atuar na deiscência dos

espermatóforos, por degradação da parede, como levantado para *A. cribrarius* (Zara et al., 2014). Em resumo, acreditamos que a dissolução do plug e deiscência são eventos congruentes.

Ao mesmo tempo em que ocorre a dissolução do plug-espermático, o RS modifica progressivamente a sua morfologia pela redução da região dorsal. Esta região torna-se cada vez mais contínua a abertura do oviduto, ao mesmo tempo que o 1/3 antero-dorsal modifica-se progressivamente em uma câmara lateral, excêntrica, principalmente nos estágios INT e MAD. Em fêmeas MAD a antiga região dorsal está contínua ao oviduto, desembocando na periferia dorsal da câmara excêntrica, quase totalmente em oposição a vagina, mantendo-se assim como um RS do tipo dorsal. Modificações morfológicas ao mesmo tempo que RS dissolve o plug também foram mencionadas para *P. hawaiiensis* (Ryan, 1967). Em *A. cribrarius*, esta descrito a continuidade do oviduto e da camada densa, porém houve pouco detalhamento, principalmente da câmara lateral excêntrica e da oposição do oviduto em relação a vagina (Zara et al., 2014). Em *Car. maenas* também ocorrem modificações morfológicas do receptáculo ao longo do desaparecimento do plug-espermático (Spalding, 1942), porém estas não são tão acentuadas como em *C. danae* e *A. cribrarius*. A histologia mostra que o teto da câmara lateral do RS é formado por um epitélio modificado (*sensu* Johnson, 1980) o qual é, em *C. danae* derivado de células mesodérmicas da transição entre a camada densa dorsal e a região ventral cuticular, sendo aparentemente encontradas a partir do estágio INT, quando o plug não é mais observado. Este epitélio modificado também foi observado em *C. sapidus* e *Car. maenas*, com as mesmas características de células altas, algumas vezes binucleadas e com o bordo apical apresentando longos prolongamentos semelhantes a cílios ao microscópio de luz, os quais são intensamente corados para proteínas em *C. danae*. Estas mesmas estruturas semelhantes a cílios foram observadas em *Car. maenas*, *C. sapidus*, *P. hawaiiensis* e *A. cribrarius* (Ryan, 1967; Johnson, 1980; Zara et al., 2014). Apesar da ausência de cílios em artrópodes, esta região já foi descrita como ciliada em *C. sapidus* por Cronin, 1942 em Hartnoll (1968). Adicionalmente, este mesmo autor utilizou amostras frescas de RS em água do mar e uma discreta movimentação do meio sobre estas células foi notado e esta movimentação foi atribuída a pseudópodos e, definitivamente não existe cílios nesta região, sendo estas longas microvilosidades. Em *C. danae* não foi observado pseudópodos como observado por L. T. Threadgold em Hartnoll (1968). Apesar de não ter sido realizada uma preparação específica para citoesqueleto, ao TEM estas especializações de membrana apical não mostram axonema, confirmando que não são cílios, também em *C. danae*. Intrigantemente, elementos de citoesqueleto com 24nm e 2-4nm foram identificados em cortes transversais, indicando uma provável presença de microtúbulos

e filamentos de actina, o que não é usual em microvilosidades. Na base destas longas microvilosidades existem corpos electron-densos com aspecto fibrilar que relembram uma basal bodie, sem triplets of microtúbulos in cartwheel, os quais julgamos fazerem parte da trama apical dos filamentos de actina. O citoplasma apical deste epitélio modificado não apresenta características secretoras, porém muitas mitocôndrias são observadas, como em células ciliares. Em *C. danae*, não foram observadas vesículas de secreção ou exocitose ao TEM. No citoplasma apical pouca reação para proteínas e polissacarídeos neutros foram detectadas, sendo ausente os polissacarídeos ácidos. Portanto, não ocorre liberação de secreção PAS ou Alcian blue positivas como em *C. sapidus* (Johnson, 1980). Assim, após quase 80 anos da descrição de Cronin (1942) em Hartnoll (1968) e como levantado por Johnson (1980), maiores estudos devem ser conduzidos para entender se existe algum tipo de interação de citoesqueleto, para justificar a discreta movimentação observada nestas células por Hartnoll (1968).

Em fêmeas maduras, antes e durante a fertilização, os espermatozoides estão imersos em secreção glicoproteica, com polissacarídeos ácidos, o que especulamos ser material resultante da degradação do plug-espermático em fêmeas primíparas, além da camada densa, sendo esta mais importante para fêmeas múltiparas. Desta maneira, estudos com fêmeas após a primeira ovulação serão essenciais para entender como esta camada densa se comporta no desenvolvimento do segundo ciclo ovariano. Infelizmente, este trabalho falha nesta observação, uma vez que foi conduzido com fêmeas primíparas coletadas em processo de migração no estuário de São Vicente (Sant'Anna et al., 2012). Aos polissacarídeos ácidos é atribuída a função bactericida e/ou bacteriostática (Sasikala & Subramoniam, 1987; Beninger et al., 1993; Jaysankar & Subramonian, 1999; Benhalima & Moriyasu, 2000). Nas fêmeas JUV estes polissacarídeos ácidos podem atuar na preparação do RS para receber o fluido seminal (Zara et al., 2014). Porém, nas fêmeas em ovulação de *C. danae*, estes componentes aniônicos podem ser importantes caso ocorra a entrada de algum material externo devido a ação dos músculos da vagina durante a passagem dos ovos (Hartnoll, 1968). Os polissacarídeos neutros podem servir em Portunoidea como elementos nutricionais para a manutenção dos espermatozoides livres junto da câmara do RS, como proposto por vários autores, inclusive para Portunoidea (Spalding, 1942; Ryan, 1967), o que justifica uma reação não tão intensa para polissacarídeos neutros em *C. danae*. É conhecido que os espermatozoides parecem ter suas mitocôndrias degeneradas, pela perda dos citocromos oxidase como demonstrado *Car. maenas* (Pearson & Walker, 1975) e, portanto ter metabolismo anaeróbico como *S. serrata* (Jayasankar & Subramanian, 1989).

A ovulação e fertilização, observada em duas fêmeas de *C. danae* recém trazidas do campo, mostrou que a antiga camada densa participa com a descamação de células durante a ovulação e adicionalmente, espermatozoides foram observados não somente em contato com ovócitos na câmara lateral, como também no oviduto. A presença de espermatozoides em contato com a membrana do córeo ovocítico no oviduto também foi observada em *Car. maenas* e *P. hawaiiensis* (Spalding, 1942; Ryan, 1967). Apesar de existirem espermatozoides em contato com as longas microvilosidades do epitélio modificado no teto da câmara lateral, nos parece mas plausível que a movimentação dos espermatozoides, i. e. os quais são células sem motilidade (para revisão Brown 1966; Tudge, 2009; Assugeni et al., 2017), aconteça por movimentos dos músculos associados ao RS, como proposto para *P. hawaiiensis* e *A. cribrarius*. Desta maneira, este processo aqui observado pode ser considerado, até o momento como padrão para os Portunoidea formadores de plug-espermático.

Em conclusão, o presente estudo revelou que o material da AVD dos machos é também importante para a polimerização do plug-espermático, em adição ao amplamente descrito para os fluidos da MVD e PVD. Além disso, os machos de *C. danae* entregam 100% do seu fluido seminal, mostrando que o abraço pós-copulatório é importante para o macho reabastecer seu vaso deferente. Ao mesmo tempo, a fêmea inicia a dissolução do plug-espermático, que culmina em uma ampla modificação morfológica do RS, com movimentação dos espermatóforos para a região ventral (câmara lateral) e deiscência, o que permitirá a fertilização dos ovócitos pela passagem do oviduto em oposição a vagina. Assim, fica claro a sincronia evolutiva entre os sistemas reprodutores masculinos e femininos e o estudo destes sinais morfológicos relacionados as filogenias atualmente conhecidas podem auxiliar profundamente no entendimento da reconstrução de caracteres ancestrais. Adicionalmente, estudos bioquímicos sobre a composição dos diferentes componentes são um passo crucial para entender como este fascinante processo de polimerização de compostos gelatinosos transformam-se em um plug com aspecto de cera.

Referências

- Antunes, M.; Zara, F.J.; Lopez-Greco, L.S.; Negreiros-Fransozo, M.L., 2016. Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea. *Invertebr. Biol.* 1-12.
- Antunes, M.; Zara, F.J.; Lopez-Greco, L.S.; Negreiros-Fransozo, M.L., 2018. Male reproductive system of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* (Inachoididae). *Invertebr. Biol.* 137: 171-184.
- Assugeni, C.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. *J. Morphol.* 1-19.
- Balasubramanian, C. P.; Suseelan, C., 1998. Reproductive biology of the female deepwater crab *Charybdis smithii* (Brachyura – Portunidae) from the Indian Seas. *Asian Fish. Sci.* 10: 211-222.
- Bawab, F.M.; El Sherif, S.S., 1988. Stages of Reproductive cycle of the female crab *Portunus pelagicus* based on the anatomical changes of the spermatheca (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Crustaceana.* 54: 139-148.
- Becker, C.; Brandis, D.; Storch, V., 2011. Morphology of the female reproductive system of European Pea crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae). *J. Morphol.* 272: 12-26.
- Benhalima, K.; Moriyasu, M., 2000. Structure and function of the posterior vas deferens of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Invertebr. Reprod. Dev.* 37: 11-23.
- Beninger, P. G.; Elnor, R.W.; Foyle, T.P.; Odense, P. H., 1988. Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *J. Crust. Biol.* 8: 322-332.
- Beninger, P.G.; Lanteigne, C.; Elnor, R.W., 1993. Reproductive processes revealed by spermatophore dehiscence experiments and by histology, ultrastructure and histochemistry of the female reproductive system in the snow crab *Chionoecetes opilio* (Fabricius). *J. Crust. Biol.* 13: 1-16.
- Beninger, P.G.; Larocque, R. 1998. Gonopod tegumental glands: a new accessory sex gland in the Brachyura. *Mar. Biol.* 132: 435-444.
- Brown, G.G., 1966. Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the Decapod *Callinectes sapidus*. *J. Ultra. Mol. Struct. R.* 14: 425-440.
- Charniaux-Cotton, H. 1980. Experimental studies of reproduction in malacostraca crustaceans. Description of vitellogenesis and of its endocrine control. In W.H. Clark, Jr. & T.S. Adams (Eds.), *Advances in Invertebrate Reproduction*, 177-186.
- Costa, T. M.; Negreiros-Fransozo, M. L., 1998. The reproductive cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 (Decapoda, Portunidae) in the Ubatuba region, Brazil. *Crustaceana.* 71: 615-627.
- Cronin, L. E. 1942. A histological study of the development of the ovary and accessory organs of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, 37 pp. Masters Thesis, University of Maryland.
- Diesel, R., 1989. Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *J. Crust. Biol.* 9: 266-277.
- Diesel, R. 1991. Sperm competition and mating behaviour in Brachyura. In: Bauer RT, Martin JW (Eds.). *J. Crust. Biol.* 145-163.

