

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS DE BOTUCATU
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

Tese de Doutorado

**Efeito da ablação do pedúnculo ocular no desenvolvimento
ovariano e reprodução de *Macrobrachium acanthurus*
(Caridea: Palaemonidae).**

Maria Maschio Rodrigues

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Bertini

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Laura S. López Greco



BOTUCATU

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS DE BOTUCATU
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

**Efeito da ablação do pedúnculo ocular no desenvolvimento
ovariano e reprodução de *Macrobrachium acanthurus*
(Caridea: Palaemonidae).**

Maria Maschio Rodrigues

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Bertini

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Laura S. López Greco

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Zoologia).

BOTUCATU

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rodrigues, Maria Maschio.

Efeito da ablação do pedúnculo ocular no desenvolvimento ovariano e reprodução de *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) / Maria Maschio Rodrigues. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Giovana Bertini

Coorientador: Laura S. López Greco

Capes: 20400004

1. Camarão. 2. *Macrobrachium*. 3. Fecundidade.
4. Técnicas de Ablação. 5. Vitelogênese.

Palavras-chave: Camarão-canela; Complexo órgão-X/glândula do seio; Fecundidade; Fertilidade; Vitelogênese.

“Camarão que dorme a onda leva...”

Zeca Pagodinho/Beto Sem Braço/Arlindo Cruz

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos espíritos superiores, por me protegerem e guiarem.

À Prof^a Dra Giovana Bertini, pela orientação e amizade. Obrigada por ter me apresentado em 2005 os camarões e o mundo acadêmico e, ainda, por ter confiado em mim novamente no doutorado. Agradeço pelas condições oferecidas para a realização dos experimentos, pelos ensinamentos e, também, por me mostrar caminhos diante dos problemas encontrados durante a tese. Obrigada pela preocupação e cuidado já na graduação, desde lá sei que ganhei uma grande amiga.

À Prof^a Dra. Laura S. López Greco, pela amizade, coorientação, disposição em ensinar, discutir e contribuir para o desenvolvimento da tese. Muito obrigada por ter sido tão presente, mesmo de longe.

Ao IFES - Instituto Federal do Espírito Santo (Campus Piúma) por todo apoio e por conceder o afastamento de 3 anos para a realização deste doutorado.

À Universidade Estadual Paulista - Campus de Registro e ao LABCRUST, pela infraestrutura e suporte técnico para realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu pelas facilidades oferecidas.

À UFES - Universidade Federal do Espírito Santo (Campus de Alegre) e ao Laboratório de Morfologia Animal, pela estrutura e apoio técnico para a elaboração das lâminas histológicas.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Ferreira De Almeida, por ter me ajudado com estatística e pelos bate-papos nos cafés da tarde.

Aos técnicos da Unesp Registro, Alexis Takeshita de Oliveira e Márcio Alves dos Santos, pelo suporte na montagem e manutenção dos sistemas de recirculação de água dos tanques. A ajuda de vocês foi essencial!

Às professoras Dra. Adriane A. Braga e Dra. Erika Takagi Nunes, pela amizade e todo apoio para realização da parte histológica na UFES. E ainda, agradeço à Dri pelo acolhimento em sua casa.

Aos professores Dra. Daniela Carvalho dos Santos e Dr. Fernando Zara, membros da banca examinadora da qualificação. Aos professores doutores Adilson Fransozo, Daniela Carvalho dos Santos, Karina Ribeiro e Luciene Patrici Papa, membros da banca examinadora da defesa de doutorado. Muito obrigada por terem aceitado o convite e pelas contribuições dadas para a melhoria desta tese.

Aos amigos e colegas do LABCRUST (Crislene, Jeniffer, Kelly, Karyna e Victor), pela agradável convivência e também pela eventual ajuda com os manejos dos animais. Em particular à Karyna, obrigada pelo auxílio com os desenhos das antênulas heteromórficas.

Aos amigos e colegas da UFES (Lucas, Marina e Viviane) pela companhia e momentos de descontração. Um agradecimento especial à Marina e Vivi, que com muita paciência me orientaram no preparo das lâminas histológicas.

Aos amigos do Laboratório de Biomoléculas da Unesp-Registro (Camila, Clau, Isis e Liege), pela amizade e por serem ótimas companhias de cervejinha, karaokê e comilança.

Aos colegas do Laboratório de Biología de la Reproducción y el Crecimiento de Crustáceos Decápodos da Universidade de Buenos Aires (Agustina, Amir, Anita, Carolina, Daniela e Lia), que me receberam no laboratório com muita gentileza e carinho. E, principalmente, à Daniela, pela ajuda com parte da estatística. *Muchas gracias!*

À família Bertini-França, por terem sido tão acolhedores e queridos. Muito obrigada pelos almoços, churrascos e companhia nos fins de semana!

Às queridas amigas Vastil e Consuelo, por serem grandes parceiras enquanto estive em Registro. Obrigada por toda a diversão e carinho! Um agradecimento especial para a Consul, por tamanha hospitalidade.

Aos amigos Diego e Carmem, que me receberam em Botucatu com tanta atenção e carinho.

Aos amigos de Piúma, por saber que posso contar com vocês, e ainda, pela ajuda cuidando da Mandala e das plantinhas, quando precisamos estar fora. Um agradecimento especial à minha comadre, Dayse, que sempre esteve disposta a me ouvir e me aconselhar em todos os momentos.

A todos os meus amigos que estão espalhados pelo Brasil e pelo mundo que me encorajaram e incentivaram em mais essa etapa da minha vida.

Aos meus familiares, pelas conversas, apoio e confraternizações nas paradas em São Paulo e Barrinha, antes de ir pra Registro.

Aos meus pais Fernando e Cleuza, principalmente, à minha mãe que sempre me apoiou e proporcionou condições para que eu alcançasse os meus objetivos. Você é meu maior exemplo de força e coragem!

Aos meus sobrinhos e afilhados (Matheus, Diego, Manu, Fernanda, Francisco e Cecília), pelo amor puro e doce. E ainda por todos os momentos e brincadeiras juntos. Vocês são uma injeção de alegria!

À minha “doguinha” Mandala, por ficar literalmente ao meu lado e ser a melhor companhia que poderia ter durante a escrita deste trabalho.

Ao meu parceiro de vida Fabricio, a quem dedico esse trabalho. Agradeço pela contribuição nas discussões dos artigos, compreensão durante os longos meses que estive fora, leveza do dia-a-dia, apoio incondicional e companheirismo. Obrigada pelo incentivo e por me acalmar quando eu achei que não ia conseguir. Que sorte a minha ter você nesta caminhada! Amo você!

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO I.....	20
The impact of eyestalk ablation on ovarian development in cinnamon river prawn <i>Macrobrachium acanthurus</i> .	
1. ABSTRACT	21
2. INTRODUCTION	22
3. MATERIAL AND METHODS	24
3.1. Collection and acclimatisation	24
3.2. Experimental conditions, selection of females and ablation	24
3.3. Microscopic analyses	26
3.4. Statistical analyses	27
4. RESULTS	28
4.1. Survival, nuptial moulting and spawning.....	28
4.2. Ovarian development	28
5. DISCUSSION	42
6. REFERENCES	46
CAPÍTULO II.....	52
Desempenho reprodutivo em fêmeas de <i>Macrobrachium acanthurus</i> (Crustacea, Palaemonidae) submetidas à ablação unilateral do pedúnculo ocular.	
1. RESUMO.....	53
2. INTRODUÇÃO	54
3. MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1. Coleta de <i>M. acanthurus</i>	57
3.2. Manutenção dos animais, ablação e maturação dos ovários	57
3.3. Reprodução para obtenção de fêmeas ovígeras.....	58
3.4. Análise da fecundidade e fertilidade.....	59
3.5. Análises estatísticas	60
4. RESULTADOS	61

4.1.	Comprimento da carapaça das fêmeas.....	61
4.2.	Fêmeas com ovos e larvas viáveis.....	61
4.3.	Fecundidade e volume dos ovos.....	61
4.4.	Fertilidade e comprimento da carapaça das larvas	62
4.5.	Duração do desenvolvimento embrionário	62
4.6.	Embriões perdidos.....	62
5.	DISCUSSÃO	65
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO III		78
First reported occurrence of a heteromorph antennule in the freshwater prawn <i>Macrobrachium acanthurus</i> (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Caridea).		
REFERENCES		86
CONSIDERAÇÕES FINAIS		88

Macrobrachium acanthurus é uma espécie de camarão de grande interesse econômico encontrada nos estuários brasileiros, porém ainda não há tecnologia para seu cultivo. A técnica de ablação do pedúnculo ocular é comumente utilizada na carcinicultura marinha, mas pouco se sabe sobre seus efeitos em camarões de água doce. Desta forma, essa tese tem por finalidade avaliar o efeito da ablação unilateral do pedúnculo ocular no desenvolvimento ovariano e reprodução de *M. acanthurus* (Caridea: Palaemonidae), visando aprimorar a tecnologia de criação dessa espécie. Foram realizados diferentes experimentos e a tese foi dividida em três capítulos. As fêmeas sexualmente maduras foram coletadas no Rio Ribeira de Iguape-SP, separadas de acordo com o estágio de desenvolvimento gonadal e submetidas à técnica de ablação ocular. No primeiro capítulo foram efetuadas análises histológicas e histoquímicas para acompanhar ao longo do tempo o desenvolvimento dos ovários de fêmeas nos estágios pré e pós-desova. No segundo, foi verificado o efeito da ablação das fêmeas no desempenho reprodutivo. E o terceiro reportou, pela primeira vez, a ocorrência de antênula heteromórfica em *M. acanthurus*. Com as análises histológicas e histoquímicas não foi possível detectar diferença no desenvolvimento dos oócitos de fêmeas abladas e intactas em estágio pré e pós-desova, indicando que a ablação não acelerou a maturação gonadal desta espécie. No entanto, o desempenho reprodutivo das fêmeas abladas foi inferior ao das intactas quanto à proporção de fêmeas com ovos/larvas viáveis, fecundidade, fertilidade, perda de embriões e tamanho das larvas. Observou-se ainda que a retirada do pedúnculo ocular em fêmeas e machos resultou na regeneração de apêndices semelhantes à antênulas no local da incisão. Os resultados desse trabalho contribuem com a pesquisa sobre o uso da técnica de ablação do pedúnculo ocular em camarões carídeos, agregando conhecimento para o desenvolvimento de futuros pacotes tecnológicos de *M. acanthurus*.

Palavras-chave: Camarão-canela; Complexo órgão-X/glândula do seio; Vitelogênese; Fecundidade; Fertilidade; Cativoiro.

Macrobrachium acanthurus is a shrimp species of great economic interest found in Brazilian estuaries, however there is no technology for its cultivation yet. The ocular peduncle ablation technique is commonly used in marine shrimp farming, but little is known about its effects on freshwater shrimp. Thus, this thesis aims to evaluate the effect of unilateral ocular peduncle ablation on ovarian development and reproduction of *M. acanthurus* (Caridea: Palaemonidae), aiming to improve the breeding technology of this species. Different experiments were performed and the thesis was divided into three chapters. Sexually mature females were collected in the Ribeira de Iguape River-SP, separated according to the stage of gonadal development and submitted to ocular ablation technique. In the first chapter, histological and histochemical analyzes were performed to monitor over time the development of female ovaries in the pre and post spawning stages. In the second, it was verified the effect of female ablation on reproductive performance. And the third reported, for the first time, the occurrence of heteromorphic antenna in *M. acanthurus*. Histological and histochemical analyzes showed no difference in the development of intact and ablated females oocytes in pre- and post-spawning stages, indicating that ablation did not accelerate the gonadal maturation of this species. However, the reproductive performance of ablated females was lower than intact females in the proportion of females with viable eggs/larvae, fecundity, fertility, embryo loss and larval size. It was also observed that the removal of the ocular peduncle in females and males resulted in the regeneration of antennule-like appendages at the incision site. The results of this work contribute to the research on the use of the ocular peduncle ablation technique in caridean shrimps, adding knowledge for the development of future *M. acanthurus* technology packages.

Keywords: Cinnamon river prawn; Organ-X/sinus gland complex; Vitellogenesis; Fecundity; Fertility; Captivity.

Entre todos os grupos de animais ou plantas, nenhum deles apresenta uma variedade morfológica tão grande quanto a dos crustáceos existentes (Martin & Davis, 2001). Dentro do subfilo Crustacea, a ordem Decapoda destaca-se por apresentar a maior diversidade de espécies (De Grave et al., 2009; De Grave & Fransen, 2011), contendo organismos muito populares pelo seu interesse econômico, como camarões, lagostas e caranguejos (Brusca & Brusca, 2007).

Dentre os crustáceos decápodos, estão os camarões carídeos (Infraordem Caridea) (Martin & Davis, 2001). Uma das características dos camarões carídeos, que permite seu fácil reconhecimento, é a expansão da pleura do segundo segmento abdominal recobrando a pleura do primeiro e terceiro segmentos, sendo mais larga em fêmeas, para a incubação dos ovos que ficam aderidos aos pleópodos até a eclosão larval (Bauer, 2004). São encontrados em todas as latitudes, desde as regiões tropicais até as polares, em substratos consolidados e não consolidados, com representantes em diversos habitats (Bauer, 2004).

A maioria dos camarões carídeos são marinhos (De Grave et al., 2009), porém existe um número relativamente grande de espécies que colonizaram ambientes de água doce (New & Singholka, 1982). Entre estas espécies, algumas apresentam comportamento migratório do ambiente de água doce para o marinho, sendo denominadas de anfídromas (Bauer, 2011; 2013). Nestas espécies, as fêmeas desovam em água doce e produzem muitos ovos pequenos, o período larval é longo e as larvas eclodem em uma fase inicial (zoea) e migram da água doce para a salobra para completar o desenvolvimento, e, após a metamorfose, os juvenis migram rio acima para se integrarem aos adultos (Bauer, 2011; Oliver et al., 2013; Novak et al., 2017). Em outras espécies, a transição do ambiente marinho para o dulcícola é completo e todo ciclo de vida ocorre na água doce, as fêmeas produzem ovos grandes e o desenvolvimento larval é abreviado (Bauer & Delahoussaye, 2008; Bauer, 2011; 2013).

Os camarões carídeos de água doce compreendem aproximadamente 25% de todos os Caridea descritos, numericamente dominada pelos Atyidae e Palaemonidae. A família Palaemonidae possui o maior número de espécies dentre os carídeos (De Grave & Fransen, 2011) e, de modo geral, no território brasileiro,

apresentam aspectos populacionais e reprodutivos similares, porém, existem algumas variações entre os gêneros (Mantelatto et al., 2016). Contudo, a maioria das informações biológicas é centrada em publicações dos representantes dos gêneros *Macrobrachium* Spence Bate, 1861 e *Palaemon* Weber, 1795, devido à diversidade, abundância ou interesse comercial (Mantelatto et al., 2016).

Camarões do gênero *Macrobrachium* são importantes membros dos sistemas de água doce e estuarino (Munansinghe, 2010). Possuem grande diversidade, apresentando mais de 240 espécies descritas em todo o mundo (De Grave & Fransen, 2011). Nas Américas, possui 55 espécies reconhecidas, das quais 17 estão distribuídas no Brasil em bacias do interior, litoral e na Amazônia (Pileggi & Mantelatto, 2010). Encontram-se associados à vegetação marginal submersa, em plantas aquáticas, sob ou entre rochas, cascalhos, raízes e/ou serrapilheira no leito dos cursos d'água (Mantelatto et al., 2016). Esse grupo de animais é conhecido por possuir o segundo par de pereopódos mais desenvolvido do que os outros apêndices torácicos, além de serem quelados (Bauer, 2004). Muitas espécies deste gênero apresentam grande importância econômica, pois são utilizadas como alimento e são consideradas boa fonte de proteína animal devido à qualidade da carne (Reis et al., 2004), além de apresentar boa aceitação no mercado consumidor (Valenti, 1984).

Atualmente o camarão da malásia, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879), é a principal espécie de camarão de água doce cultivada comercialmente no Brasil e no mundo (FAO, 2020). No ano de 2017, a produção mundial desta espécie foi aproximadamente de 263 mil toneladas, movimentando mais de US\$ 2 bilhões (FAO, 2020). *Macrobrachium rosenbergii* é uma espécie exótica, que foi introduzida no Brasil na década de 70 (Iketani et al., 2011), embora a expansão de sua carcinicultura tenha ocorrido nos anos 90 (Valenti, 1993). Apesar de não existir relatos de qualquer dano econômico ou impacto ambiental relacionado à introdução desta espécie, espécies exóticas podem causar efeitos negativos nas comunidades de organismos aquáticos nativos (Magalhães et al., 2005). Desta forma, o uso de uma espécie endêmica na carcinicultura de água doce aumenta a sua sustentabilidade e a aceitação local (Moraes-Valenti & Valenti, 2010), sendo uma tendência mundial (Kutty & Valenti, 2010).

Segundo Bertini & Valenti (2010), na fauna brasileira apenas três espécies do gênero *Macrobrachium* apresentam interesse econômico e alto potencial de cultivo:

Macrobrachium acanthurus (Wiegmann, 1836), *M. carcinus* (Linnaeus, 1758) e *M. amazonicum* (Heller, 1862). *Macrobrachium acanthurus* é um camarão de água doce popularmente conhecido como “camarão-canela” (Kutty & Valenti, 2010), apresenta ampla distribuição geográfica em rios, estuários e pequenas lagoas que deságuam no Oceano Atlântico (Tamburus et al., 2012). Possui boa tolerância à salinidade, é relativamente resistente a doenças e manuseio, e no cultivo atinge um tamanho de mercado aceitável dentro de seis meses (Gasca-Leyva et al., 1991). Os machos alcançam um maior comprimento corporal quando comparados às fêmeas (Fig. 1), podendo atingir 158 mm (Albertoni et al., 2002a) e 108 mm (Valenti et al., 1987), respectivamente.

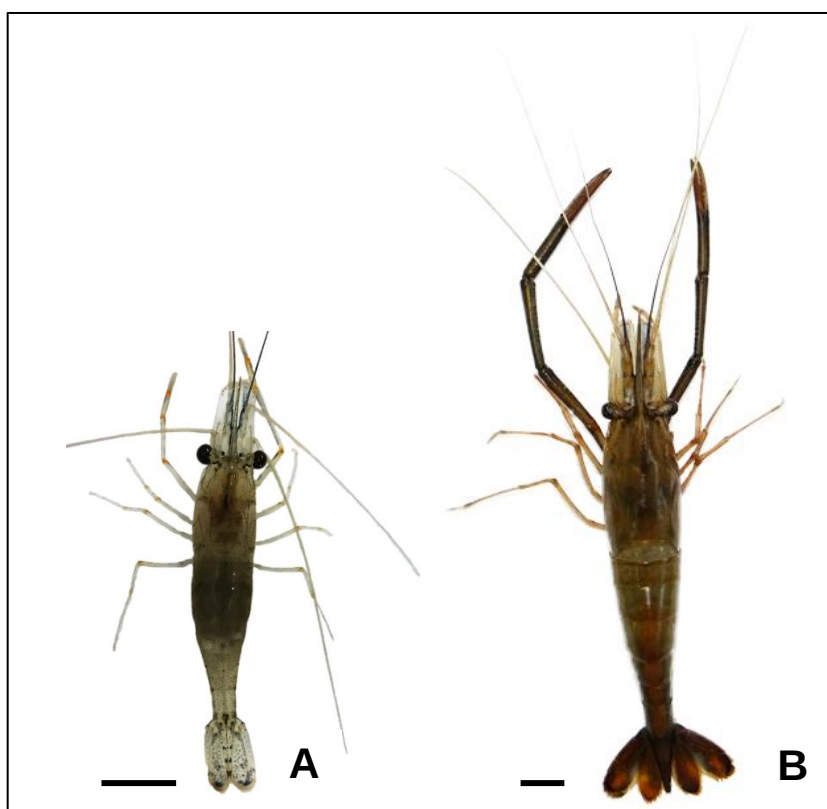


Figura 1. Vista dorsal de exemplar fêmea (A) e macho (B) de *Macrobrachium acanthurus*. Barra de escala = 1 cm.

A distribuição geográfica de *M. acanthurus* se estende desde a Carolina do Norte, nos Estados Unidos, até o Rio Grande do Sul, no Brasil (Anger, 2013; Pileggi et al., 2014). Sua ocorrência é comum na bacia do Rio Ribeira de Iguape, sul do estado de São Paulo, onde tem sido fortemente explorado pela pesca artesanal, tanto para consumo humano quanto para o mercado de iscas vivas na pesca

esportiva, atividade muito comum na região (Bertini & Valenti, 2010). Essa atividade provoca uma forte redução do estoque, comprometendo esse recurso pesqueiro e afetando seu ciclo reprodutivo (Bertini et al., 2014; Bertini & Baeza, 2014). Neste sentido, estudos em torno do cultivo de espécies endêmicas podem auxiliar tanto para manter as populações naturais, como para contribuir para a conservação dos ecossistemas onde habitam (García-Guerrero et al., 2013). Atualmente não há progresso no cultivo de *M. acanthurus*, havendo necessidade do desenvolvimento de tecnologias para a melhoria da sua capacidade reprodutiva em cativeiro.

O ciclo reprodutivo do camarão-canela no sul do estado de São Paulo acontece ao longo do ano todo, embora apresente maior atividade reprodutiva durante o verão (Valenti et al., 1986; Bertini et al., 2014). A desova é obrigatoriamente precedida por uma muda pré-nupcial, assim como todos os camarões carídeos (Bauer, 2004). Nas fêmeas desse camarão, o amadurecimento ovariano é total, apresentando quatro estágios de desenvolvimento gonadal durante o seu ciclo reprodutivo (Carvalho & Pereira, 1981). Além disso, o desenvolvimento entre os ovários e os ovos é sincrônico, ou seja, fêmeas que incubam os embriões em estágio inicial apresentam os ovários esgotados, enquanto que fêmeas com embriões prontos para eclodir apresentam ovários maduros, preparados para liberar novos oócitos, indicando uma produção contínua e sucessiva de ovos (Tamburus et al., 2012). *Macrobrachium acanthurus* possui uma estratégia reprodutiva em que as fêmeas carregam um grande número de ovos relativamente pequenos (Albertoni et al., 2002b; Bertini & Baeza, 2014), característica comum das espécies anfídromas, que requerem um ambiente estuarino para completar seu ciclo reprodutivo.

O conhecimento da reprodução de organismos aquáticos proporciona meios necessários à sua preservação e sobrevivência, permitindo o desenvolvimento de tecnologias de cultivo (Gastelú et al., 2011). A reprodução e muda em crustáceos é regulada por vários neuro-hormônios que são sintetizados e liberados a partir do complexo órgão X-glândula do seio, localizado no pedúnculo ocular dos decápodes (Pervaiz et al., 2011), sendo que o pedúnculo de *M. acanthurus* segue o padrão típico encontrado na maioria dos decápodes (Corrêa et al., 1996).

Dentre os hormônios liberados pelo complexo órgão X-glândula do seio estão o hormônio inibidor de muda (HIM) e o inibidor do desenvolvimento gonadal/vitelogênese (HIG). O primeiro, afeta a síntese do ecdisteróide e desempenha um papel importante na muda e no crescimento, o segundo tem efeito

na maturação ovariana e reprodução (Li et al., 2017). Além desses, há outros hormônios relacionados à reprodução, o estimulador de gônadas (HEG), encontrado no cérebro e nos gânglios torácicos e o hormônio de muda (HM) produzido pelo órgão-Y (Adiyodi & Adiyodi, 1970), localizado na borda entre as câmaras pré-branquial e branquial (Lachaise et al., 1993). Quando os níveis de HIM e HEG na hemolinfa são baixos e os níveis de HIG e do HM são altos, a muda é induzida, logo, baixos índices de HIG iniciam os processos vitelogênicos (Brown et al., 2010).

O desenvolvimento dos ovários em crustáceos decápodes ocorre rapidamente durante a vitelogênese, que é caracterizada pelo surgimento de vitelogenina na hemolinfa (Okumura, 2007). A vitelogenina é a precursora da principal proteína do vitelo (Okumura & Aida, 2000), sendo este fonte de nutrientes para o desenvolvimento dos embriões (Tsukimura, 2001). A síntese de vitelo nos crustáceos pode ocorrer através da vitelogênese endógena, em que as proteínas do vitelo são sintetizadas dentro do citoplasma do ovócito; e/ou pela vitelogênese exógena, em que a maior parte das proteínas do vitelo é produzida fora do ovário e incorporada posteriormente (Jaglarz et al., 2014). Sendo assim, para muitas espécies de decapódes a síntese de vitelo ocorre por meio desses dois processos (Meeratana & Sobhon, 2007; Braga et al., 2016; Mollemberg et al., 2017; Souza et al., 2017).

A oogênese em decápodes é um processo interativo entre células germinativas e células somáticas acessórias, que consiste em três fases sucessivas: pré-vitelogênese, vitelogênese e maturação (Okumura & Aida, 2000; Mossolin & Bueno, 2002; Meeratana & Sobhon, 2007; Zara et al., 2013). Com a vitelogênese, são observadas mudanças de tamanho e cor dos ovários, que são macroscopicamente visíveis através da carapaça transparente de *M. acanthurus* (Carvalho & Pereira, 1981). Estas alterações são devidas à deposição de vitelo nos oócitos, que resultam em um rápido aumento de seus diâmetros (Tsukimura, 2001), e em mudanças de cor, devido aos componentes carotenóides provenientes da dieta (Arculeo et al., 1995).