- Edwards, E. 1966. Mating Behaviour in the European Edible Crab (*Cancer pagurus* L.). *Crustaceana*. 10: 23-30.
- García Bento, M.A.; Miranda, I.; Mantelatto, F.L.; Zara, F.J., 2018. Comparative spermatozoal ultrastructure and molecular analysis in dromiid crabs and their phylogenetic implications for Dromiidae and Podotremata (Decapoda: Brachyura). *Arthropod Struct. Dev.* 47: 627-642.
- Guinot, D.; Tavares, M., 2001. Une nouvelle famille de crabes du Crétacé, et la notion de Podotremata Guinot, 1977 (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Zoosystema*. 23: 507-546.
- Guinot, D.; Quenette, G., 2005. The spermatheca in Podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implications. *Zoosystema*. 27, 267-342.
- Guinot, D.; Tavares, M.; Castro, P., 2013. Significance of the sexual openings and supplementary structures on the phylogeny of brachyuran crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura), with new nomina for higherranked podotreme taxa. *Zootaxa*. 3665, 1-414.
- González-Gurriaran, E.; Fernandez, L.; Muino, R., 1998. Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 220: 269-285.
- González-Pisani, X.; López-Greco, L.S., 2007. Estructura de la espermateca del cangrejo araña *Leurocyclus tuberculatus* (Majoidea). In: *Proceedings of the XII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar*, Florianópolis, Brasil. pp:14-17.
- González-Pisani, X.; Barón, P.; López-Greco, L.S., 2012. Functional anatomy of the female reproductive systems of two spider crabs (Decapoda, Majoidea). *Invertebr. Biol.* 131: 61-74.
- Hartnoll, R.G., 1968. Morphology of the genital ducts in female crabs. *Zool. J. Linn. Soc.* 47: 279-300.
- Hartnoll, R.G., 1969. Mating in the Brachyura. *Crustaceana*. 16: 161-181.
- Hayer, S.; Schubart, C.D.; Brandis, D. 2015. Morphology and Function of the Female Reproductive System of *Ebalia tumefacta* (Decapoda, Brachyura, Leucosiidae). *J. Morphol.* 276:517-525.
- Hayer, S.; Köhnka, S.; Boretius, S.; Dirk, B., 2016. Ever more complex: a new type of organization of reproductive organs in female *Dorippe sinica* Chen, 1980 (Decapoda: Brachyura: Dorippidae). *Zoology*. 119: 455-463.
- Hines, A. H., 1982. Allometric constraints and variables of reproductive effort in brachyuran crabs. *Mar. Biol.* 69: 309-320.
- Hines, A. H., Jivoff, P.R.; Bushmann, P. J.; Van Montfrans, J.; Reed, S.A.; Wolcott, D.L.; Wolcott, T.G., 2003. Evidence for sperm limitation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bull. Mar. Sci.* 72:287-310.
- Hinsch, G. W., 1986. A comparison of sperm morphologies, transfer and sperm mass storage between two species of crab, *Ovalipes ocellatus* and *Libinia emarginata*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 10: 79-87.
- Jayasankar, V.; Subramoniam, T., 1997. Proteolytic Activity in the Seminal Plasma of the Mud Crab, *Scylla serrata* (Forsk.). *Comp. Biochem. Physiol.* 116: 347-352.
- Jayasankar, V.; Subramoniam, T., 1999. Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 236: 253-259.
- Jensen, P.C.; Orensanz, J.M.; Armstrong, D. A., 1996. Structures of the female reproductive tract in the Dungeness Crab (*Cancer magister*) and implications for the mating system. *Biol. Bull.* 5: 336-349.

- Jensen, P.C.; Bentzen P., 2012. A molecular dissection of the mating system of the Dungeness crab, *Metacarcinus magister* (Brachyura: Cancridae). *J. Crustac. Biol.* 3: 443-456.
- Jivoff, P., 1997a. The relative roles of predation and sperm competition on the duration of the post-copulatory association between the sexes in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 40: 175-185.
- Jivoff, P., 1997b. Sexual competition among male blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.* 193: 368-380.
- Jivoff, P.; Hines, A. H.; Quackenbush, L.S., 2007. Reproduction Biology and Embryonic Development, 255-286. In: Kennedy, V.S. and Cronin, L.E. *The Blue Crab Callinectes sapidus*. Maryland: Sea Grant.
- Junqueira, L.C.; Junqueira, M.S., 1983. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Instituto de Ciências Biomédicas e Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- Johnson, P. T. 1980. Histology of the Blue Crab (*Callinectes sapidus*): A Model for the Decapoda. Praeger Scientific. New York.
- Lee, T.H.; Yamazaki, F., 1990. Structure and function of a special tissue in the female genital ducts of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis*. *Biol. Bull.* 178: 94-100.
- Mancini, K., H. Dolder., 2001. Ultrastructure of apyrene and eupyrene spermatozoa from the seminal vesicle of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tissue Cell.* 33: 301-308.
- Mantelatto, F.L.; Fransozo, A., 1999. Reproductive biology and moulting cycle of the crab *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Decapoda – Brachyura - Portunidae) from the Ubatuba region, São Paulo, Brazil. *Crustaceana.* 72: 63-76.
- Medina, A. 1992. Structural Modifications of Sperm from the Fiddler Crab *Uca Tangeri* (Decapoda) During Early Stages of Fertilization. *J Crust Biol.* 12: 610–614.
- Melo, G.A.S., 1996. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. São Paulo, Plêiade/Fapesp.
- Mello, M.S.L.; Vidal, B.C., 1980. Práticas de Biologia Celular. São Paulo: Edgar Blucher Funcamp.
- McLay, C.L.; López-Greco, L.S., 2011. A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: how did a race to be first become a race to be last? *Zool. Anz.* 250: 378-406.
- Nascimento, F. A.; Zara, F.J., 2013. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius*, 21: 161-177.
- Norman, C.P., 1996. Reproductive Biology and Evidence for Hard-Female Mating in the Brachyuran Crab *Thalamita sima* (Portunidae). *J. Crustac. Biol.* 16: 656-662.
- Norman, C. P.; Hirano, Y.J.; Miyazaki, T., 1997. Hard-female mating in the brachyuran crab *Thalamita prymna* (Portunidae). *Crustacean Research.* 26: 62-69.
- Norman, C. P.; Nuka, T.; Miyazaki, T., 1999. Mating behavior in *Thalamita picta* (Brachyura: Portunidae) and comparisons of congeneric species. *Crustacean Research.* 28: 16-23.
- Pardo, L.M.; Riveros, M.; Fuentes, J.P.; Lopez-Greco, L., 2014. Functional morphology of the seminal receptacle in the crab *Metacarcinus edwardsii*. *Invertebr. Biol.* 132: 386-393.
- Pardo, L.M.; Riveros, M.P.; Chaparro, O. B.; Pretterebner, K., 2018. Ejaculate allocation in Brachyura: What do males of *Metacarcinus edwardsii* respond to?. *Aquat. Biol.* 27: 25-33.

- Parker, G.A., 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev.* 45: 525-567.
- Pearse, A. G. E., 1985. *Histochemistry: Theoretical and Applied*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Pearson, P.J.; Walker, M.H., 1975. Alteration of Cytochrome C Oxidase Activity during Spermatogenesis in *Carcinus maenas*. *Cell Tissue Res.* 164: 401-410.
- Pinheiro, M. A. A.; Fransozo, A., 1999. Reproductive behavior of the swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Crustacea, Brachyura, Portunidae) in captivity. *Bull. Mar. Sci.* 64: 243-253.
- Pinheiro, M. A. A.; Fransozo, A., 2002. Reproduction of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Brachyura: Portunidae) on the Brazilian coast near 23°30'S. *J. Crustac. Biol.* 22: 416-428.
- Pita, J.B.; Rodriguez, E.S.; Graça-Lopes, R.G., Coelho, J.A.P., 1985. Levantamento da família Portunidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura) no complexo Baía-Estuário de Santos, São Paulo. *Bol. Inst. Pesca.* 12: 153-162.
- Ravi, R.; Manisseri, M.K.; Sanil, N.K. 2014. Structure of the male reproductive system of the blue swimmer crab *Portunus pelagicus* (Decapoda: Portunidae). *Acta Zool. (Stockholm)*. 95: 176–185
- Ryan, E.P., 1967a. Structure and function of the reproductive system of the *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). I. Male system, 2: 522-544. In: *Proceedings of the Symposium on Crustacea at Erkulán, Índia*.
- Ryan, E.P., 1967b. Structure and function of the reproductive system of the *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). II. Female system, 2: 522-544. In: *Proceedings of the Symposium on Crustacea at Erkulán, Índia*.
- Sainte-Marie, G.; Sainte-Marie, B., 1998. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). II. Multiple types of sperm cells and of spermatophores in the Spermathecae of mated females. *Can. J. Zool.* 77: 451-462.
- Sainte-Marie, G.; Sainte-Marie, B.; Sévigny, J.M., 2000. Ejaculate-storage patterns and the site of fertilization in female snow crabs (*Chionoecetes opilio*; Brachyura, Majidae). *Can. J. Zool.*, 78: 1902-1917.
- Sal Moyano, M.P.; Gavio, M.A.; Cuartas, E.I., 2010. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. *Helgol. Mar. Res.* 64: 213-221.
- Sant'Anna, B. S., Pinheiro, M. A. A.; Mataqueiro, M.; Zara, F.J., 2007. Spermathecae of the mangrove crab *Ucides cordatus*: a histological and histochemical view. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 87: 903-911.
- 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. *Mar. Biol. Res.* 8:4, 354-362.
- Sasikala, S. L.; T. Subramoniam., 1987. On the occurrence of acid mucopolysaccharides in the spermatophores of two marine prawns, *Penaeus indiens* (Milne-Edwards) and *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) (Crustacea: Macrura). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113: 145-153.
- Severino-Rodrigues, E.; Pita, J. B.; Graça-Lopes, R., 2001. Pesca artesanal de siris (Crustacea, Decapoda, Portunidae) na região estuarina de Santos e São Vicente (SP), Brasil. *Bol. Inst. Pesca.*
- Souza, L.P.; Ogawa, C.Y.; Silva, J.R.F.; Camargo-Mathias, M.I., 2016. Comparative morphology of the female genital ducts of seven eubranchyuran crabs (Saint Laurent, 1980). *Acta Zool. (Stockholm)* 98, 125-135.

- Spalding, J. F., 1942. The nature and formation of the spermatophore and sperm plug in *Carcinus maenas*. Q. J. Microsc. Sci. 83: 399- 423.
- Subramoniam, T. 2016. Sexual biology and reproduction in crustaceans. London: Elsevier.
- Tudge, C. C., 2009. Sperm morphology and its bearing on decapod phylogeny. In J. W. Martin, K. A. Crandall, & D. L. Felder (Eds.). Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean issues 18. Boca Raton: Taylor and Francis/CRC Press
- Uma, k.; Subrammoniam, T. 1979. Histochemical characteristics of spermatophore layers of *Scylla serrata* (Forsk.) (Decapoda: Portunidae). Int. J. Invertebr. Reprod. 1: 31-40.
- Vehof, J., Scholtz, G., Becker, C., 2017. Morphology of the female reproductive system of three dorippid crabs (Crustacea; Decapoda; Brachyura; Dorippidae) and the role of accessory cuticle structures associated with seminal receptacles. Invertebr. Biol. 136: 271-289
- Waiho, K.; Fazhan, H.; Jasmani, S.; Ikhwanuddin. M. 2017. Gonadal development in males of the orange mud crab, *Scylla olivacea* (Herbst, 1796) (Decapoda, Brachyura, Portunidae). Crustaceana. 1: 1568-5403.
- Watson, J. 1970. Maturity, mating and egg laying in the spider crab, *Chionoecetes opilio*. J Fish Res Board Can. 27: 1607-11616.
- Watson, J. 1972. Mating behavior in the spider crab, *Chionoecetes opilio*. J Fish Res Board Can. 29: 447-449.
- Willians, A.B., 1984. Shrimps, lobsters, and crabs of the Atlantic Coast of the Eastern United States, Maine to Florida. Smithsonian Institution Press.
- Willians, A.B., 2007. Systematics and Evolution, 1: 1-21. In: V.S. Kennedy, L.E. Cronin, (Eds.) The Blue Crab *Callinectes sapidus*. Maryland Sea Grant, Maryland.
- Wolcott, D. L.; Hopkins, C. W. B.; Wolcott, T. G., 2005. Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun: effects of male mating history, male size and season. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 319: 43-55.
- Zana, U.; Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2001. Ultrastructure of sperm in Plebeia (Plebeia) *Droryana friese* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). J. Hymenopt. Res. 10: 261-270.
- Zara, F. J.; Toyama, M.H.; Caetano, F.H.; Lopez-Greco, L.S., 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). J. Crustac. Biol. 32:249-262.
- Zara, F. J., Gaeta, H.H.; Costa, T.M.; Toyama, M.H.; Caetano, F.H., 2013. The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea:Portunidae). Acta Zool. 94: 134-146.
- Zara, F.J.; Pereira, R.R.; Sant'anna, B.S., 2014. Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribarius*. Biol. Bull. 227: 19-32.