Em cativeiro, os camarões do gênero *Macrobrachium* normalmente maturam as gônadas e se reproduzem naturalmente sem a necessidade de qualquer manipulação especial das condições ambientais ou uso de ablação ocular (New et al., 2010). A ablação ocular pode ser usada para atingir picos previsíveis de maturação e aumentar a frequência de desovas, mesmo em espécies que maturam

naturalmente em cativeiro (Primavera, 1985). Esse controle do ciclo reprodutivo e previsibilidade na produção de larvas facilita a organização dos calendários de criação (Lumare, 1979; Primavera, 1985), sendo assim, essa técnica é frequentemente utilizada no cultivo de peneídeos (Benzie, 1998; Kuo et al., 2009).

A técnica de ablação do pedúnculo ocular remove o complexo órgão X-glândula do seio, afetando diretamente o sistema endócrino, impedindo a síntese e armazenamento do hormônio inibidor do desenvolvimento gonadal/vitelogênese (HIG), consequentemente, reduzindo o controle inibitório sobre a reprodução (Pervaiz et al., 2011). Desta maneira, desencadeia a síntese da vitelogenina, que, por sua vez, resulta em atividade ovariana intensiva (Nazari et al., 2007). Por esse motivo, a ablação ocular é frequentemente usada para acelerar o desenvolvimento e maturação ovariana em crustáceos de interesse econômico (Guan et al., 2017), sendo sua realização rápida, relativamente simples e de baixo custo (Ferriol et al., 2018).

Apesar da técnica de ablação ocular possuir muitas vantagens, ela está associada a altas mortalidades e pode diminuir a qualidade dos reprodutores e da prole (Uddin & Rahman, 2015; Magaña-Gallegos, 2018). Altos desempenhos reprodutivos e da qualidade da prole estão relacionados às maiores taxas de fecundidade, fertilização e eclosão que são os principais objetivos de uma instalação de maturação de reprodutores e correspondem a uma maior produção de larvas (Racotta et al., 2003). Por isso, há a necessidade de avaliar o efeito da ablação não só na maturação ovariana, mas também na capacidade reprodutiva das fêmeas.

O conhecimento da fecundidade das espécies é importante para avaliar seu potencial para o cultivo em escala comercial, assim como estimar sua capacidade reprodutiva (Valenti et al., 1989). Tal informação é essencial para manutenção do estoque de reprodutores na realização de larviculturas em escala comercial (Jee & Kok, 1991). Porém, nem todos os ovos incubados pela fêmea são viáveis, ou seja, o número de larvas eclodidas pode ser inferior ao número de ovos produzidos, desta forma, é importante avaliar também o número de larvas produzido pela fêmea (fertilidade) (Lobão et al., 1986).

Devido ao alto interesse econômico que *M. acanthurus* possui, vários estudos foram efetuados com este camarão, relacionados, principalmente, com a biologia populacional e reprodutiva (Paiva & Costa, 1962; Carvalho et al., 1979; Carvalho & Pereira, 1981; Valenti, 1984; Valenti et al., 1986 e 1989; Müller et al., 1992 e 1999;

Román-Contreras & Campos-Lince, 1993; Albertoni et al., 2002b; Tamburus et al., 2012; Bertini & Baeza, 2014; Bertini et al., 2014), desenvolvimento embrionário (Müller et al., 2007; Fukuda et al., 2017) e desenvolvimento larval (Choudhury, 1970; Quadros, et al., 2014; Rocha et al., 2017). Além desses, outros trabalhos abordaram o estudo de tecnologias e parâmetros adequados para auxiliar na propagação dessa espécie em cativeiro (Choudhury, 1971; Ismael & Moreira, 1997; Costa et al., 2016 e 2017; Rodrigues et al., 2017; Rodrigues et al., 2018). Entretanto, somente Cunha & Oshiro (2010) avaliaram o uso da técnica de ablação unilateral na reprodução dessa espécie, porém não realizaram avaliações histológicas e histoquímicas da sua maturação gonadal e, também, não fizeram análises de fecundidade e tamanho de ovos e larvas.

Pelo exposto, fica evidente a necessidade de estudos mais aprofundados envolvendo a maturação oocitária e reprodução de *M. acanthurus* em cativeiro, que levem em consideração aspectos histológicos, histoquímicos e parâmetros de capacidade reprodutiva. Além disso, a investigação das possíveis alterações nesses parâmetros em função da ablação peduncular pode auxiliar no entendimento de seu ciclo reprodutivo, a fim de contribuir com o desenvolvimento do pacote tecnológico para esta espécie. Desta maneira, o objetivo dessa tese é verificar se a ablação unilateral do pedúnculo ocular pode influenciar na vitelogênese, acelerando o desenvolvimento dos oócitos e maturação ovariana de *M. acanthurus*, causando alterações na fecundidade e na fertilidade de fêmeas e, conseqüentemente, podendo auxiliar na sua reprodução em cativeiro. Além disso, observar se a regeneração do pedúnculo ocular das fêmeas abladas ocorre de maneira normal ou provoca o aparecimento de qualquer outro apêndice anômalo.

Os resultados desta investigação foram divididos em três capítulos:

Capítulo I¹ - “The impact of eyestalk ablation on ovarian development in cinnamon river prawn *Macrobrachium acanthurus*.”

Neste capítulo foram efetuadas análises histológicas e histoquímicas a fim de acompanhar ao longo do tempo o desenvolvimento das células germinativas dos ovários de fêmeas abladas e não abladas (íntactas) nos estágios pré e pós-desova.

¹ Capítulo I: Já se encontra em inglês, pois será enviado para revista científica logo após as correções sugeridas pela banca examinadora.

Capítulo II - “Desempenho reprodutivo em fêmeas de *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Palaemonidae) submetidas à ablação unilateral do pedúnculo ocular.”

Este capítulo teve o objetivo de avaliar o efetivo desempenho reprodutivo das fêmeas por meio da análise do número e volume dos ovos, período de desenvolvimento embrionário e número e tamanho das larvas de fêmeas abladas e intactas após a reprodução em cativeiro.

Capítulo III - “First reported occurrence of a heteromorph antennule in the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Caridea).”

Este capítulo já se encontra publicado na revista *Crustaceana* (vol. 92 (4): 505-511, 2019) e abordou a ocorrência de diferentes tipos de antênulas heteromórficas após a realização da técnica de ablação do pedúnculo ocular em machos e fêmeas desta espécie. O resultado desse artigo, diferente dos outros, a princípio não foi obtido realizando um experimento específico com essa finalidade. Assim, durante a realização dos experimentos do capítulo 2, foram observadas diariamente as possíveis modificações desta região. Após detectada a primeira ocorrência de antenula heteromórfica, foi realizado um ensaio específico para a sua confirmação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adiyodi, K. G., & Adiyodi, R. G. (1970). Endocrine control of reproduction in decapod crustacean. *Biological Reviews*, 45, 121-165.
- Albertoni, E., Palma-Silva, C., & Esteves, F. (2002a). Distribution and growth in adults of *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae) in a tropical coastal lagoon, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19, 61-70.
- Albertoni, E. F., Palma-Silva, C., & Esteves, F. A. (2002b). Fecundity of *Macrobrachium acanthurus* Wiegmann, 1836 (Decapoda: Palaemonidae) in a tropical coastal lagoon subjected to human impacts (Macaé, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 14(1), 71-80.
- Anger, K. (2013). Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology*, 33(2), 151-183.
- Arculeo, M., Payen, G., Cuttitta, A., Galioto, G., & Riggio, S. (1995). A survey of ovarian maturation in a population of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda). *Animal Biology*, 4, 13-18.
- Bauer, R. T. (2004). Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the carideans. Oklahoma, University Oklahoma Press. 316p.
- Bauer, R. T. (2011). Amphidromy and migrations of freshwater shrimps. I. Costs, benefits, evolutionary origins, and an unusual case of amphidromy. *New Frontiers in Crustacean Biology*, 145-156.
- Bauer, R. T. (2013). Amphidromy in shrimps: a life cycle between rivers and the sea. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(4), 633-650.
- Bauer, R. T., & Delahoussaye, J. (2008). Life history migrations of the amphidromous river shrimp *Macrobrachium ohione* from a continental large river system. *Journal of Crustacean Biology*, 28, 622-632.
- Benzie, J. A. H. (1998). Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture*, 164, 23-47.
- Bertini, G., & Baeza, J. A. (2014). Fecundity and fertility in a freshwater population of the neotropical amphidromous shrimp *Macrobrachium acanthurus* from the southeastern Atlantic. *Invertebrate Reproduction & Development*, 58(3), 207-217.

- Bertini, G., Baeza, J. A., & Perez, E. (2014). A test of large-scale reproductive migration in females of the amphidromous shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) from south-eastern Brazil. *Marine and Freshwater Research*, 65, 81-93.
- Bertini, G., & Valenti, W. C. (2010). Importância econômica dos camarões de água doce. In R. B. Silva & L. C. Ming (Eds.), *Relatos de pesquisas e outras experiências vividas no Vale do Ribeira* (pp.155-170). Jaboticabal, FUNEP.
- Braga, A. A., Nunes, E. T., López-Greco, L. S., Camargo-Mathias, M. I., & Fransozo, V. (2016). Histological and histochemical features of the oogenesis in the simultaneous protandric hermaphrodite shrimp *Exhippolysmata oplophoroides* (Decapoda: Caridea), *Micron*, 88, 60-67.
- Brown, J. H., New, M. B., & Ismael, D. Biology. (2010). In M. B. New, W. C. Valenti, J. H. Tidwell, L. R. D'Abramo & M. N. Kutty (Eds.), *Freshwater prawns: biology and farming* (pp. 18-39). Oxford, Wiley-Blackwell.
- Brusca, R., & Brusca, G. (2007). *Invertebrados*. (2nd ed.). Sinauer Associates, Guanabara Koogan S. A. 968p.
- Carvalho, H. A., Gomes, M. G. S., Gondim, A. Q., & Pereira, M. C. G. (1979). Sobre a biologia do pitu - *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) em populações naturais da Ilha de Itaparica. *Universitas*, 24, 25-45.
- Carvalho, H. A., & Pereira, M. C. G. (1981). Descrição dos estádios ovarianos de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann 1836) (Crustacea, Palaemonidae) durante o ciclo reprodutivo. *Ciência e Cultura*, 33(10), 1353-1358.
- Choudhury, P. C. (1970). Complete larval development of the Palaemonid shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann. 1836) reared in the laboratory. *Crustaceana*, 18(2), 113-132.
- Choudhury, P. C. (1971). Laboratory rearing of larval pf the Palaemonid shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836). *Crustaceana*, 21(2), 113-126.
- Corrêa, A. M. A., Matos, M. R. B., Gomes, M. G. S., Santos, G. V., & Amaral, A. D. (1996). O órgão-X gangliônico do pedúnculo ocular de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 56, 65-77.
- Costa, T. V., Yoshii-Oshiro, L. M., López-Greco, L. S., Melo, E. P., Mattos, L. A., & Bambozzi-Fernandes, A. (2016). Determinación del voltaje y el tamaño del animal óptimos para la extracción de espermátóforos en el camarón de agua

- dulce *Macrobrachium acanthurus* (Palaemonidae). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(2), 422-428.
- Costa, T. V., Yoshii-Oshiro, L. M., Mattos, L. A., López-Greco, L. S., Melo, E. P., & Flor, H. R. (2017). Toxicity, freezing and cold storage test of native species semen. *Boletim do Instituto de pesca*, 43(3), 334-346.
- Cunha, C. H., & Oshiro, L. M. Y. (2010). The influence of eyestalk ablation on the reproduction of the freshwater *Macrobrachium acanthurus* shrimp in captivity. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 32(3), 217-221.
- De Grave, S., & Fransen, C. H. J. M. (2011). Carideorum catalogus: the recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps. *Zoologische Mededelingen*, 85, 195-589.
- De Grave, S., Pentcheff, N. D., Ahyong, S. T., Chan, T. Y., Crandall, K. A., Dworschak, P. C., Felder, D. L., Feldmann, R. M., Fransen, 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. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 21, 1-109.
- FAO. (2020). Fishery and Aquaculture Statistics. [Global Aquaculture Production 1950-2016] (FishStatJ). Rome, Italy: FAO Fisheries and Aquaculture Department. [online].
- Ferriol, M. G., Aguiar, J. L. B., & Trujillo L. R. (2018). Endocrinología de la reproducción em crustáceos decápodos (Crustacea: Decapoda): avances científicos y perspectivas futuras. *Revista de Investigaciones Marinas*, 38(2), 1-8.
- Fukuda, B., Bertini, G., & Almeida, L. C. F. (2017). Effect of salinity on the embryonic development of *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda: Palaemonidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 61(1), 1-8.
- García-Guerrero, M. U., Becerril-Morales, F., Veja-Villasante, F., & Espinosa-Chaurand, L. D. (2013). Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(4), 651-675.