Capítulo 4

Novos insights sobre a morfologia e armazenamento espermático em Portunidae (Decapoda: Brachyura)

Resumo

O objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia e histoquímica do receptáculo seminal (RS) de *Cronius ruber* (Thalamitinae), *Achelous spinimanus* e *Achelous spinicarpus* (Portuninae) e realizar o mapeamento dos caracteres do RS das espécies deste trabalho comparados com outros Portunoidea já descritos na literatura, a fim de contar a história evolutiva deste órgão em Portunidae, dado a importância do entendimento da relação entre os padrões morfológicos e evolutivos desta superfamília, que ainda continua pouco compreendida, frente a sua grande diversidade de representantes. Os principais resultados deste trabalho mostram nas espécies estudadas ausência de plug-espermático. Além disso, foi descrito, pela primeira vez, em Portunidae e também Portunoidea, a presença de RS do tipo ventral cuja anatomia é mesma durante todo o desenvolvimento ovariano e além disso, encontrou-se pacotes espermáticos no RS, indicando que as fêmeas realizam a cópula rígida com a possibilidade mais de um macho. Desta maneira, podemos considerar este um novo padrão de armazenamento espermático para esta família e talvez para a superfamília, sendo esta característica uma condição homoplásica em Portunidae e uma sinapomorfia para o gênero *Achelous*. Assim, os resultados evidenciam que essas espécies podem apresentar competição espermática e que o último macho a copular terá prioridade na fertilização dos ovócitos, o que nunca havia sido descrito para Portunoidea.

Palavras-chave: fluido seminal, pacote espermático, plug-espermático, receptáculo seminal

Introdução

A superfamília Portunoidea Rafinesque, 1815 é representada por cerca de 70 gêneros distribuídos em quatro famílias com distribuição cosmopolita, predominantemente marinhas, embora algumas espécies possam migrar e utilizar sistemas estuarinos com reduzida salinidade, a partir da foz de rios que desaguam em estuários (Ng et al., 2008; De Grave, 2009). Recentemente, a partir de análises morfológicas e moleculares, foram propostas mudanças no arranjo filogenético da superfamília Portunoidea, com a mudanças na classificação de família e subfamília (Davie & Türkay, 2009; Spiridonov et al., 2014; Evans, 2018). A classificação mais atual (considerada neste trabalho) foi a de Evans (2018), a qual extinguiu a família Ovalipidae Neretina & Schepetov, 2014, realocando as espécies em Geryonidae Colosi, 1923, além disso, declinou o status das famílias Polybiidae Ortmann, 1893, Thiidae Dana, 1852 e Pirimelidae Alcock, 1899 para subfamílias as quais foram posicionadas em Carcinidae MacLeay, 1838. Desta maneira, atualmente Portunoidea é composto por quatro famílias, Geryonidae, Portunidae Rafinesque, 1815, Carcinidae e Brusiniidae Števcíć, 1991.

Nas fêmeas de Brachyura, o esperma proveniente do macho pode ser estocado em uma porção modificada do ducto genital, o receptáculo seminal (RS) ou em uma invaginação do exoesqueleto, sem ligação com o ducto genital, a espermateca (Hartnoll, 1968; Krol et al., 1992; Guinot & Quenette, 2005; McLay & López-Greco, 2011). Os Podotrematas possuem espermateca, estrutura de origem ectodérmica e que não possui ligação com o oviduto, o que é considerado uma sinapomorfia que distingue estes caranguejos dos Eubrachyura que possuem receptáculo seminal, o qual se conecta diretamente ao oviduto (Guinot & Tavares, 2001; McLay & López-Greco, 2011). Nos Eubrachyura, o RS tem a função de armazenar os espermatozoides e espermatóforos após a cópula, sendo esta estrutura de origem ecto-mesodérmica. A porção mesodérmica do RS constitui a região dorsal ligada ao ovário através do oviduto. A região ventral é ectodérmica, por tanto recoberta por cutícula e esta é contínua à vagina (Hartnoll, 1968; McLay & López-Greco, 2011; Zara, et al., 2014). O receptáculo seminal pode ser classificado como dorsal, ventral ou intermediário, de acordo com a posição de inserção do oviduto no RS em relação à vagina, a qual encontra-se localizada ventralmente e que termina na abertura genital ou vulva (Diesel, 1991, McLay & López-Greco, 2011, Zara et al., 2014). Apesar do tipo dorsal e ventral de RS serem derivados de uma característica ancestral totalmente ectodérmica, a espermateca, os receptáculos seminais tipo dorsal são considerados o mais próximo da condição de caráter ancestral (McLay & López-Greco, 2011). Até o momento, em Portunidae, o padrão do receptáculo seminal é majoritariamente dorsal, como

ocorre em *Arenaeus cribarius* (Lamarck, 1818) (Zara et al., 2014), *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Johnson 1980) e *Portunus pelagicus* Linnaeus 1758 (Bawab & El-Sherief, 1988). Porém, em *Portunus hawaiiensis* Herbst 1783 o receptáculo seminal foi classificado como do tipo intermediário (Ryan 1967, Diesel, 1991; McLay & López-Greco, 2011). A diferença entre os tipos de RS resulta em competição espermática em espécies formadoras de pacote espermático como nos Majoidea Inachoididae com RS ventral, no qual o último macho a copular com a fêmea tem prioridade para fertilizar os ovócitos (Diesel, 1989, 1991; McLay & López-Greco 2011; Antunes et al., 2016). Por outro lado, outros Majoidea, como nos Mithracidae, por exemplo, não existe evidência de competição espermática, onde em caso de mais de um macho ter copulado com a fêmea, o fluido seminal encontra-se misturado no lúmen do RS (Assugeni & Zara, 2022). Além disso, em Portunidae, Cancridae, Geryonidae e Carcinidae a competição espermática é evitada devido aos diversos mecanismos que impedem a poliandria: cópula com a fêmea durante a muda da puberdade, seguida pelo enrijecimento do fluido seminal levando a formação do plug-espermático no interior do RS, ao mesmo tempo que, durante o abraço pós-copulatório, o macho renova seu estoque de fluido seminal (Assugeni et al., 2021).

Assugeni et al. (2021) descreveram que o plug-espermático em *Callinectes danae* Smith, 1869 é dissolvido após algum tempo em sincronia com o desenvolvimento ovariano e ainda que, sete dias após a cópula este volume já havia sido reduzido em cerca de 2/3 e sugeriram que esta redução pode acionar o início do desenvolvimento ovariano (Zara et al., 2014). Tais processos similares foram também observados em Carcinidae *Car. maenas* (Linnaeus, 1758), no Geryonidae *Ovalipes ocellatus* (Herbst, 1799) e nos Portunidae *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896, *Portunus hawaiiensis* (Stephenson, 1968), *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) e *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Spalding, 1942; Ryan, 1967b; Hinsch, 1986; Jivoff, 1997; Stewart, 2010; Zara et al., 2014). Contudo, nos Portunidae, Thalamitinae, existem eventos de cópula em intermuda notado para diferentes espécies de *Thalamita* (Norman et al., 1999), e também em *Charybdis longicollis* Leene, 1938, *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards, 1861) e *Charybdis natator* (Herbst, 1794) (Sumpton, 1990; Innocenti et al., 1998; Baker et al., 2018). Assim, torna-se plausível e vantajosa a poliandria em espécies de Portunidae, o que contribui para aumento da variabilidade genética, o que pode justificar o sucesso do caranguejo invasor *Charybdis helleri* (A. Milne-Edwards, 1867). Além disso, esta condição cópula dura, observada também em outras espécies do gênero *Thalamita*, é geralmente realizada por espécies formadoras de pacote espermático, como os braquiúros

Inachoididae, Oregoniidae e Epitaltidae (Diesel, 1989, 1991; Beninger et al., 1993; Saint-Marie et al., 2000; Sal Moyano et al., 2009; Antunes et al., 2016, 2018).

Desta maneira, neste trabalho descrevemos a morfologia do RS de *Cronius ruber* (Lamarck, 1818) (Thalamitinae), *Achelous spinimanus* (Latreille, 1819) e *Achelous spinicarpus* Stimpson, 1871 (Portuninae) e com estes caracteres foi realizado o mapeamento do RS comparando com outros já descritos na literatura, para entender a evolução da transferência e armazenamento espermático em Portunoidea.

Material e métodos

Fêmeas adultas de *A. spininamus* e *Cr. ruber* foram coletadas no Município de Ubatuba, Estado de São Paulo, Brasil, entre 2015 a 2021, utilizando-se barco de pesca camanoeira com o auxílio de redes do tipo “double rig” e por meio de mergulho autônomo e livre. A espécie *A. spinicarpus* foi coletada durante expedição do Navio de Pesquisa Soloncy Moura MMA/ICMBio-CEPSUL) utilizando redes do tipo “otter trawl”, na cidade de São Sebastião, Estado de São Paulo, Brasil. A identificação dos animais foi realizada com base nas descrições de Melo (1996). Foram obtidos pelo menos cinco exemplares de cada espécie, as quais foram mensuradas quanto ao tamanho da carapaça e classificadas macroscopicamente com relação ao estágio ovariano (Zara et al., 2014).

Os animais foram anestesiados por resfriamento (-20°C, por 5 minutos), e os receptáculos seminais foram dissecados e fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 7,4), por no mínimo 24hs. Para a análise macroscópica, durante a fixação os RS foram fotografados sob estereomicroscópio Leica® imersos em solução fixadora.

Para análise histológica após a fixação, os RS foram desidratados em séries crescentes de álcool (40-100%), imersos em xilol por 2h e em seguida embebidos em parafina (56°C). Após a polimerização e seccionamento, os cortes histológicos foram coletados em lâminas, desparafinados em xilol, reidratados e corados com Hematoxilina & Eosina para descrição morfológica de acordo com Junqueira & Junqueira (1983). Para a análise histoquímica, os cortes foram corados com a técnica do Xylidine ponceau (Melo e Vidal, 1980) para proteínas, PAS para polissacarídeos neutros, azul de Alcian, para os polissacarídeos ácidos e a técnica conjugada PAS/azul de Alcian para determinar a preponderância de um tipo de polissacarídeo em detrimento de outro, segundo protocolo proposto por Junqueira & Junqueira (1983).

Análise filogenética

A hipótese filogenética considerada neste trabalho foi a proposta por Evans (2018). Desta maneira foi elaborado um diagrama representativo dos dados moleculares obtidos (filograma) pelo autor por Maximum likelihood (ML).

Posteriormente, foi construída uma matriz contendo os dados do armazenamento espermático em Portunoidea (receptáculo seminal). Para esta matriz considerar o diagrama proposto neste trabalho baseado na filogenia acima. Nesta matriz, os caracteres foram selecionados através da morfologia do receptáculo seminal, com a finalidade de indicar caracteres sinal para separar grupos intimamente relacionados. Para designar o estado do caráter, foram atribuídos números, como segue: Caráter 1 “Tipo de RS”: dorsal (0); ventral (1). Caráter 2 “Estratégias de armazenamento”: plug-espermático (0); pacotes espermáticos (1), fluido seminal de um ou mais machos misturados (2). Nas espécies com dados insuficientes, o status atribuído foi o símbolo “?”.

Resultados

Anatomia do sistema reprodutor feminino

O sistema reprodutor feminino das espécies de *A. spinicarpus*, *A. spinimanus* e *Cr. ruber* consiste em um par de ovários conectados ao oviduto que se ligam a um par de receptáculos seminais (RS). Em *Achelous* spp. (Fig. 1A-C) o formato do RS é piriforme, enquanto em *Cr. ruber* este o formato é similar a saculiforme alongado (Fig. 1D-F). O oviduto é branco leitoso e parece bloquear o contato do lúmen do ovário e RS (Fig. 1G). A vagina se abre na vulva, que possui uma abertura em formato elíptico recoberta por uma fina camada de cutícula, o opérculo (Fig. 1E-F). Nas três espécies foi possível notar, macroscopicamente, a presença de dois ou três pacotes espermáticos em seu interior.