- Gasca-Leyva, J. F. E., Martinez-Palacios, C. A., & Ross, L. G. (1991). The respiratory requirements of *Macrobrachium acanthurus* (Weigmann) at different temperatures and salinities. *Aquaculture*, 93, 191-197.
- Gastelú, J. C., Oliveira, J., Brito, L. O., Galvez, A. O., & Moreira, M. G. (2011). Efeito da temperatura e dos alimentos protéico e lipídico nos estádios de maturação ovariana e estágios de muda do *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) *Ciência Animal Brasileira*, 12(3), 443-455.
- Guan, Z. B., Yi, H. X., Zhao, H., Shui, Y., Cai, Y. J., & Liao, X. R. (2017). Cell division cycle 2 participates in eyestalk ablation-induced ovarian maturation of *Procambarus clarkii*. *Aquaculture*, 468, 115-119.
- Iketani, G., Pimentel, L., Silva-Oliveira, G., Maciel, C., Valenti, W. C., Schneider, H., & Sampaio, I. (2011). The history of the introduction of the giant river prawn, *Macrobrachium cf. rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae), in Brazil: new insights from molecular data. *Genetics and Molecular Biology*, 34(1), 142-151.
- Ismael, D., & Moreira, G. S. (1997). Effect of temperature and salinity on respiratory rate and development of early larval stages of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A(3), 871-876.
- Jaglarz, M. K., Kubrakiewicz, J., & Bilinski, S. M. (2014). The ovary structure and oogenesis in the basal crustaceans and hexapods. Possible phylogenetic significance. *Arthropod Structure & Development*, 43 (4), 349-360.
- Jee, A. K., & Kok, L. Y. (1991). Fecundity changes in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) during egg incubation. *Aquaculture and Fisheries Management*, 22, 1-6.
- Kuo, C., Chen, M., Fan, Y. N., Chuang, F., & Hsieh, H. S. (2009). Enhancement of vitellogenin synthesis by secretion by serotonin in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Zoological Studies*, 48(5), 597- 606.
- Kutty, M. N., & Valenti, W. C. (2010). Culture of other freshwater prawn species. In M. B. New, W. C. Valenti, J. H. Tidwell, L. R. D'Abramo & M. N. Kutty (Eds.), *Freshwater prawns: biology and farming* (pp. 502-523). Oxford, Wiley-Blackwell.
- Lachaise, F., Le Roux, A., Hubert, M., & Lafont, R. (1993). The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). *Journal of Crustacean Biology*, 13(2), 198-234.

- Li, L., Pan, L., Hu, D., Liu, D., & Liu, M. (2017). The Effect of bilateral eyestalk ablation on signal transduction pathways of ion regulation of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48, 145-155.
- Lobão, V. L., Rojas, N. E. T., & Valenti, W. C. (1986). Fecundity and fertility of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda) em laboratório. *Boletim do Instituto de Pesca*, 13, 15-20.
- Lumare, F. (1979). Reproduction of *Penaeus kerathurus* using eyestalk ablation. *Aquaculture*, 18, 203-214.
- Magalhães, C., Bueno, S. L. S., Bond-Buckup, G., Valenti, W.C., Silva, H. L. M., Kiyohara, F., Mossolin, E. C., & Rocha, S. S. (2005). Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of São Paulo, Brazil: Records and possible causes of their introduction. *Biodiversity and Conservation*, 14, 1929-1945.
- Magaña-Gallegos, E., Bautista-Bautista, M., González-Zuñiga, L. M., Arevalo, M., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2018). Does unilateral eyestalk ablation affect the quality of the larvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Decapoda: Dendrobranchiata: Penaeidae)? *Journal of Crustacean Biology*, 38(4), 401-406.
- Mantelatto, F. L., Pileggi, L. G., Magalhães, C., Carvalho, F. L., Rocha, S. S., Mossolin, E. C., Rossi, N., & Bueno, S. L. S. (2016). Avaliação dos Camarões Palemonídeos (Decapoda: Palaemonidae). In M. A. A. Pinheiro & H. Boos (Eds.), *Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014* (pp 252-267). Porto Alegre, RS, Sociedade Brasileira de Carcinologia - SBC, 466 p.
- Martin, J. W., & Davis, G. E. (2001). An updated classification of the recent Crustacea. Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series, v. 39, 123p.
- Meeratana, P., & Sobhon, P. (2007). Classification of differentiating oocytes during ovarian cycle in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de man. *Aquaculture*, 270, 249-258.
- Mollemberg, M., Zara, F. J., & Santana, W. (2017). Morphology and ultrastructure of the adult ovarian cycle in Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Majoidea). *Helgoland Marine Research*, 71, 1-14.
- Moraes-Valenti, P., & Valenti, W. C. (2010). Culture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. In M. B. New, W. C. Valenti, J. H. Tidwell, L. R.

- D'Abramo & M. N. Kutty, (Eds), Freshwater prawns: biology and farming. (pp. 485-501). Oxford, Wiley-Blackwell.
- Mossolin, E. C., & Bueno, S. L. S. (2002). Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião. Brazil. *Journal of Crustacean Biology*, 22 (2), 367–376.
- Müller, Y. M. R., Bressan, C. M., & Nazari, E. M. (1992). Dados de fecundidade de *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae) do rio Capivari, Praia dos Ingleses, Florianópolis, SC. *Biotemas*, 5, 123-132.
- Müller, Y. M. R., Nazari, E. M., Ammar, D., Cargnin Ferreira, E. C., Beltrame, I. T., & Pacheco, C. (1999). Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratones, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, Florianopolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16, 629-636.
- Müller, Y. M. R., Pacheco, C., Simões-Costa, M. S., Ammar, D., & Nazari, E. M. (2007). Morphology and chronology of embryonic development in *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). *Invertebrate Reproduction & Development*, 50, 67-74.
- Munansinghe, D. H. N. (2010). Phylogenetic positions of some species of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 38(3), 193-199.
- Nazari, E. M., Baily, A. C. D., Ammar, D., & Müller, Y. M. R. (2007). Ovarian staging in eyestalk ablated females of *Farfantepenaeus paulensis*: a histologic, morphometric, and biochemical analysis. *Journal of Crustacean Biology*, 27(2), 296-303.
- New, M. B., & Singholka, S. (1982). Freshwater prawn farming. A manual for the culture of *Macrobrachium rosenbergii*. FAO Fisheries Technical Paper 225. FAO, Rome. 116p.
- New, M. B., D' Abramo, L. R., Valenti, W. C., & Singholka, S. (2010). Sustainability of freshwater prawn culture. In M. B. New, W. C. Valenti, J. H. Tidwell, L. R. D'Abramo & M. N. Kutty (Eds.), Freshwater prawns: Biology and Farming (pp. 524-530). Oxford, Wiley-Blackwell.
- Novak, P. A., Bayliss, P., Crook, D. A., Garcia, E. A., Pusey, B. J., & Douglas, M. M. (2017). Do upstream migrating, juvenile amphidromous shrimps, provide a marine subsidy to river ecosystems?. *Freshwater biology*, 62(5), 880-893.

- Okumura, T. (2007). Effects of bilateral and unilateral eyestalk ablation on vitellogenin synthesis in immature female kuruma prawns, *Marsupenaeus japonicus*. *Zoological Science*, 24(3), 233-240.
- Okumura, T., & Aida, K. (2000). Hemolymph vitellogenin levels and ovarian development during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fisheries Science*, 66, 678-685.
- Olivier, T. J., Handy, K. Q., & Bauer, R. T. (2013). Effects of river control structures on the juvenile migration of *Macrobrachium ohione*. *Freshwater Biology*, 58, 1603-1613.
- Paiva, M. P., & Costa, R. S. (1962). Sobre os ovos de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) Pearse, 1911. *Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia*, 3, 37-40.
- Pervaiz, P. A., Jhon, S. M., Sikdar-Bar, M., Khan, H. A., & Wani, A. A. (2011). Studies on the effect of unilateral eyestalk ablation in maturation of gonads of a freshwater prawn *Macrobrachium dayanum*. *World Journal of Zoology*, 6, 159-163.
- Pileggi, L. G., & Mantelatto, F. L. (2010). Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebrate Systematics*, 24(2), 194-208.
- Pileggi, L. G., Rossi, N., Wehrtmann, I. S., & Mantelatto, F. L. (2014). Molecular perspective on the American transisthmian species of *Macrobrachium* (Caridea, Palaemonidae). *ZooKeys*, 457, 109-131.
- Primavera, J. H. (1985). A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In Y. Taki, J. H. Primavera & J. A. Llobrera (Eds.), *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps* (pp. 47-64). Iloilo City, Philippines, SAEFDEC Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Quadros, M. L. A., Maciel, C., Bastos, S., & Sampaio, I. (2004). Reprodução do Camarão Canela - *Macrobrachium acanthurus* em condições controladas de laboratório e montagem de um atlas para identificação de estágios larvais. *Revista Científica da Ufpa*, 4, 1-11.

- Racotta, I., Palacios, E., & Ibarra, A. M. (2003). Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture*, 227, 107-130.
- Reis, J. A., Hoffman, P., Marcos, L. M., Taddei, F. G., & Hoffman, F. L. (2004). Estudo higiênico-sanitário dos camarões dulcícolas *Macrobrachium amazonicum* e *M. jelskii*. *Revista Higiene Alimentar*, 18, 58-68.
- Rocha, C., Quadros, M., Maciel, M., Maciel, C., & Abrunhosa, F. (2017). Morphological changes in the structure and function of the feeding appendages and foregut of the larvae and first juvenile of the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98(4), 713-720.
- Rodrigues, M. M., Almeida, L. C. F., & Bertini, G. (2018). Survival rate of *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) larvae in laboratory conditions under different salinities and diets. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 13(2), 121-130.
- Rodrigues, R. A., Vetorelli, M. P., & Araújo, P. F. R. (2017). Regime alimentar na larvicultura de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) em sistema aberto. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 10(1), 17-30.
- Román-Contreras, R., & Campos-Lince, L. S. (1993). Aspectos reproductivos y aproximación a un modelo de crecimiento para una población de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) en el Rio Palizada, Campeche, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 20, 55-65.
- Souza, T. L., Braga, A. A., López-Greco, L. S., & Nunes, E. T. (2017). Dynamics of oogenesis in ghost shrimp *Callichirus major* (Crustacea: Axiidea): a morphofunctional and histochemical study. *Acta Histochemica*, 119, 769-777.
- Tamburus, A. F., Mossolin, E. C., & Mantelatto, F. L. (2012). Populational and Reproductive Aspects of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea: Palaemonidae) From North Coast of São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 16(1), 9-18.
- Tsukimura, B. (2001). Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *American Zoologist*, 41(3), 465-476.
- Uddin, S. A., & Rahman, M. M. (2015). Gonadal maturation, fecundity and hatching performance of wild caught tiger shrimp *Penaeus monodon* using unilateral eyestalk ablation in captivity. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 13(2), 315-322.

- Valenti, W. C. (1984). Estudo populacional dos camarões de água doce *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) e *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) do rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Palaemonidae) [MSc thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 156 p.
- Valenti, W. C. (1993). Freshwater prawn culture in Brazil. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24, 29-34.
- Valenti, W. C., Mello, J. T. C., & Lobão, V. L. (1986). Dinâmica da reprodução de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) e *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Ciência e Cultura*, 38, 349-355.
- Valenti, W. C., Mello, J. T. C., & Lobão, V. L. (1987). Crescimento de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 47, 349-355.
- Valenti, W. C., Mello, J. T. C., & Lobão, V. L. (1989). Fecundidade em *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6, 9-15.
- 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 Zoologica*, 94, 134-146.

THE IMPACT OF EYESTALK ABLATION ON OVARIAN
DEVELOPMENT IN CINNAMON RIVER PRAWN
Macrobrachium acanthurus

1. ABSTRACT

Macrobrachium acanthurus is a native Brazilian species of great economic interest, making the study of techniques to assist in its cultivation ever more necessary. Eyestalk ablation is commonly used to promote ovarian development and maturation of captive crustaceans. Here, we performed two experiments to evaluate the effect of unilateral eyestalk ablation on the oocytes development (histology and histochemistry) of the freshwater shrimp *M. acanthurus*. In the first experiment, females with ovaries in a spent stage of gonadal development were divided into two treatments: unilaterally ablated and intact (not ablated). In the second experiment, females with mature gonads were submitted to the same treatments. The unilateral eyestalk ablation technique apparently, did not accelerate the ovarian maturation in *M. acanthurus*. Additionally, it did not impair survival, maturation, nuptial moulting, and spawning. The histological and histochemical analyses of the ovaries indicated that the ablation did not affect oogenesis, but it cannot be affirmed that the oocytes have the same biochemical quality and/or females are equally fertile.

Keywords: X-organ sinus gland complex; Ovarian maturation; Vitellogenesis; Captivity.

2. INTRODUCTION

The worldwide production of shrimp of the genus *Macrobrachium* Spence Bate, 1861, grew by approximately 16% between the years 2007 and 2017 (FAO, 2020). However, Brazil has not contributed to this growth, as only the exotic species *M. rosenbergii* (de Man, 1879), is commercially cultivated in the country and its production has decreased by 56% in the same years (FAO, 2020).

Brazil has a number of native *Macrobrachium* species with great potential for freshwater shrimp farming, such as *M. acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Tamburus et al., 2012), whose males can reach a body length of 158 mm (Albertoni et al., 2002). This species is distributed from North Carolina in the United States to Rio Grande do Sul in Brazil (Anger, 2013; Pileggi et al., 2014). Its occurrence is common in the Ribeira de Iguape River basin, in the south of the state of São Paulo, where it has been heavily exploited by artisanal fishing, both for human consumption and for the live bait market in sport fishing, a very common activity in the region (Bertini & Valenti, 2010). This activity causes a strong reduction of the natural stock, which may compromise this fishing resource and affect its reproductive cycle (Bertini et al., 2014; Bertini & Baeza, 2014).

The choice of native species for cultivation is a worldwide trend (Kutty & Valenti, 2010), and has important implications for maintaining local biodiversity as well as avoiding problems caused by the introduction of exotic species (Maciel & Valenti, 2009). But even though the need for the cultivation of endemic species is being discussed since the early 2000s (Kutty et al., 2000), there is currently no progress towards the cultivation of *M. acanthurus*, highlighting the necessity to develop technologies for its larviculture. Recently, studies on sperm extraction methods (Costa et al., 2016), semen storage (Costa et al., 2017), larval diet (Rodrigues et al., 2017), and larval survival rate in different salinities and diets (Rodrigues et al., 2018) have been performed. Now, it is necessary to study reproduction techniques of this species to ensure a successful management of the reproducing animals and their breeding in captivity.

The reproduction in crustaceans is regulated by several neuro-hormones that are synthesised and released by the X-organ sinus gland complex, located in the ocular peduncle of the decapods (Pervaiz et al., 2011). The X-organ synthesises the gonadal inhibitor hormone (GIH) that is stored and distributed by the sinus gland (Li

et al., 2017). The unilateral eyestalk ablation is the best known and most effective technique for inducing ovarian maturation of penaeid shrimps (Sainz-Hernández et al., 2008). This technique blocks the GIH and triggers the synthesis of vitellogenin, which in turn results in intensive ovarian activity (Fingerman, 1987; Tsukimura, 2001). This may bring about an anticipation of the ovigerous state and an increase in the frequency of spawning (Aktas & Kumlu, 1999). As such, penaeid shrimp larviculture commonly uses this technique, particularly in species that do not mature and spawn naturally in captivity (Kuo et al., 2009).

Research on eyestalk ablation among *Macrobrachium* freshwater shrimps has been increasing due to the growing commercial exploitation of these shrimps. Among these studies, the following focused on the effects of ablation on the growth and gonadal maturation of *M. nobilii* (Henderson & Matthai, 1910) by Sindhukumari & Pandian (1987); of *M. rosenbergii* by Santos & Pinheiro (2000), Okumura & Aida (2001), Shailender et al. (2013) and Revathi et al. (2013); of *M. lanchesteri* (De Man, 1911) by Varalakshmi & Reddy (2010); of *M. dayanum* (Henderson, 1893) by Pervaiz et al. (2011) and of *M. lamarrei lamarrei* (H. Milne-Edwards, 1837) by Hussain et al. (2017).

Based on the hypothesis that unilateral eyestalk ablation may accelerate the gonadal maturation of *M. acanthurus*, increasing the number of reproductive cycles in captivity, we investigated the influence of the technique on ovarian development under laboratory conditions. For this, we performed histological and histochemical analyses, for monitoring the development of the ovarian germ cells of ablated and intact females in the pre- and post-spawning stages over time.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Collection and acclimatisation

Adult female shrimps, were collected in January 2017 from the Ribeira de Iguape River (24°64'87"S, 47°51'09"W), São Paulo, Brazil. In the laboratory, these shrimps were disinfected in formaldehyde (25 ppm) for 30 minutes and then acclimatised for one day in 60L black polyethylene boxes provided with freshwater in a constant-aeration water recirculation system. To avoid stress, pieces of PVC pipes and artificial aquatic macrophytes were placed in the boxes to serve as refuge. The photoperiod was 12 h in light and 12 h in the dark. The water temperature was maintained at 29±1°C with a heater attached to a thermostat.

3.2. Experimental conditions, selection of females and ablation

We performed two experiments to evaluate the effect of unilateral eyestalk ablation on oocyte development, nuptial moulting occurrence, and spawning. For this, we selected sexually adult females with a carapace length (CL), measured from the orbital sinus to midpoint of the posterior margin of the carapace, between 12 – 15 mm. The characterisation of the developmental stages of the gonads was performed macroscopically by transparency of the cephalothorax according to the colour and size of the ovaries in the carapace, after adaptation by Carvalho & Pereira (1981): In maturation - ovaries with light green colour, occupying $\frac{3}{4}$ of the dorsal cephalothorax region; Mature - dark green coloured ovaries occupying the entire dorsal region of the cephalothorax, from the base of the rostrum to the half of the first abdominal segment; Spent (post-release of oocytes) - stage found in ovigerous females with eggs in the early stage of embryonic development, i.e. the ovaries are small and flabby with whitish or brownish-yellow colouration. Based on this, females with ovaries in the spent and mature stage were selected for the experiments.

In experiment 1, females with spent-stage gonads (Figs. 1 A, B) were divided into two treatments: unilaterally ablated and intact (not ablated). In experiment 2, females with mature gonads (Figs. 1 C, D) were submitted to the same two treatments.

The eyestalk ablation method was adapted from that described for marine shrimps by Primavera (1985). Prior to ablation, the anaesthetic ointment Lidocaine was applied to the base of the eye peduncle, then the incision was set close to the base with scissors. The incision site was cauterised "hot" with a soldering iron. At the cauterised sites, a mixture of antibiotic ointments (Nitrofurazone and Oxytetracycline-polymyxin B, 1:1 ratio) was administered. The ablation technique was performed rapidly under a stereomicroscope to minimise stress for the animal.

In each experiment, 112 females were randomly selected, 56 intact and 56 ablated ones, and placed in individual 1 L containers of freshwater with constant aeration and a piece of PVC pipe to provide shelter. Temperature ($29\pm 1^{\circ}\text{C}$) and photoperiod (12 h light/12 h dark) were maintained by keeping the female's containers in a BOD incubator (Eletrolab[®], EL 202). Pieces of squid and extruded ration for adult freshwater shrimp (30% crude protein, Nutriave[®]), were offered as food in the morning *ad libitum*. Daily, after feeding, the water from the recipients was completely changed and observations were made in order to detect moulting and to record oocyte exteriorisation (non-fertilised), oocyte abortion, feeding, gonadal stage, and death.

Changes and/or possible abnormalities in ovarian development were followed over time in both experiments. For this, 14 females out of the originally 56 females per treatment (ablated/intact) were selected on each analysis day (1, 3, 5, and 7), and after each day, all survivors from both treatments were sacrificed; i.e. on day 1 after the start of the experiment, all females (ablated and intact) assigned to day 1 were sacrificed, and so on for each one of the analysis days. We chose evaluation times with an interval of only one day between analyses, to be able to monitor the development of the ovaries without missing observations of significant changes. The maximum time of 7 days was determined based on Fukuda et al. (2013), who showed this time to be sufficient for the development of ovaries in spent females with oocytes in initial stage to turn mature.

At the end of each analysis day, the females were anaesthetised by thermal shock in a container with ice and water. After this, the carapace was cut with scissors for exposure and removal of the ovaries using forceps under a stereomicroscope. The gonads were evaluated with regard to size and colouration for macroscopic verification of the current developmental stage.

3.3. Microscopic analyses

For the histological and histochemical analyses, 7 females/treatment/time/experiment were used. The gonads of these females were fixed for 24 hours in 10% buffered formaldehyde (NaOH-pH 7.4) and subsequently transferred to 70% alcohol. The dehydration of the fixed gonads was performed using an ascending sequence of 70-95% ethyl alcohol, after which the material was fixed in methacrylate (Leica Historesin[®], Nussloch/Heidelberg, Baden-Württemberg, Germany). The polymerised blocks were sectioned in 5 µm thick slices using a Leica RM[®] Microtome.

For the detection of proteins, neutral polysaccharides, and calcium, the slides were stained according to Junqueira & Junqueira (1983), using the methods bromophenol blue, periodic acid-schiff (PAS), and von Kossa (safranin counterstain), respectively. After staining and drying, the slides were mounted in Canada Balsam. Image analysis and digitisation were performed using a Leica DM2500[®] photomicroscope.

The classification of the oocyte development stages was based on the works of Meeratana & Sobhon (2007), Ravi et al. (2013), Sharifian et al. (2015), and Souza et al. (2017).

Twenty oocytes per treatment, from the different developmental stages in the region of the largest cell diameter in the stages oogonia (Og), pre-vitellogenic (Pv), in vitellogenesis (Iv), and mature (Mt), were measured. Atretic oocytes (At) were identified but not measured as they lost cell boundaries. These measurements were performed using the Leica LAS EZ 3.0.0: Leica Microsystems[®] software.

Using the Image Pro-Plus[®] software (Trial version), we measured the area occupied by oocytes (per developmental stage) in relation to the total area of the ovaries. In this case, the measurement was made by dividing the oocytes into 3 groups: oogonia + pre-vitellogenic (Og + Pv), in vitellogenesis + mature (Iv + Mt), and atretic (At). Subsequently, the percentage of the area of each of these groups in the ovaries of the females in the different treatments was estimated.

The number of oocytes (n^o) per developmental stage was performed manually per sample using a representative region on the slide containing 50 germ cells. The number of oocytes (per stage) present in the sampled region, was counted individually and afterwards, the percentage of this amount in the ovaries of the

females in the different treatments was calculated. In this case, the counting was performed by dividing the oocyte stages into the following groups: oogonia (Og), pre-vitellogenic (Pv), and in vitellogenesis + mature (Iv + Mt).

3.4. Statistical analyses

Data exploration was performed following the protocol described by Zuur et al. (2010). The effect of eyestalk ablation on the diameter (μm), area, and number (%) of the different stages of oocyte development was analysed by fitting linear mixed effects models (lme), with treatment (intact versus ablated) and time considered fixed factors, while females were considered as a random factor.

To analyse the effect of eyestalk ablation on survival, nuptial moulting, and spawning, a generalised linear model (glm) with binomial distribution and logistic link function was used. This model was chosen according to the Akaike Information Criterion (AIC, Akaike, 1974), which presented the lowest value among the tested models.

The statistical analyses were performed using the nlme package (Pinheiro et al., 2017) from the R software (R Core Team, 2016). The alpha level of statistical significance was set at 0.05; when the hypothesis of equality between the results was rejected, they were compared by the Bonferroni method.

4. RESULTS

4.1. Survival, nuptial moulting and spawning

The survival between ablated and intact females was similar in both experiments with no difference between treatments ($p>0.05$). In experiment 1, the final survival was 100% for all days analysed in both treatments, except for ablated females on day 5 that had 92.9% survival (Table 1). In experiment 2, the percentage of survival of females from both treatments did not differ between days. However, on day 7, there was a higher mortality of females, notably after nuptial moulting, with a final survival of 85.7% in intact and 57.1% in ablated individuals (Table 1).

Only females from experiment 2 suffered nuptial moulting with posterior oocyte posture, as they entered the experiment with mature gonads. However, there was no statistical difference in the number of ecdysis and spawnings between intact and ablated females ($p>0.05$) (Table 1). No female on day 1 spawned, while on day 7, 35.7% of ablated females and 71.4% of intact females spawned (Table 1).

4.2. Ovarian development

The ovaries of *M. acanthurus* are located dorsally in the cephalothorax over the stomach and hepatopancreas, just behind the eyes, reaching into the first abdominal segment when mature. Lateroventrally from each ovarian lobe begins the oviduct extending to the base of the third pair of pereopods, where it opens into the gonopore. Depending on the stage of ovarian maturation, a large quantity of chromatophores in the ovaries can be visualised through the transparent carapace (Fig. 1 C). The volume, size, texture, and colour of the ovaries change according to their degree of maturation. However, no macroscopic difference of these ovary characteristics between ablated and intact females, was observed in both experiments.