Histologia

Ao microscópio de luz, os cortes longitudinais mostraram a organização do RS piriforme, com duas regiões: dorsal, secretora e ventral recoberta por cutícula e contínua com a vagina, sendo possível observar tanto em *A. spinimanus*, como em *A. spinicarpus* a presença de pacotes espermáticos (1, 2, 3) (Fig. 2A-C). A inserção do oviduto ocorre na margem de transição dorso-ventral, mas ainda no epitélio mesodérmico. O oviduto permanece obstruído pela presença de um tampão celular, com células portando núcleos arredondados, além de hemócitos e alguns espaços hemais (Fig. 2D). Abaixo da inserção do oviduto ocorre a transição

do epitélio dorsal para o epitélio ventral revestido por delgada cutícula a qual se torna mais espessa em direção a vagina (Fig. 2D). A região dorsal possui três camadas: uma camada externa conjuntiva, uma camada intermediária de colágeno e uma camada interna densa, que é composta por epitélio estratificado. A camada conjuntiva tem amplos espaços hemais, com hemócitos (Fig. 2E) e a camada de colágeno tem menos espaços hemais e numerosas fibras. O epitélio estratificado é espesso e as células são pequenas com núcleo arredondado a elíptico (Fig. 2E). As células mais apicais junto ao lúmen do RS tem núcleos extremamente compactos, citoplasma basofílico (Fig. 2E) e encontram-se em processo de descamação ou secreção holócrina.

A transição do epitélio dorsal para o epitélio ventral revestido por cutícula apresenta várias dobras que ocorrem praticamente em toda a região ventral da abertura do oviduto, que não progridem para o lúmen (Fig. 2F-H). Em maiores aumentos, a transição é abrupta, e a região ventral é caracterizada por um epitélio colunar com núcleos elípticos e basais recobertos por uma espessa camada de cutícula (Fig. 2G-H). Semelhante ao epitélio dorsal, o epitélio ventral também encontra-se acentado sobre a camada conjuntiva (Fig. 2H), tal epitélio é cúbico simples, recoberto por cutícula (Fig. 2H). A vagina, também composta por epitélio cúbico simples, é recoberta por espessa camada de cutícula (Fig. 2H). Abaixo do epitélio cúbico encontra-se camada de tecido conjuntivo ligada a ela, em uma só face e nota-se a inserção das fibras musculares que também alcançam a região ventral do RS (Fig. 2F-H). O lúmen do receptáculo seminal mostra espermatozoides livres (Fig. 2J-K) com a presença três pacotes espermáticos bem definidos, delimitados por secreção (Fig. 2A-K). Esta secreção estratificada possui reação intensa para proteínas (Fig. 2L) e polissacarídeos neutros (Fig. 2N), sendo fracamente positiva para polissacarídeos ácidos (Fig. 2O). Quando do uso da técnica conjugada de PAS e Alcian, nota-se que ocorre a predominância dos polissacarídeos neutros em relação aos ácidos (Fig. 2M).

Em relação ao RS de *Cr. ruber* nota-se um formato mais alongado, com a presença de dois pacotes espermáticos bem definidos, um mais dorsal e outro ventral (Fig. 3A). A conexão do oviduto do RS se dá bem próximo a região de transição dorsal-ventral, no epitélio sem cutícula, sendo assim caracterizado como do tipo ventral (Fig. 3B-C). Esta região apresenta um tampão celular com núcleos arredondados e hemócitos (Fig. 3C). A delgada região dorsal também está estratificada em camada conjuntiva externa, camada colágena, intermediária e a densa, mais interna densa a qual é um epitélio estratificado (Fig. 3D). A região ventral é composta por muitas dobras e apresenta epitélio cúbico simples, recoberto por espessa camada

de cutícula e, conectado ao conjuntivo adjacente, notam-se feixes de fibras musculares em uma das margens. A vagina possui as mesmas características epiteliais da região ventral com inserção das fibras musculares que também alcançam a região ventral do RS, onde pode-se observar em seu lúmen, espermatozoides imersos em secreção (Fig. 3E-G). Em relação a histoquímica das secreções entre os estratos espermáticos de *Cr. ruber*, estas são glicoproteicas, com polissacarídeos neutros predominantemente. As secreções da região dorsal do RS, proximas ao extrato mais distante do oviduto, apresentam reação positiva para proteínas (Fig. 3H), polissacarídeos neutros (Fig. 3I) e ácidos (Fig. 3J). As secreções associadas aos estratos espermáticos mais ventrais, tem intensa reação para proteínas (Fig. 3K) e polissacarídeos neutros (Fig. 3L), sendo também positiva para os polissacarídeos ácidos (Fig. 3M).

O mapeamento dos caracteres mostrou que o tipo dorsal de RS é a condição ancestral para Portunoidea, e este é sinapomorfia das espécies dos gêneros de *Callinectes*, *Arenaeus* e *Portunus* (Fig. 4). Em relação ao tipo de armazenamento espermático pode-se notar que as espécies que apresentam RS dorsal também apresentam como característica ancestral a formação de plug-espermático, que ocorre nos *Callinectes*, *Arenaeus*, *Portunus*, *Ovalipes* e *Carcinus* (Fig. 5). Enquanto os formadores de pacotes espermáticos, como *A. spinicarpus*, *A. spinimanus* e *Cr. ruber* possuem esta característica mais derivada que é uma sinapomorfia de *Achelous* e uma homoplasia em relação aos demais Thalamitinae. Em relação a condição de cópula, o mapeamento deste caráter indicou que a condição ancestral trata-se da cópula em intermuda (Fig. 6).

Figuras

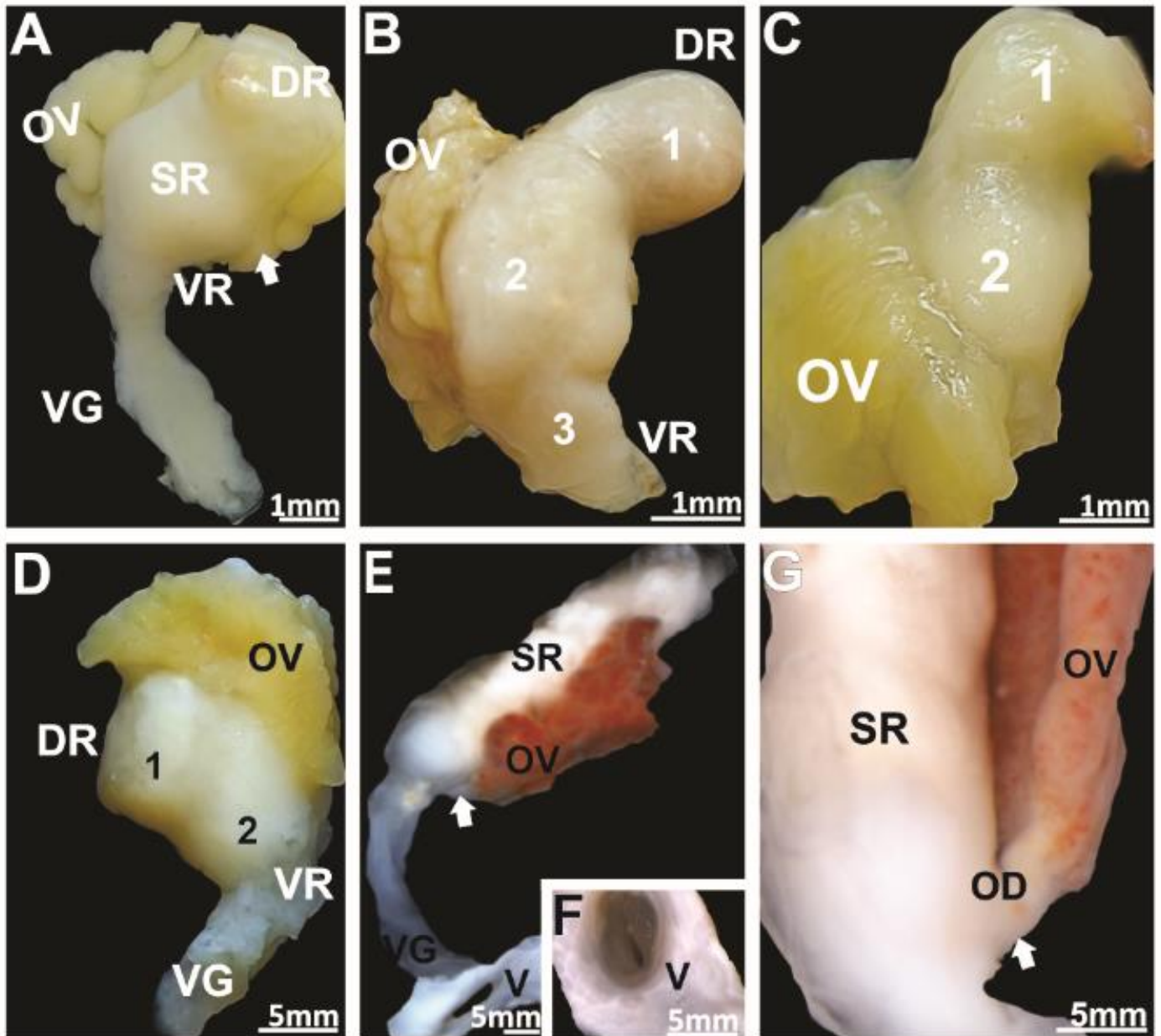


Figura 1. Anatomia do sistema reprodutor feminino nos gêneros *Achelous spinimanus* e *Cronius ruber*. A). Ovários conectados ao oviduto (seta branca) que se ligam ao receptáculo seminal (RS). A-C). Em *Achelous* spp, o formato do SR é piriforme. D-E). *Cronius ruber* apresenta formato saculiforme, porém mais alongado. A-E). Nota-se, macroscopicamente duas regiões no RS, uma dorsal e outra ventral (contínua a vagina). A-E). Nas duas espécies foi possível notar ainda, a presença de pacotes espermáticos (1, 2, 3) no interior do RS. E e G). A conexão do oviduto no RS é do tipo ventral excêntrica à vagina (seta branca). G). Detalhe do oviduto branco e leitoso (seta branca). E-F). A vagina se abre na vulva, que possui uma abertura em formato elíptico recoberta por uma fina camada de cutícula, o opérculo. DR= Região dorsal, OD= Oviduto; OV= Ovário; VR= região ventral; V= vulva; VG=vagina; (1, 2, 3 = pacotes espermáticos).