The histological analysis revealed that the ovaries of ablated and intact females had the same morphological characteristics in both experiment 1 and 2.

The proliferation zone is observed in the centre of the ovary, in which lies the germinal layer of the oogonias (Figs. 2 A, E, F). Follicular cells surround clusters of oogonia and oocytes in early stages, and as the oocytes grow follicular cells begin to

surround each oocyte separately, constituting the so-called ovarian follicles (Fig. 2 B, D, E, F). As ovarian maturation occurs, the follicles move to the periphery of the ovary and the lobes expand into the hemocellic space.

The mature ovarian development stage is mainly composed of mature oocytes. The germinal epithelium is reduced, the follicular cells are flattened, and the germinal zone is hardly found in the histological sections and, when it appears, it is compressed by mature oocytes. At this stage no oocytes were found in early vitellogenesis (Figs. 2 A, B).

The spent stage of the ovaries is verified shortly after spawning, in which the oocytes are disorganised and the ovary is flaccid, presenting much connective tissue. It is mostly composed of pre-vitellogenic oocytes, as well as in early vitellogenesis. The germ zone is easily found, with large groups of oogonia. Around the oocytes, follicular cells with an ovoid form can be observed, and there are no oocytes in final vitellogenesis (Figs. 2 C, D).

The ovaries presented oocytes in different numbers and stages of maturation, varying according to gonadal development (Figs. 2 A-F). Oocyte classification, which was based on size, location, cytoplasmic appearance, nucleus visualisation, chromatin pattern, and accumulation of yolk granules and lipid droplets in the cytoplasm, was defined as follows:

- 1- Oogonia (Og) - primary germ cells found in the centre of the ovaries, have a mean diameter ($\pm$ standard deviation) of $15.94 \pm 2.51\mu\text{m}$. They have a homogeneous and barely evident cytoplasm, a basophilic spherical nucleus that occupies most of the cell, with chromatin in varying degrees of condensation, and the nucleolus is not evident (Figs. 2 D-F).
- 2- Pre-vitellogenic oocytes (Pv) - larger cells than the oogonia with a round-shape and a mean diameter of $70.89 \pm 32.39\mu\text{m}$. In the ovary, they are found externally from the oogonia, the cytoplasm is basophilic and larger when compared to the oogonia. The nucleus is central, less basophilic than the cytoplasm, with more dispersed chromatin, and the nucleoli can be visualised in some cells. These oocytes are surrounded by round-shaped follicular cells (Figs. 2 D, E).
- 3- Oocytes in vitellogenesis (Iv) - larger than pre-vitellogenic oocytes, with a mean diameter of $205.84 \pm 54.15\mu\text{m}$. They are marked by having yolk granules and lipid droplets distributed mainly in the periphery of the acidophilic

cytoplasm. In addition, the basophil nucleus and nucleoli are still visible. There is an increase in the number of flattened follicular cells around each oocyte (Figs. 2 E, F).

- 4- Mature oocytes (Mt) - cells in maximum stage of maturation, having a hexahedron shape with an average diameter of $510.52 \pm 90.75\mu\text{m}$. The cytoplasm of these oocytes is intensely acidophilic and has many lipid and yolk vesicles distributed throughout the cytoplasm. The visualisation of the nucleus is usually difficult due to the large accumulation of dense vitellogenic granules in the cytoplasm. At this stage, the oocytes are surrounded by elongated and flattened follicular cells (Figs. 2 A, B).

In addition to these developmental stages, the atretic stage was observed. These oocytes were in the process of resorption, presenting a completely disorganised cell, often losing its limits and binding to other cells (Fig. 3 A). The oocytes are acidophilic, have non-distinguishable nuclei and intensely vacuolated cytoplasm with many lipid droplets, sometimes showing areas of homogeneous cytoplasm on their periphery. Follicular cells, although present, do not continuously involve these oocytes. The atretic stage was found mainly in females with spent and mature gonads. In spent females, atretic oocytes were found in smaller quantities, which refer to the reabsorption of some mature oocytes that were not expelled. In mature females, atretic oocytes appeared in individuals who had undergone moulting, but had not released oocytes, so much, that it often occupied almost the entire volume of the ovaries.

The tracking of the development of *M. acanthurus* oocytes from the newly laid eggs indicated that the ovaries of ablated and non-ablated females showed rapid reorganisation (Figs. 3 A-G), no morphological differences between them were noticed. In just 5 days after laying, the ovaries were already organised, with many oocytes in vitellogenesis (lv) with yolk granules and lipid droplets (Fig. 3 F). In addition, regardless of ablation, females who started the experiment with spent ovaries and eggs in early embryonic stage (Experiment 1), at the end of 7 days presented mature ovaries. Females that entered the experiment with mature ovaries (Experiment 2) spawned (unfertilised oocytes), aborted and started the re-maturation process during the 7 days, and at the end of the analysed period, most of them presented ovaries "in maturation".

The average oocyte diameter size at each stage, did not differ statistically between ablated and intact females from both experiments on all analysed days ($p>0.05$) (Fig. 4).

For the percentages of area and number, the results of the lme showed that no difference was found in the treatment interaction (ablated/intact)*day*oocyte stage of experiments 1 and 2 ($p>0.05$), but there was a significant difference in oocyte stage when analysed separately ($p<0.05$) (Tables 2 and 3). Moreover, in experiment 1, a statistically significant difference was found between the day*oocyte stage interaction and the percentage of area ($p<0.05$) (Table 2), indicating a reduction in the area occupied by the initial vitellogenic oocytes and an increase in the final vitellogenic ones over the test time (Fig. 5). In experiment 2, we also found a difference in the day*oocyte stage interaction for both area and number of oocytes ($p<0.05$) (Tables 2 and 3). In this case, it is evident that over time the area of vitellogenesis + mature oocytes decreases, and in atretic ones increases. The analysis for oocyte numbers follows this variation, the number of final vitellogenic oocytes decreased while that of early vitellogenic oocytes increased (Fig. 6). Regarding the number of oocytes from experiment 1, we observed a significant interaction ($p=0.03$) between treatment (ablated/intact)*oocyte stage, but this interaction did not take the days of the experiment into account (Table 3).

The histochemical analysis did not show differences between the treatments of both experiments, that is, all stages of oocyte development appear to have the same distribution of proteins, polysaccharides, and calcium, regardless of ablation. The oocytes in vitellogenesis showed a more pronounced staining in relation to the oogonia and pre-vitellogenic oocytes in the detection of proteins and neutral polysaccharides (Figs. 7 A-D; Tab. 4). The peripheral region of the cytoplasm of pre-vitellogenic oocytes was less reactive to PAS when compared to the central region, which was moderately positive (Fig. 7 B). For proteins, the pre-vitellogenic oocyte cytoplasm staining was more uniform, although a more reactive fine granulation was also observed in the cytoplasm near the nucleus. In the oocytes in vitellogenesis, an intense reaction in the periphery of the cytoplasm was observed (Fig. 7 D). The cytoplasm of follicular cells did not react to the polysaccharide staining, and was poorly stained by the protein detection staining. The oogonia had no reaction to neutral polysaccharides, and showed poor protein positivity (Table 4).

For the detection of calcium, the mature oocytes presented a weaker staining compared to pre-vitellogenic oocytes. Those in vitellogenesis presented a moderately positive staining. The nuclei of the oogonia and follicular cells showed an intense amount of calcium (Figs. 7 E, F).

Table 1. Means of the variables analysed in the females of *Macrobrachium acanthurus* assigned to each treatment (ablated/intact) and to the different days (1, 3, 5, and 7) (n = 14 females x treatment x day) in experiments 1 and 2.

% Survival (Experiment 1 and 2)				
	Days			
Treatments	1	3	5	7
<u>Experiment 1</u>				
Ablated	100.0	100.0	92.9	100.0
Intact	100.0	100.0	100.0	100.0
<u>Experiment 2</u>				
Ablated	100.0	85.7	78.6	57.1
Intact	100.0	85.7	78.6	85.7
% Moulting (Experiment 2)				
	Days			
Treatments	1	3	5	7
Ablated	0.0	35.7	92.9	92.9
Intact	7.1	57.1	100.0	100.0
% Spawning (Experiment 2)				
	Days			
Treatments	1	3	5	7
Ablated	0.0	14.3	42.9	35.7
Intact	0.0	14.3	57.1	71.4

Table 2. F- and p-values for area (%) occupied by oocyte development stage in the ovaries of *Macrobrachium acanthurus* in each treatment (ablated/intact) on different days (1, 3, 5, and 7) of experiments 1 and 2.

Variables	Experiment 1		Experiment 2	
	F	Sig.	F	Sig.
Treatment	.000	1.000	.000	1.000
Day	.000	1.000	.000	1.000
Oocyte stage	39.172	.000	.000	.000
Treatment * day	.000	1.000	.000	1.000
Treatment * oocyte stage	.570	.567	.000	.403
Day * oocyte stage	3.707	.002	.000	.000
Treatment * day * oocyte stage	.529	.786	.000	.074

Table 3. F- and p-values for the number (%) of oocytes per developmental stage in the ovaries of *Macrobrachium acanthurus* in each treatment (ablated/intact) on the different days (1, 3, 5, and 7) of experiments 1 and 2.

Variables	Experiment 1		Experiment 2	
	F	Sig.	F	Sig.
Treatment	.000	1.000	.000	1.000
Day	.000	1.000	.000	1.000
Oocyte stage	29.868	.000	45.314	.000
Treatment * Day	.000	1.000	.000	1.000
Treatment * oocyte stage	3.721	.027	.550	.578
Day * oocyte stage	1.805	.102	6.703	.000
Treatment * day * oocyte stage	.440	.851	.598	.732

Table 4. Histological characteristics of germ cells of the ovaries of *Macrobrachium acanthurus*, regardless of treatment.

Germ Cell	Cytoplasmic granules			
	Protein	Polysaccharide	Lipid	Calcium
Oogonia	+	-	-	++
Pre-vitellogenic	+	+	+	++/+++
In vitellogenesis	++/+++	+++	++	++
Mature	+++	+++	+++	+

(-) negative; (+) weakly positive; (++) moderately positive; (+++) strongly positive

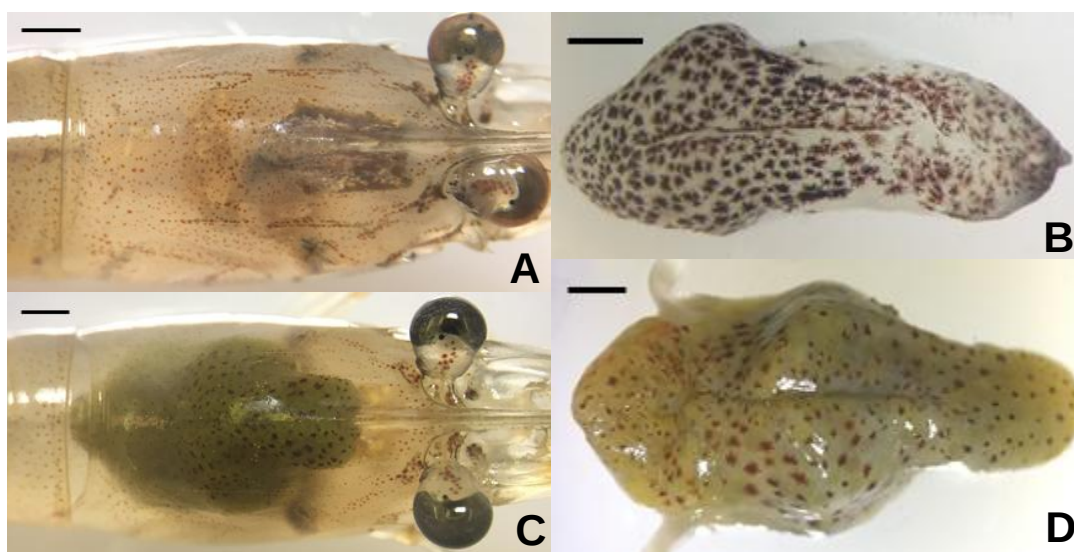


Figure 1. A and C - Dorsal view of the cephalothorax of females of *Macrobrachium acanthurus*. A - Female with ovaries in spent developmental stage; B. Spent ovaries (after spawning); C- Female with developed ovaries and D- Developed ovaries. Scale bar = 2 mm.

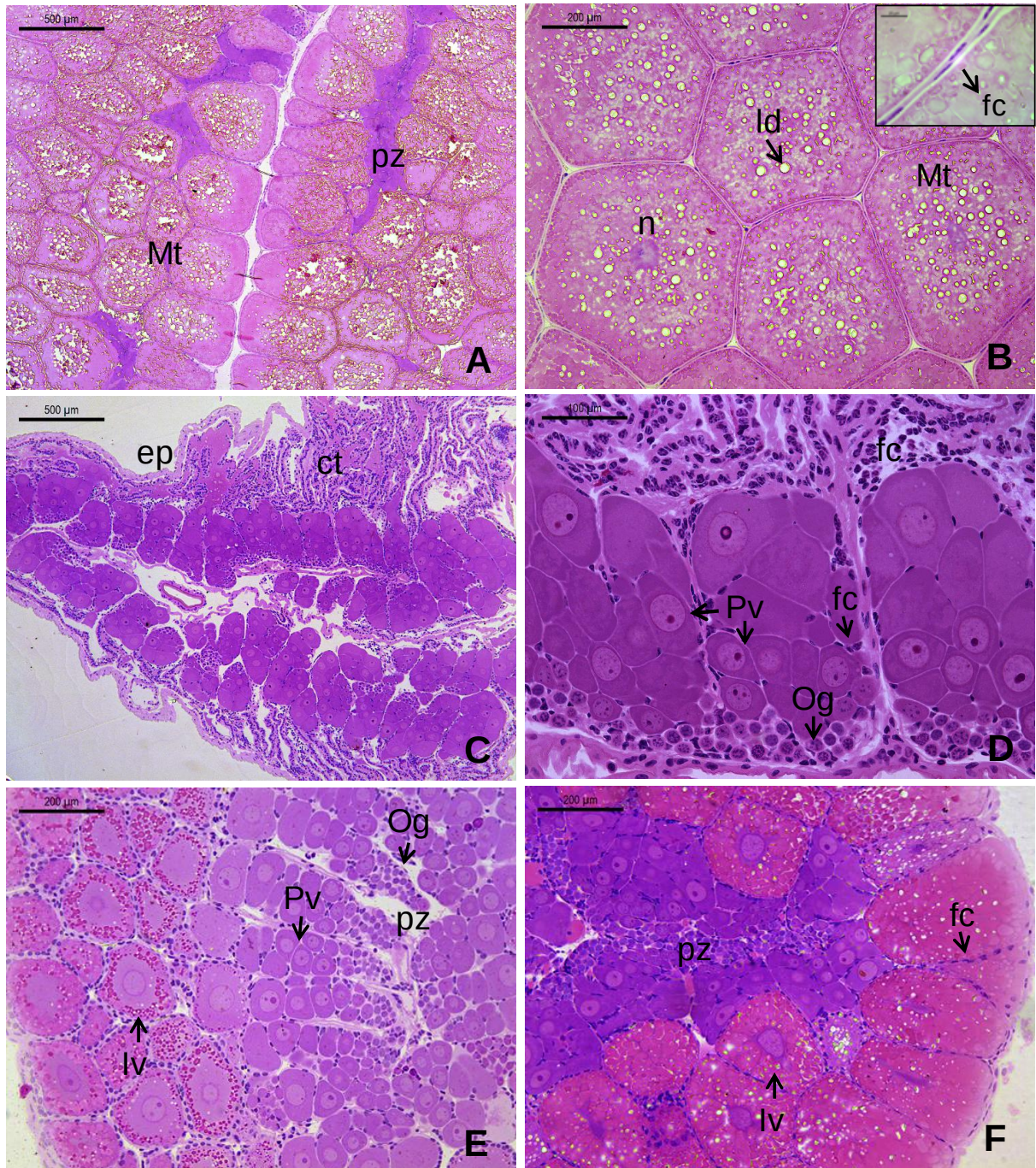
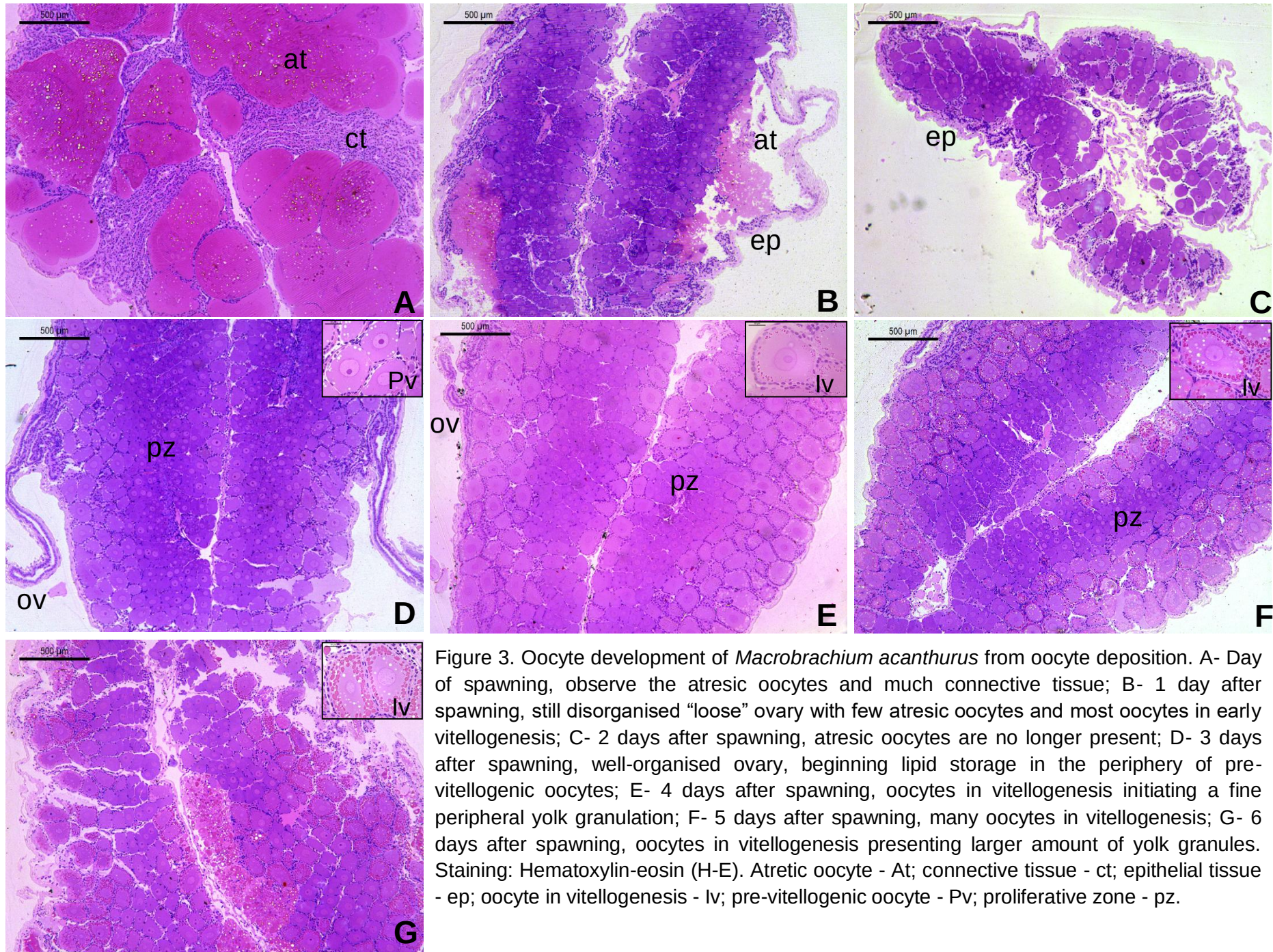


Figure 2. Histological sections of the ovaries of *Macrobrachium acanthurus*. A - "Developed" ovaries, showing a small zone of proliferation and predominance of oocytes in final vitellogenesis (Mature); B- Developed ovaries, note that the mature oocytes are hexaedral-shaped with small nucleus and many lipid droplets, and are also surrounded by flat-shaped follicular cells; C- "Spent" ovaries, note the disorganised ovary with ovarian epithelial tissue with much connective tissue and most oocytes in early vitellogenesis; D- Detail of spent oocyte; E- "Developing" ovaries, evolution of the oocytes from the inside out, in the central region is the proliferative zone (oogonia and pre-vitellogenic oocytes) and in the peripheral region are oocytes in vitellogenesis concentrating yolk granules; F- Detail of a developing gonad showing follicular cells involving oocytes in vitellogenesis that have large accumulation of yolk granules and a still visible nucleus. Staining: Hematoxylin-eosin (H-E). Connective tissue - ct; epithelial tissue - ep; follicular cells - fc; lipid droplet - ld; mature oocyte - Mt; nucleus - n; oocyte in vitellogenesis - lv; oogonia - Og; pre-vitellogenic oocyte - Pv; proliferative zone - pz.



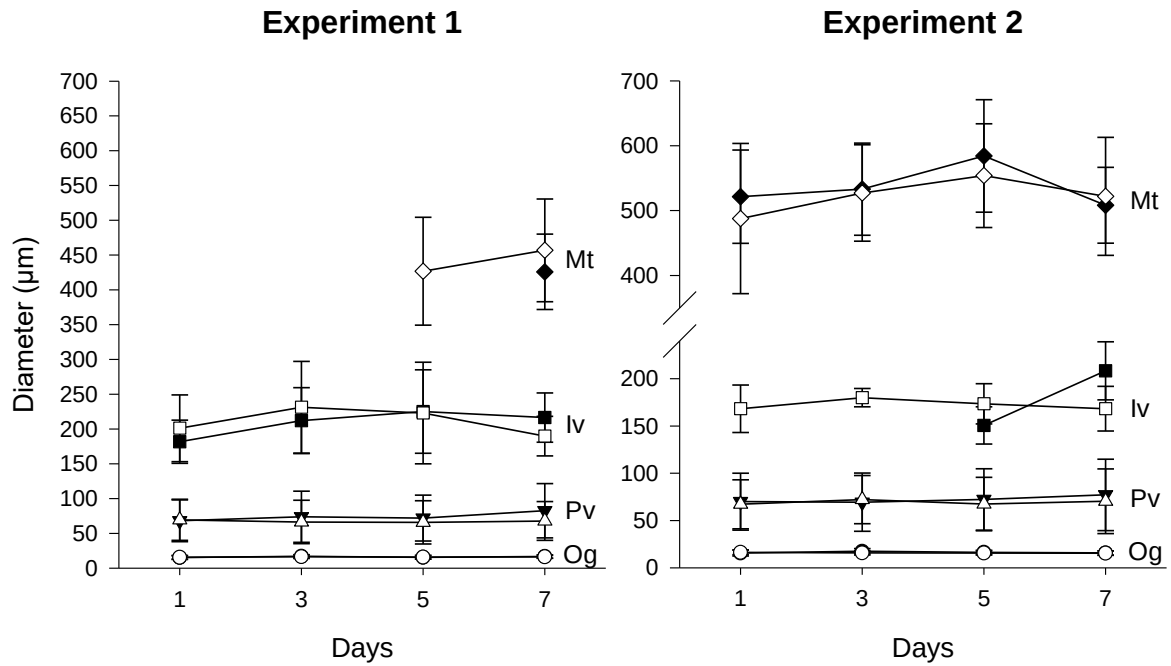


Figure 4. Mean diameter (μm) of oocyte per developmental stage in the ovaries of *Macrobrachium acanthurus* females in both experiments after 1, 3, 5, and 7 days. (Intact- Full symbols; Ablated- Empty symbols). Mature oocyte - Mt; oocyte in vitellogenesis - Iv; oogonia - Og; pre-vitellogenic oocyte - Pv. There was no significant difference ($p > 0.05$) between ablated and intact females.