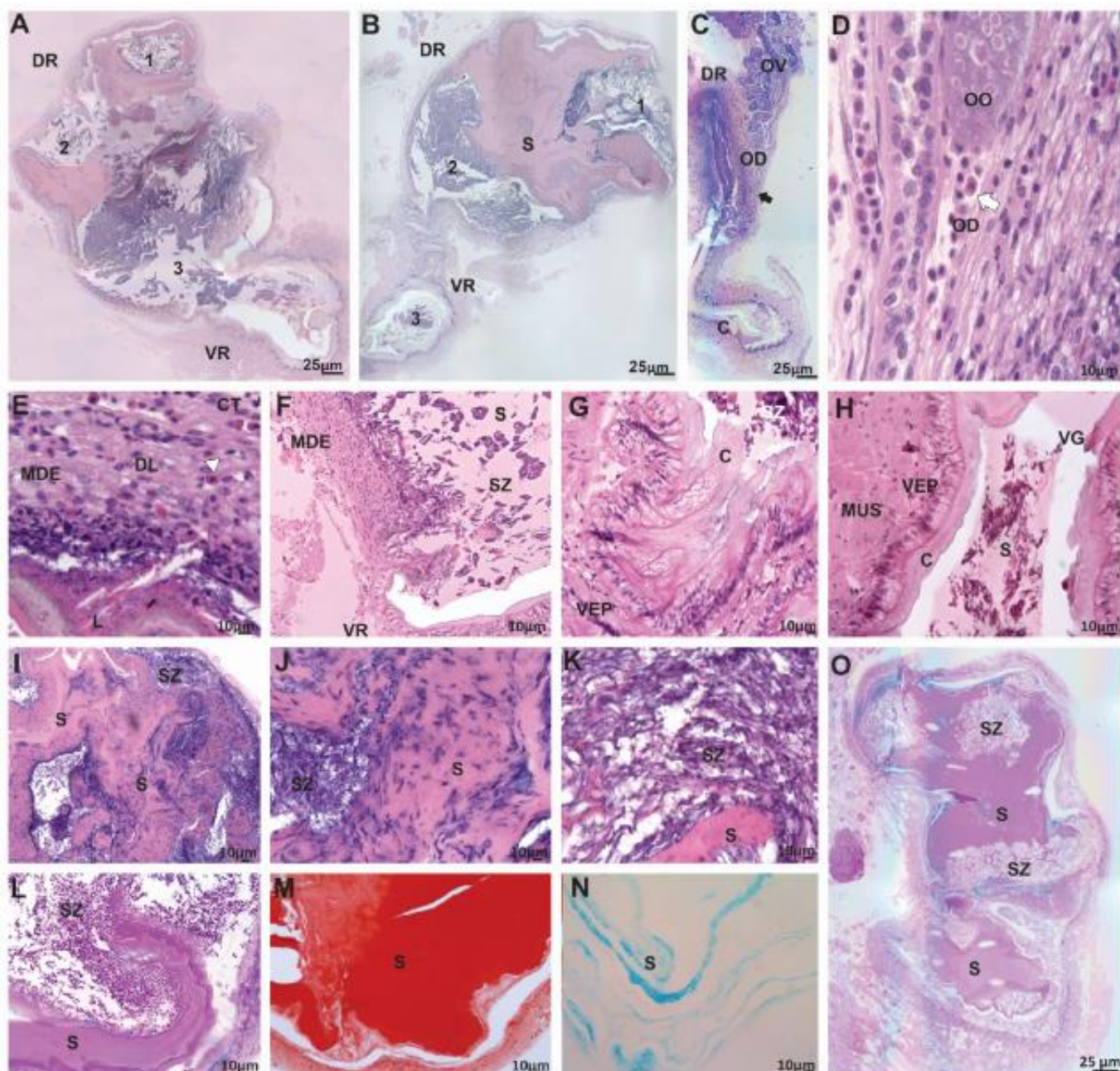


Figura 2. Receptáculo seminal de *Achelous spinicarpus* e *Achelous spinimanus*. A e B.) Vista geral do receptáculo seminal, nota-se duas regiões: dorsal e ventral. C.) Detalhe da inserção do oviduto no RS do tipo ventral (seta) (próximo a região ventral). D.) Detalhe do ponto de inserção no oviduto no RS marcado pela presença de um tampão de células e vesículas lúcidas (seta branca) e hemócitos (cabeça de seta). E.) Detalhe da região mesodérmica formada por 3 camadas. F) Detalhe da transição entre a região ventral e dorsal. G.) Esta transição é abrupta e marcada pela presença de muitas dobras na região ventral. H.) A vagina é composta de epitélio cúbico e envolta por forte musculatura. J-K.) No lúmen do RS nota-se espermatozoides livres imersos em secreção acidófila. L.) Secreção fortemente positiva para proteínas. M.) Predominância de secreção rica em polissacarídeos neutros em relação aos ácidos. N.) Secreção fortemente positiva para polissacarídeos neutros. O.) Secreção positiva para polissacarídeos ácidos. CT= Tecido conjuntivo; C= cutícula; DL= Camada densa; DR= Região dorsal, MDE: Epitélio dorsal modificado; MUS: Tecido muscular; L= Lúmen; OD= Oviduto; OO= oócitos; OV= Ovário; RS= Receptáculo seminal; S= Secreção; SZ= Espermatozóide; VG= vagina VEP= Epitélio ventral.

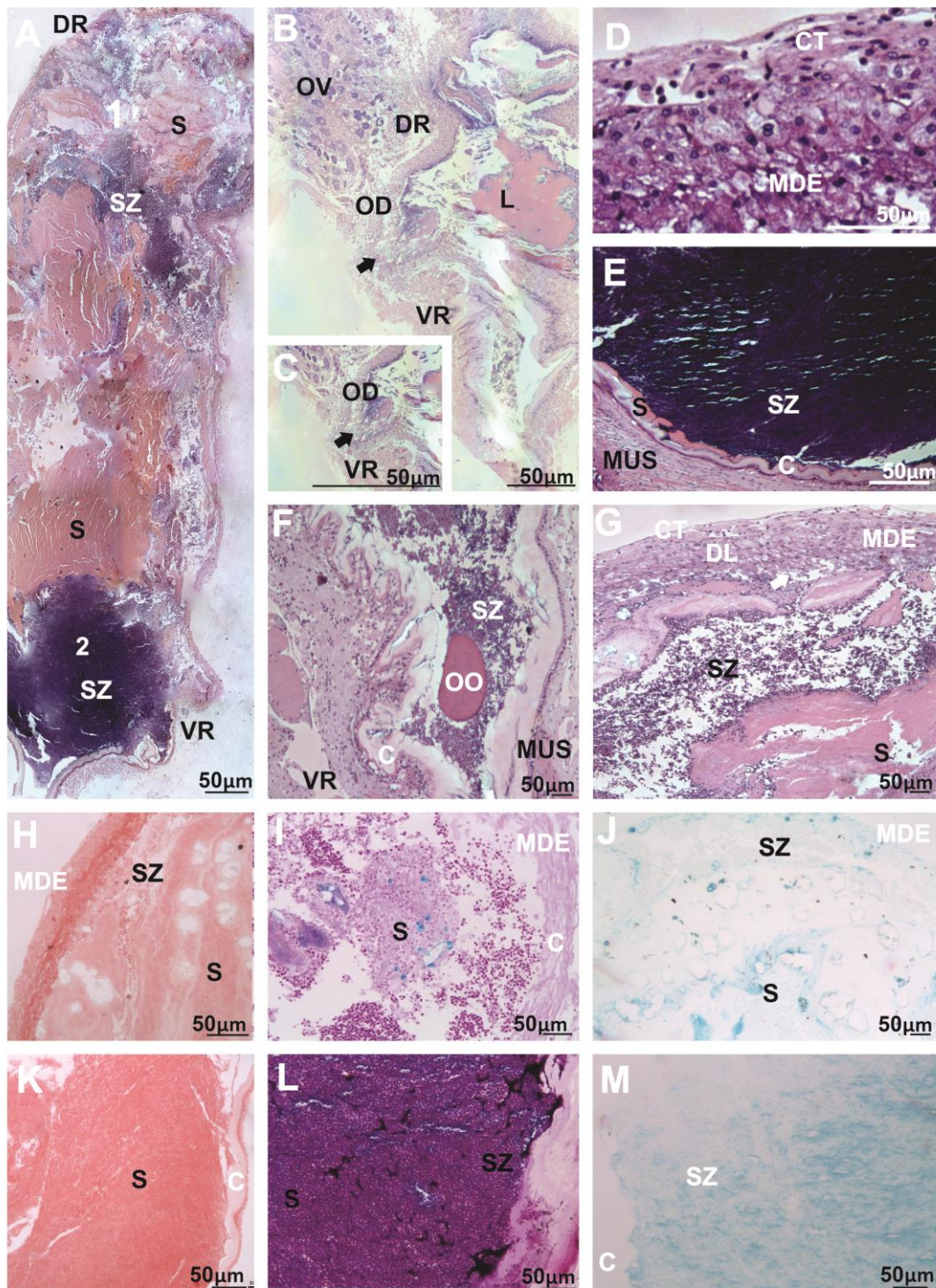


Figura 3. Receptáculo seminal de *Cronius ruber*. A.) Vista geral do receptáculo seminal, nota-se duas regiões: dorsal e ventral, além da presença de pacotes espermáticos (um ventral e outro dorsal). B.) Inserção do oviduto no RS. C.) Detalhe da inserção do oviduto no RS do tipo ventral (seta) (próximo a região ventral). D.) Detalhe da região mesodérmica formada por 3 camadas. E.) Detalhe da região ventral do RS com forte camada de cutícula. F.) Detalhe das dobras na região ventral. G.) No lúmen do RS nota-se espermatozoides livres imersos em secreção acidófila. H.) Secreção positiva para proteínas na região dorsal do RS. I.) Secreção fortemente positiva para proteínas na região ventral do RS. J e K.) Secreção positiva para polissacarídeos ácidos tanto na região dorsal como ventral do RS. L.) Reação positiva para polissacarídeos neutros e predominância destes em relação aos polissacarídeos ácidos. M.) Secreção rica em polissacarídeos neutros em relação aos ácidos. CT= Tecido conjuntivo; C= cutícula; DL= Camada densa; DR= Região dorsal, MDE: Epitélio dorsal modificado; MUS: Tecido muscular; OD= Oviduto; OO= oócitos; OV= Ovário; RS= Receptáculo seminal; S= Secreção; SZ= Espermatozóide; VG= vagina VEP= Epitélio ventral.

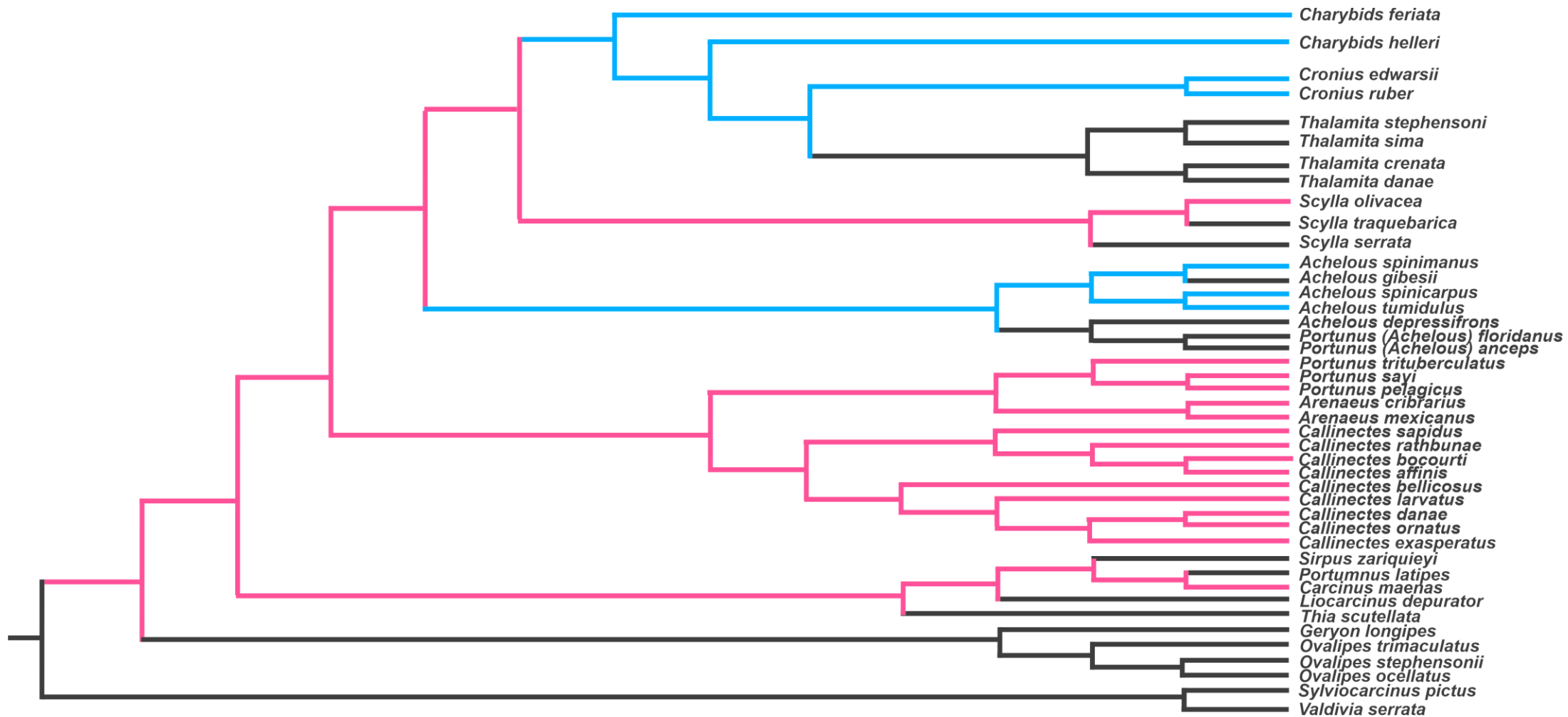


Figura 4. Diagrama de mapeamento do caráter morfológico 3: “Tipo de RS” traçado com base no filograma de Evans (2018). Estados de caráter: Ventral (1-Blue); dorsal (2-pink); not described (Black).

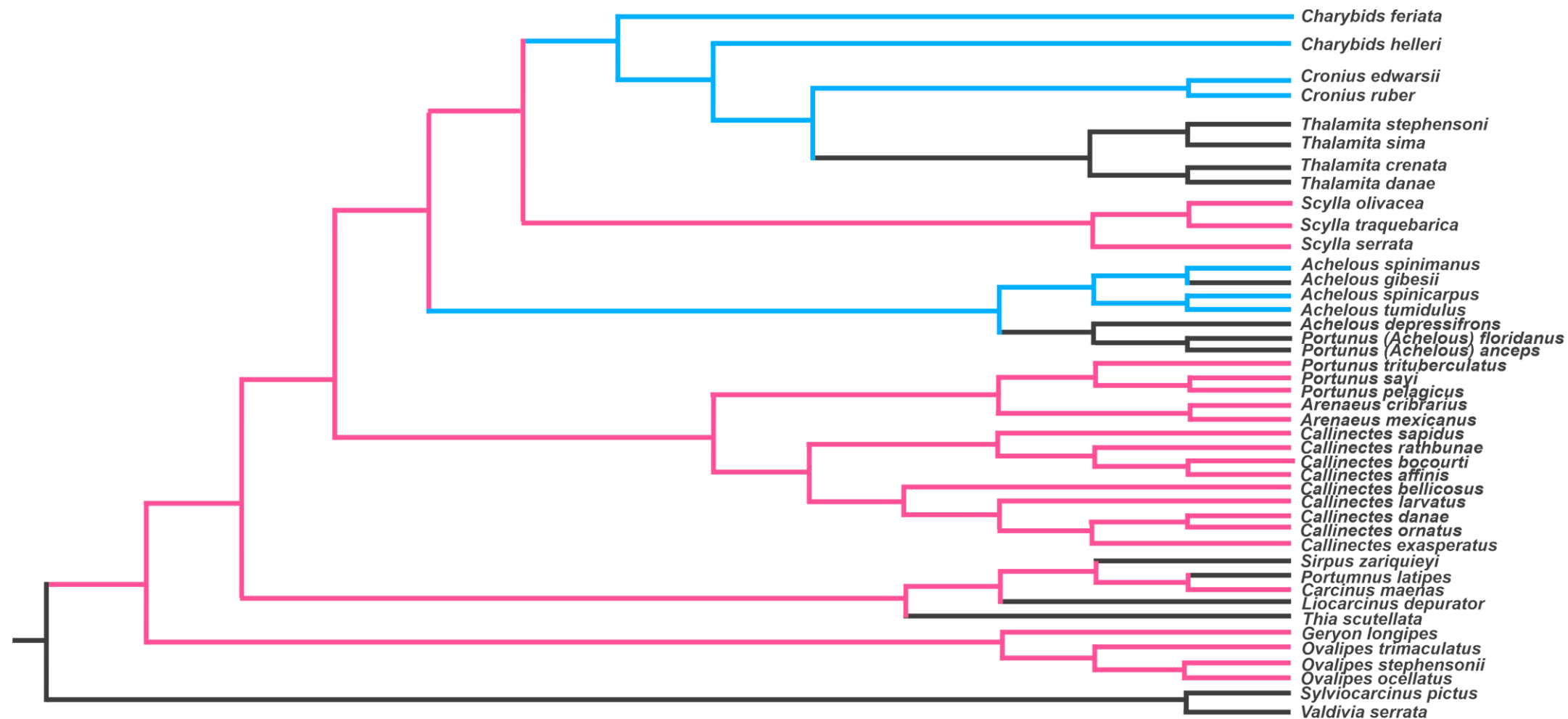


Figura 5. Diagrama de mapeamento do caráter morfológico2: “Estratégia de armazenamento espermático” traçado com base no filograma de Evans (2018). Estados de caráter: Pacote espermático ou mistura de fluido de mais de um macho (1-Blue); plug-espermático(2-pink), Not described (Black).

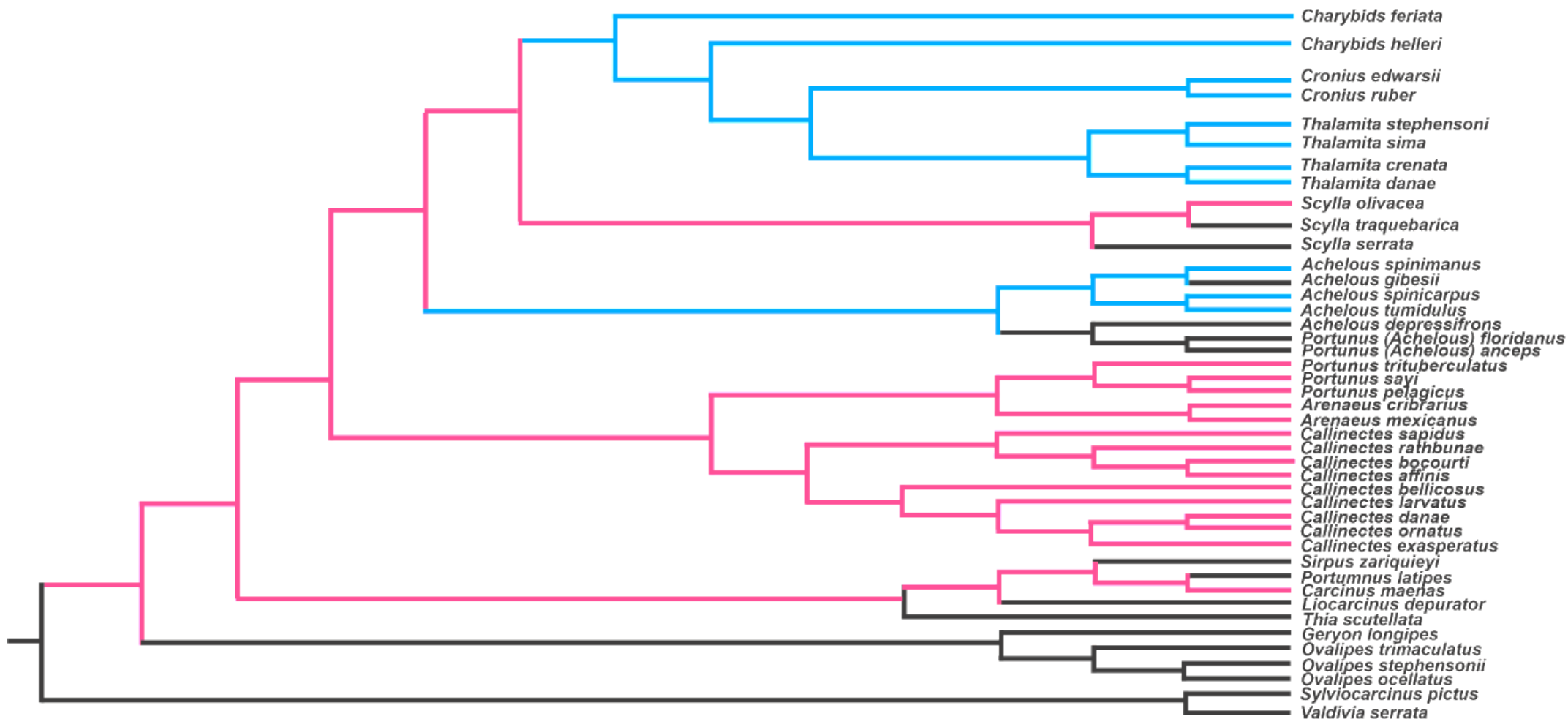


Figura 6. Diagrama de mapeamento do caráter morfológico 3: “Condição de cópula” traçado com base no filograma de Evans (2018). Estados de caráter: cópula rígida (intermuda) (1-Blue); cópula durante a muda (2-pink), Not described (Black).

Discussão

Os principais achados deste trabalho para as espécies *A. spinimanus*, *A. spinicarpus* e *Cr. ruber* tratam-se da: 1) a ausência de plug-espermático, 2) a presença de pacotes espermáticos (compostos por fluido seminal e espermatozoides livres), indicando fortemente que as fêmeas realizam a cópula em intermuda e possivelmente com mais de um macho, 3) RS do tipo ventral, que pela primeira vez foi descrito para Portunidae, que mantém a mesma organização anatômica e ultraestrutural durante todo o desenvolvimento ovariano.

O plug-espermático possui consistência rígida e funciona como uma barreira que bloqueia a cópula da fêmea com mais de um macho, sendo esta uma característica reprodutiva que anula a competição espermática (Hartnoll, 1969; Johnson, 1980; Wolcott et al., 2005; Parker, 1970) em diversos gêneros de Portunoidea, como *Carcinus*, *Ovalipes*, *Scylla*, *Callinectes*, *Portunus* e *Arenaeus* (Spalding, 1942; Ryan, 1967; Hartnoll, 1969; Johnson, 1980; Hinsch, 1986; Bawab & El-Sherief, 1988; Jayasankar & Subramonian, 1997; Zara et al., 2014; Assugeni et al., 2021). Nas espécies *A. spinicarpus*, *A. spinimanus* e *Cr. ruber* estudadas neste trabalho não foram encontradas evidências de plug-espermático. Desta maneira, os resultados aqui apresentados diferem muito das descrições anatômicas e histológicas já realizadas para Portunidae, até o momento. Hartnoll (1969) propôs que o plug-espermático é uma característica vestigial de braquiúros ancestrais que aderem os espermatóforos ao esterno da fêmea. No mapeamento deste caráter baseado em Evans (2018), nota-se que a formação de plug-espermático é a condição ancestral. Desta maneira, concordamos com a hipótese de Hartnoll, na qual a formação de plug-espermático é a característica ancestral para Portunoidea, enquanto, a formação de pacotes espermáticos é uma sinapomorfia para *A. spinicarpus* e *A. spinimanus* e provavelmente para os Thalamitinae que realizam esta estratégia. Desta maneira, é provável que os Thalamitinae como no caso de *Cr. ruber* e mais três espécies do gênero *Thalamita* (Norman, 1996; Norman et al., 1997, 1999), além de *Ch. longicollis* (Innocenti et al., 1998) e *Ch. japonica* (Baker et al., 2018), tenham selecionado este caráter de formação de pacotes espermáticos, bem como os *Achelous* aqui estudados. Assim, fica claro a coevolução entre os sistemas reprodutores masculinos e femininos de Portunidae formadores de plug-espermático, pois o macho investe todo seu potencial reprodutivo na produção do plug-espermático e a fêmea em dissolvê-lo (Assugeni et al., 2021).

Além disso, neste trabalho observamos que a presença de pacotes espermáticos no RS indica fortemente a que as fêmeas de *A. spinimanus*, *A. spinicarpus* e *Cr. ruber* parecem realizar a cópula em intermuda (carapaça rígida) e, talvez com mais de um macho como observado em

Thalamita e *Charybdis* (Norman, 1996; Norman et al., 1997, 1999; Innocenti et al., 1998; Backer et al., 2018). A ausência de plug-espermático, associado a cópula dura e presença de pacotes espermáticos também foi descrito também para Majoidea (Diesel, 1989, 1990; Benhalima & Moriyassu, 2000; Sainte-Marie et al., 2000; Sal Moyano et al., 2010), Inachoididae (Antunes et al., 2016, 2018) e em Trichodactylidae (Oliveira & Zara, 2018). Entretanto, nestas últimas espécies foi observado a presença de glândulas acessórias na transição entre a MVD e PVD ou apenas ao longo da PVD, o que parece contribuir com a formação dos pacotes espermáticos no RS (Diesel, 1989, 1990; Benhalima & Moriyassu, 2000; Sainte-Marie et al., 2000; Antunes et al., 2016, 2018; Oliveira & Zara, 2018). Contudo, tanto em Inachoididae como Trichodactylidae, a PVD é ausente de espermatóforos e a mistura das secreções da glândula acessórias e da PVD formam um gel que separa as massas espermáticas em estratos (Antunes et al., 2016, 2018). No Portunidae *Ch. japonica*, a PVD é ausente de espermatóforos (observado nas figuras, mas não descrito) com a presença de bolsas laterais, mas não possui glândulas acessórias e no RS das fêmeas, não foi observado pacotes espermáticos e nem plug-espermático (Wong & Swell, 2015; Baker et al., 2018). Assim, ao que parece, em Heterotremata, a produção de pacotes espermáticos é homoplásica, com uma característica em comum, ausência de material germinativo na PVD.

Assim, podemos propor que a presença de pacotes ou plug-espermáticos, está mais relacionado ao tipo de cópula realizado pelos Portunoidea, uma vez que as espécies que realizam cópula durante a muda também são formadoras de plug-espermático, como descrito para os Portunidae dos gêneros *Callinectes*, *Portunus* e *Arenaeus* e também o Carcinidae *Car. maenas* (Spalding, 1942; Ryan, 1967; Jivoff, 1997a, b; Zara et al., 2012; Zara et al., 2014; Assugeni et al., 2021). Em contraposição, as espécies que realizam a cópula em intermuda (rígida), podem ser formadoras de pacotes espermáticos, como observado neste trabalho, sendo pela primeira vez descrito em Portunidae, inclusive para espécies não relacionadas filogeneticamente, sendo este caráter homoplásico entre *Cr. ruber* e *A. spinimanus* e *A. spinicarpus*. Assim, propomos que as espécies de Portunidae, que também copulam em intermuda, como *Ch. longicollis*, *Ch. japonica*, *Thalamita*, tem grande probabilidade de serem formadores de pacotes espermáticos (Norman, 1996; Norman et al., 1997, 1999; Innocenti et al., 1998; Baker et al., 2018). Assim, nossa proposta está de acordo com proposto para *Ch. hellerii* (Watanabe et al., 2022). Além disso, já foram descritas espécies que não são formadores de plug-espermático e nem de pacotes espermáticos, porém, realizam a cópula durante a muda (carapaça mole) como foi descrito para *Ch. feriata* e *Ch. natator* (Sumpton, 1990;

Soundarapandian et al., 2013). Desta maneira, a condição de cópula durante a muda parece ser um caráter primitivo entre os Portunidae; entretanto, o gênero *Charybdis* se encontra em posição intermediária entre os estados primitivos e o derivado, uma vez que são descritas estas duas estratégias de cópula para este gênero. Os resultados do mapeamento dos caracteres referentes a cópula mostram que a condição ancestral trata-se da cópula mole, durante a muda. Assim, a característica derivada, cópula em intermuda (rígida) ocorre provavelmente nos demais Thalamitinae, além das espécies aqui descritas: *Cr. ruber* e também nos Portuninae *A. spinimanus*, *A. spinicarpus* e *A. tumidulus*, sendo assim, esta a homoplasia dos *Achelous spp.* em relação aos demais Portunidae.

No RS de *A. spinimanus*, *A. spinicarpus* e *Cronius ruber* a conexão do oviduto com o receptáculo seminal ocorre na região mesodérmica, próximo a transição entre a região dorsal e ventral, assim, caracterizando o RS como ventral. Esta morfologia difere do padrão mais comumente encontrado em Portunoidea, que é majoritariamente dorsal (McLay & López-Greco, 2011; Zara et al., 2014; Antunes et al., 2016; Assugeni et al., 2021). O tipo ventral de RS é comum em espécies de Majoidea, Cancridae, Calappidae, Geryonidae, Leucosiidae, Parthenopidae, Parathelphusidae, Corystidae, Ocypodidae, Oregoniidae, Hymenosomatidae, Pinnotheridae, Ocypodidae, Ucididae e Sesarmidae (Diesel, 1989, 1990, 1991; López-Greco et al., 2009; McLay & Loopez Greco 2011, Antunes et al., 2016; Kienbaum et al., 2017). Nas espécies de Portunidae formadoras de plug-espermático, como *C. danae*, *Ar. cribrarius* e *P. sanguinolentus* (Ryan, 1967b; Zara et al., 2014; Assugeni et al., 2021) ocorre uma modificação morfológica importante no RS, durante o desenvolvimento ovariano, e caso, estas alterações não sejam levadas em consideração podem levar a uma interpretação errônea sobre o tipo de RS. Além disso, a histologia também já demonstrou ser crucial para este tipo de classificação, já que a região ventral pode se estender ventralmente, criando a impressão do tipo intermediário de RS, uma vez que, causando uma classificação errada principalmente no caso de espécies de Portunidae, nos quais ocorrem esta modificação morfológica. Macroscopicamente, o RS em *C. danae* pode causar uma interpretação incorreta, como realizada em *Callinectes bocourti* (Souza et al., 2017). Isto está relacionado ao momento em que o plug-espermático começa a se dissolver e o RS vai se tornando mais flácido e parece se tornar do tipo ventral, mas quando a mesma análise é realizada histologicamente, percebe-se que o RS é do tipo dorsal em todos os estágios ovarianos, pois apesar destas modificações morfológicas, o oviduto sempre encontra-se em região oposta a vagina, durante todo o desenvolvimento ovariano (Assugeni et al., 2021).

Na conexão do RS, o oviduto está preenchido por células com núcleos ovais que formam um tampão na região de abertura do oviduto. Este tipo de tampão celular lipídico foi descrito para *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788) e lembra o padrão registrado para *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853 (Lee & Yamazaki, 1990; Antunes et al., 2016). Este tampão parece funcionar de maneira semelhante ao proposto para os Pinnotheridae onde as secreções seriam liberadas no momento da ovulação (Becker et al., 2011). Desta maneira, a liberação da secreção abriria o canal do oviduto e, ao mesmo tempo funcionaria como uma barreira que previne a entrada dos espermatozoides no oviduto, similar ao que foi descrito para *C. danae* (Assugeni et al., 2021). Para Pinnotheridae as células desta região liberariam sua secreção de forma holócrina (Becker et al., 2011), porém neste trabalho nos parece ser mais razoável que o mecanismo seja apócrino, sendo o restante das células necessário para a manutenção do contato do oviduto ao receptáculo, o que poderia desaparecer caso a célula como um todo fosse descamada.

Em Brachyura, o receptáculo seminal é dividido em região dorsal e ventral (Diesel et al., 1989; López-Greco et al., 2009). Becker et al. (2011) sugere que a região dorsal localizada no ápice do receptáculo seminal é utilizada como área de armazenamento dos espermatozoides e a área ventral é chamada de área de fertilização, com a vagina adjacente. A parte dorsal do RS em Portunidae forma um epitélio estratificado e glandular, com células sendo liberadas por mecanismo holócrino, sendo este o padrão descrito também para outras de espécies Portunidae (Spalding, 1942; Ryan, 1967; Zara et al., 2014; Souza et al., 2016), majóideos (Hartonoll, 1968; Beninger et al., 1998; González Gurriarán et al., 1998; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1998; González-Pisani & López Greco, 2007; Sal Moyano et al., 2009; González-Pisani, 2012), Leucosiidae (Hayer et al., 2015) e Eriphidae (Souza et al., 2016). Em contraposição, o epitélio dorsal do RS pode ser simples como descrito para Menippidae (Souza et al., 2016); Ocypodidae (López-Greco et al., 2009; Lautenschlager et al., 2010; Souza et al., 2016), Pinnotheridae (Becker et al., 2011), Varunidae (Lee & Yamazaki, 1990) e Grapsidae (Souza et al., 2016). Assim, ao que parece, as famílias mais próximas filogeneticamente apresentam o mesmo tipo de epitélio dorsal, sendo o estratificado uma sinapomorfia para Portunoidea.

Nos pacotes espermáticos encontrados no RS de *Achelous* e *Cronius ruber* foram observados somente espermatozoides livres, este mesmo padrão foi observado nos RS de fêmeas maduras de Majoidea (Inachoididae), como o formador de pacotes espermáticos *S. seticornis* (Antunes et al., 2016) e também para os Mithracidae que misturam todo o material genético de um ou mais machos no RS (Assugeni & Zara, 2022). Assim, corroboramos a

proposição dos últimos autores de que os espermatóforos sofrem deiscência, logo após o acasalamento, sendo armazenados livres no RS. Entretanto, esta característica se difere no RS dos Portunidae formadores de plug-espermático, nos quais é comum a presença de espermatozoides ainda com parede no interior do RS, que se dissolvem com o auxílio da secreção desta estrutura em sincronia ao desenvolvimento ovariano (Zara et al., 2014; Assugeni et al., 2021).

Em conclusão, o sistema reprodutor feminino de *Achelous* e *Cronius* mostra pela primeira vez um padrão diferente de armazenamento espermático para Portunoidea, com RS do tipo ventral, formação de pacotes espermáticos e cópula rígida, o que difere totalmente dos resultados já descritos para a maioria dos Portunidae. Assim, os animais formadores de plug-espermático, com cópula durante a muda (mole) e RS do tipo dorsal representam a condição ancestral de Portunoidea. Desta maneira, podemos considerar este novo padrão de armazenamento espermático pela formação de pacotes espermáticos uma condição derivada e apomórfica em Portunoidea e demonstra a ocorrência de competição espermática nesta superfamília. Assim, o último macho que copulou tem prioridade na fertilização dos ovócitos, e a competição espermática parece ser uma apomorfia em Heterotremata ocorrendo de maneira independente em caranguejos aranha Inachoididae (Diesel, 1989, Antunes et al., 2016) e caranguejos de água doce Trichodactylidae (Oliveira & Zara, 2018).

Referências

- Antunes, M.; Zara, F. J.; López-Greco, L. S. & Negreiros-Fransozo, M. L., 2016. Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea. *Invertebrate Biology*, 135, 75-86.
- Antunes, M.; Zara, F. J.; López-Greco, L. S. & Negreiros-Fransozo, M. L., 2018. Male reproductive system of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* (Inachoididae). *Invertebrate Biology*, 137, 171-184.
- Assugeni, C.O.; Toyama, M.H.; Zara, F.J., 2021. From sperm plug formation to ovulation: morphological and ultrastructural modifications in the seminal receptacle of the blue crab *Callinectes danae*. *Zoologische Anzeiger*, 291, 45-60.
- Assugeni, C.O.; Zara, F.J., 2022. Functional morphology of the seminal receptacle of *Mithrax*, *Mithraculus* and *Omalacantha* spider crabs (Brachiura: Mithracidae). *Tissue and Cell*, 76, 101-806.
- Baker, C.F.; Gublin, Y.; Reeve, K.A., 2018. Observations of hard-shell mating in the portunid crab *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards, 1861) (Decapoda: Brachyura). *Journal of Crustacean Biology*, 38, 504-508.
- Bawab, F.M. & El-Sherief, S.S., 1988. Stages of the reproductive cycle of the female crab *Portunus pelagicus* (L., 1758) based on the anatomical changes of the spermatheca (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Crustaceana* 54, 139-148.
- Becker, C.; Bradis, D.; Storch V., 2011. Morphology of the female reproductive system of European pea crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae). *Journal of Morphology*, 272, 12-26.
- Benhalima, K. & Moriyasu, M., 2000. Structure and function of the posterior vas deferens of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 37, 11-23.
- Beninger, P. G.; Elnor, R. W.; Foyle, T. P.; Odense, P. H., 1988. Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermathecae in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *Journal of Crustacean Biology*, 8, 322-332
- Beninger, P.G.; Lanteigne, C.; Elnor, R.W., 1993. Reproductive processes revealed by spermatophore dehiscence experiments and by histology, ultrastructure, and histochemistry of the female reproductive system in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). *Journal of Crustacean Biology* 13, 1-16.
- Diesel, R., 1989. Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage and spawning. *Journal of Crustacean Biology*, 9, 266-277.
- Diesel, R., 1990. Sperm competition and reproductive success in the decapod *Inachus phalangium* (Majidae) - a male ghost spider crab that seals off rivals sperm. *Journal of Zoology* 220, 213-223.
- Diesel, R., 1991. Sperm competition and mating behavior in Brachyura. In R. T. Bauer & J. W. Martin (Eds.), *Crustacean sexual biology* (pp. 145-163). New York, NY: Columbia University Press.
- Edwards, E., 1966. Mating behavior in the European edible crab (*Cancer pagurus* L.). *Crustaceana* 10, 23-30.
- Evans, N., 2018. Molecular phylogenetics of swimming crabs (Portunoidea Rafinesque, 1815) supports a revised family-level classification and suggests a single derived origin of symbiotic taxa. *PeerJ*, 6, 42-60.
- González-Gurriaran, E.; Fernandez, L.; Muino, R., 1998. Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 220, 269-285.

- González-Pisani, X.; Lopez-Greco, L.S., 2007. Estructura de la espermateca del cangrejo araña *Leurocyclus tuberculatus* (Majoidea). In: Proceedings of the XII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, 14-17. Florianopolis, Brasil.
- Gonzalez-Pisani, X.; Baron, P.; López-Greco, L.S., 2012. Functional anatomy of the female reproductive systems of two spider crabs (Decapoda, Majoidea). *Invertebrate Biology*, 131, 61-74.
- Guinot, D. & Quenette, G., 2005. The spermatheca in Podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implications. *Zoosystema*, 27, 267-342.
- Hartnoll, R. G., 1969. Mating in Brachyura. *Crustaceana*, 16, 161-181.
- Hayer, S.; Schubart, C.D.; Brandis, D., 2015. Morphology and Function of the Female Reproductive System of *Ebalia tumefacta* (Decapoda, Brachyura, Leucosiidae). *Journal of Morphology*, 276, 517-525.
- Hayer, S.; Köhnka, S.; Boretiusb, S.; Dirk, B., 2016. Ever more complex: a new type of organization of reproductive organs in female *Dorippe sinica* Chen, 1980 (Decapoda: Brachyura: Dorippidae). *Zoology*.
- Hinsch, G.W., 1986. A comparison of sperm morphologies, transfer and sperm mass storage between two species of crab, *Ovalipes ocellatus* and *Libinia emarginata*. *Internacional Journal of Invertebrate Reproduction & Development*, 10, 79-87.
- Innocenti, G.; Vannini, M.; Galil, B.S., 1998. Notes on the behavior of the portunid crab *Charybdis longicollis* Leene parasitized by rhizocephalan *Heterosaccus dollfusi* Boschma. *Journal of Natural History*, 32, 1577-1585.
- Jayasankar, V.; Subramoniam, T., 1997. Proteolytic activity in the seminal plasma of the mud crab, *Scylla serrata* (Forsk.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, B. 116, 347-352.
- Jivoff, P., 1997a. The relative roles of predation and sperm competition on the duration of the post-copulatory association between the sexes in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 40, 175-185.
- Jivoff, P., 1997b. Sexual competition among male blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biology Bulletin*, 193, 368-380.
- Johnson, P. T., 1980. *Histology of the blue crab (Callinectes sapidus): A model for the Decapoda* New York, NY: Praeger Scientific, 440.
- Junqueira, L. C. U., & Junqueira, L. M. M. S., 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. São Paulo, Brazil: Ed Santos. (Eds.)
- Lautenschlager, A.; Brandis, D.; Storch, V., 2010. Morphology and function of the reproductive system of representatives of the genus *Uca*. *Journal of Morphology*, 271, 1281-1299.
- Lee, T.H. & Yamazaki, F., 1990. Structure and function of a special tissue in the female genital ducts of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis*. *The Biological Bulletin*, 178, 94-100.
- Li, T.W., 1995. On spermatogenesis and sperm ultrastructure of blue crab *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda). *Acta Zoologica Sinica* 41, 41-46.
- López-Greco, L.S.; Lopez, G.C.; Rodríguez, E.M., 1999. Morphology of spermatheca in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Graspidae, Sesarminae). *Journal of Zoology*, 249, 490-493.
- López-Greco, L. S.; Fransozo, V.; Negreiros-Fransozo, M.L.; Santos, D.C., 2009. Comparative morphology of the seminal receptacles of *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) (Brachyura, Ocypodoidea). *Zootaxa*, 2106, 41-50.

- Mantelatto, F.L.; Robles, R.; Schubart, C.D.; Felder, D.L., 2009. Molecular phylogeny of the genus *Cronius* Stimpson, 1860, with reassignment of *C. tumidulus* and several American species of *Portunus* to genus *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae). In: Martin, J.W., Crandall, K.A., Felder, D.L. (Eds.), Crustacean Issues: Decapod Crustacean Phylogenetics. CRC Press, Boca Raton, 567-579.
- Mello, M. L. S. & Vidal, B. C., 1980. Práticas de Biologia Celular. São Paulo, Brazil: Edgar Blucher – FUNCAMP.
- Melo, G. A. S., 1996. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Plêiade, São Paulo.
- McLay, C.L.; López-Greco, L.S., 2011. A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: how did a race to be first become a race to be last? Zoologische Anzeiger, 250, 378-406.
- Ng, P. K. L.; Guinót, D.; Davie, P. J. F., 2008. Systema Brachyurorum: Part I. an annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. The Raffles Bulletin of Zoology, 17, 1-286.
- Norman, C.P., 1996. Reproductive biology and evidence for hard-female mating in the brachyuran crab *Thalamita sima* (Portunidae). Journal of Crustacean Biology, 16, 656-662.
- Norman, C.P.; Hirano, Y.J.; Miyazaki, T., 1997. Hard-female mating in the brachyuran crab *Thalamita prymna* (Portunidae). Crustacean Research 26, 62-69.
- Norman, C.P.; Nuka, T.; Miyazaki, T., 1999. Mating behavior in *Thalamita picta* (Brachyura: Portunidae) and comparisons with congeneric species. Crustacean Research 28, 16-23.
- Oliveira, L.J.F.; Zara, F.J., 2018. An investigation into the male reproductive system of two freshwater crabs from the Amazon: is there a sperm plug or packet formation? Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 51, 227-249.
- Pardo, L. M.; Riveros, M.; Fuentes, J. P.; López-Greco, L., 2014. Functional morphology of the seminal receptacle in the crab *Metacarcinus edwardsii*. Invertebrate Biology, 132, 386-393.
- Parker, G.A. 1970., Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Biological Reviews, 45, 525-567.
- Ryan, E. P. 1967., Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* Herbst (Brachyura: Portunidae). I. The male system. Proceedings of the Symposium on Crustacea at Erkulán, Índia, 1965. Part II. Symposium, Series 2, 522-544.
- Sant'Anna, B.S.; Pinheiro, M.A.A.; Mataqueiro, M.; Zara, F.J., 2007. Spermathecae of the mangrove crab *Ucides cordatus*: a histological and histochemical view. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 87, 903-911.
- Sainte-Marie, G. & Sainte-Marie, B., 1998. Morphology of the spermathecal, oviduct, intermediate chamber, and vagina of the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). Canadian Journal of Zoology, 76, 1589-1604.
- Sainte-Marie, G.; Sainte-Marie, B.; Sévigny, J. M., 2000. Ejaculate storage patterns and the site of fertilization in female snow crabs (*Chionoecetes opilio*; Brachyura, Majidae). Canadian Journal of Zoology, 78, 1902-1917.
- Sal Moyano, M.P.; Gavio, M.A.; Cuartas, E.I., 2009. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. Helgoland Marine Research, 64, 213-221.

- Souza, L.P.; Ogawa, C.Y.; Silva, J.R.F.; Camargo-Mathias, M.I., 2017. Comparative morphology of the female genital ducts of seven eubranchyuran crabs (Saint Laurent, 1980). *Acta Zoologica* (Stockholm), 98, 125-135.
- Spalding, J.F., 1942. The nature and formation of the spermatophores and sperm plug *Carcinus maenas*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 83, 399-422.
- Spiridonov, V.A.; Neretina, T.V.; Schepetov, D., 2014. Morphological characterization and molecular phylogeny of Portunoidea Rafinesque, 1815 (Crustacea Brachyura): implications for understanding evolution of swimming capacity and revision of the family-level classification. *Zoologische Anzeiger*, 253, 404-429
- Soundarapandian, P., Ilavarasan, N., Varadharajan, D., 2013. Embryonic development of commercially important Portunid crab *Charybdis feriata* (Linnaeus). *Journal of Marine Science: Research and Development*, 122.
- Sumpton, W., 1990. Biology of the rock crab *Charybdis natator* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). *Bulletin of Marine Science*, 46, 425-431.
- Vehof, J.; Scholtz, G.; Becker, C., 2017. Morphology of the female reproductive system of three dorippid crabs (Crustacea; Decapoda; Brachyura; Dorippidae) and the role of accessory cuticle structures associated with seminal receptacles. *Invertebrate Biology*, 136, 271-289.
- Wang, Y.; Zhang, Z.; Li, S., 1997. Ultrastructure of spermatogenesis in the crab *Scylla serrata*. *Acta Zoologica Sinica* 43, 249-254.
- Wolcott, D. L.; Hopkins, C. W. B.; Wolcott, T. G., 2005. Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun: effects of male mating history, male size and season. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 319, 43-55.
- Wong, N.A.; Sewell, M.A., 2015. The reproductive ecology of the invasive Asian paddle crab, *Charybdis japonica* (Brachyura: Portunidae), in northeastern New Zealand. *Invertebrate Biology*, 134, 303-317.
- Zara, F. J.; Toyama, M. H.; Caetano, F. H.; López-Greco, L. S., 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology* 32, 249-262.
- Zara, F.J., Pereira, G.R., Sant'Anna, B.S., 2014. Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius*. *Biology Bulletin*, 227, 19-32.

Considerações Finais

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

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

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

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

Apêndice 1



Research paper

From sperm plug formation to ovulation: Morphological and ultrastructural modifications in the seminal receptacle of the blue crab *Callinectes danae*



Camila O. Assugeni^{a, c, *}, Marcos H. Toyama^b, Fernando J. Zara^{a, c}

^a Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML), Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária and CAUNESP, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, S/N, 14884-900, Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brazil

^b Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Do Litoral Paulista, Praça Infante Don Henrique S/N, 11330-900, São Vicente, Estado de São Paulo, Brazil

^c Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 13506-900, Rio Claro, Estado de São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2019

Received in revised form

22 January 2021

Accepted 1 February 2021

Available online 9 February 2021

Keywords:

Females

Ovarian development

Oviduct

Seminal fluid

Spermatozoon

Storage

ABSTRACT

In species of *Callinectes* a sperm plug is formed in the seminal receptacle (SR) during the sperm transfer, which hinders the insemination by other males. In this study, we evaluated the morphology, histochemistry, and ultrastructure of the seminal receptacle of juvenile and adult females of *Callinectes danae* along the different stages of ovarian development. We described the histochemical changes that take place inside the SR, from the sperm plug formation until fertilization. We also quantified the amount of seminal fluid received by the females during copulation. *C. danae* has a dorsal-type SR, which is common in Portunidae. The sperm plug is formed by the orderly deposition of seminal fluid of the anterior and median vas deferens, which in turn influences the secretion of the posterior region and produces chemically distinct strata. The dissolution of the sperm plug inside the SR occurs in synchrony with the spermatophore dehiscence and ovarian development. A holocrine secretion from dense layer cells dissolves the sperm plug. These cells have electron-dense and electron-lucid vesicles. The plug is completely dissolved when the females are at the intermediary ovarian development. At this stage, the SR dense layer folds and forms the lateral chamber. The dorsal oviduct, continuous to the dense layer, moves to a ventral-lateral position opposed to the vagina. During ovulation, the oocytes of mature females pass through the oviduct and the fertilization occurs almost above the vagina. The male ejaculates all its seminal fluid in a single copulation, leading to a total sperm depletion. Therefore, the whole sperm plug is produced by the males, through the combined secretions from three vas deferens regions. We show, for the first time, that the secretions from the anterior vas deferens also participate in the sperm plug formation. The female dissolves the plug, which is a crucial morphological change of the SR during the processes of fertilization and egg release. In species of *Callinectes* there was a clear co-evolution between the male and female reproductive systems: the male invests all its reproductive potential to build the sperm plug, and the female, to dissolve it.

© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Disponível para acesso em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044523121000140>