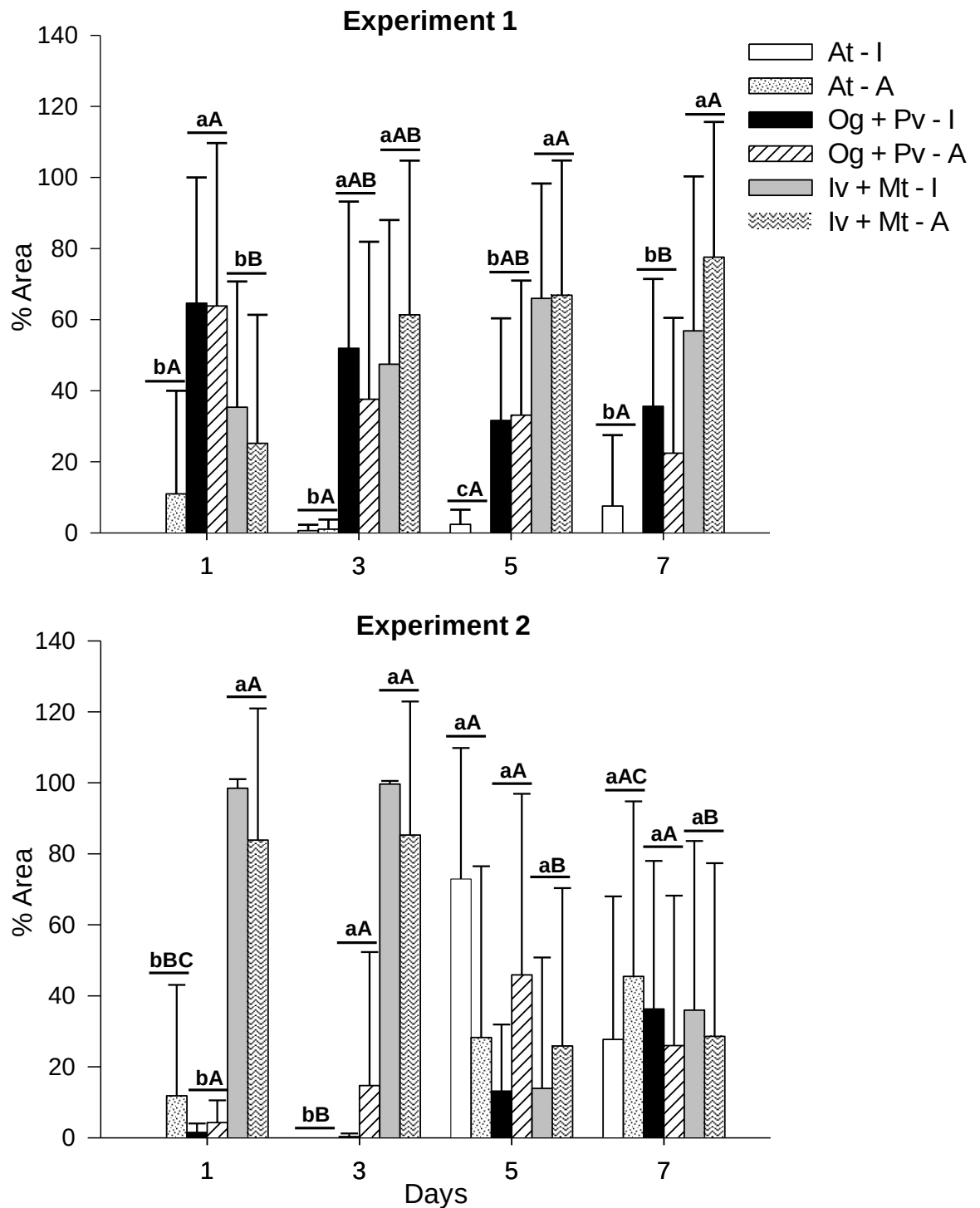


Figure 5. Percentage of area occupied by different developmental stages of oocytes of *Macrobrachium acanthurus* in experiments 1 and 2. Atretic oocyte - At; mature oocyte - Mt; oocyte in vitellogenesis - Iv; oogonia - Og; pre-vitellogenic oocyte - Pv. I- Intact and A- Ablated. Letters refer to the result of the unfolding interaction day*oocyte stage. Bars followed by the same letter do not differ statistically ($p>0.05$), with lowercase comparing the different stages on each day and uppercase comparing each stage on different days.

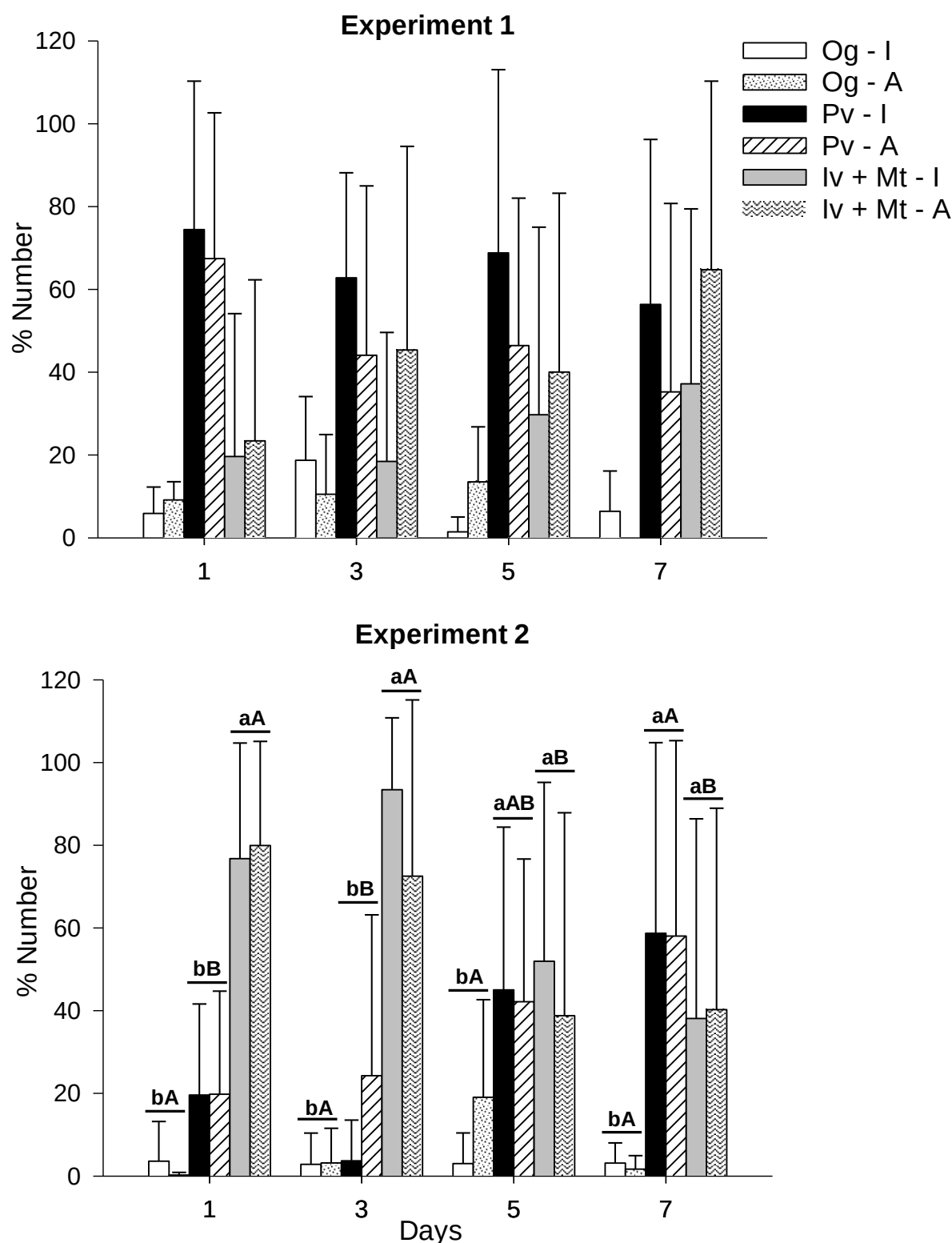


Figure 6. Percentage of number of oocytes per developmental stage in ovaries of *Macrobrachium acanthurus* in experiments 1 and 2. Mature oocyte - Mt; oocyte in vitellogenesis - Iv; oogonia - Og; pre-vitellogenic oocyte - Pv. I- Intact and A- Ablated. Letters refer to the result of the unfolding interaction day*oocyte stage. Bars followed by the same letter do not differ statistically ($p>0.05$), with lowercase comparing the different stages on each day and uppercase comparing each stage on different days.

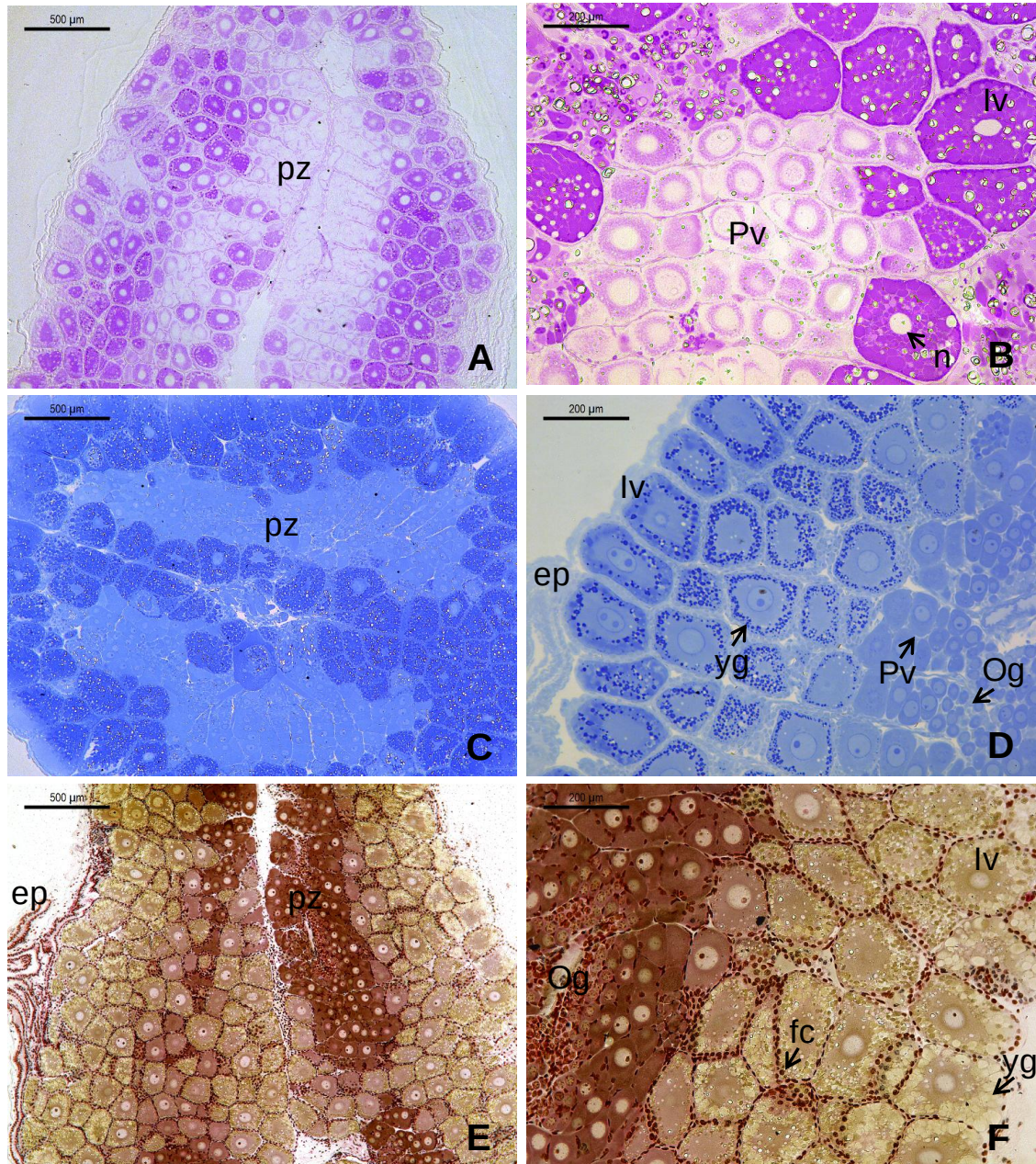


Figure 7. Histological sections of “developing” ovaries of *Macrobrachium acanthurus* submitted to different histochemical staining techniques: periodic acid-schiff (PAS) (A-B), bromophenol blue (C-D), and von Kossa (E-F). A, C- Ovaries showing a central proliferation zone poorly reactive to the neutral polysaccharide and protein test, respectively; B- Highly reactive oocytes in vitellogenesis and pre-vitellogenic oocytes weakly positive for detection of polysaccharides; D- Yolk granules present in the cytoplasm of oocytes in vitellogenesis with intense marking; E- Proliferative zone strongly stained for calcium detection; F- Less stained oocytes in vitellogenesis presenting yolk granules with less calcium and nucleus of intensely stained oogonia. Epithelial tissue - ep; follicular cells - fc; nucleus - n; oocyte in vitellogenesis - lv; oogonia - Og; pre-vitellogenic oocyte - Pv; proliferative zone - pz; yolk granule - yg.

5. DISCUSSION

This study explored the impact of the unilateral eyestalk ablation technique on females of the native Brazilian species *M. acanthurus* for the first time. The histological results obtained in the present study indicated that the size, area (%), and number (%) of the different stages of development of oocytes of *M. acanthurus*, were not influenced by ablation.

The changes observed in the ovaries occurred in relation to area and number of oocytes per stage of development over time. Females with spent ovaries (experiment 1) reduced the amount of oocytes in primary vitellogenesis and increased that of oocytes in secondary vitellogenesis over time. Females with mature ovaries (experiment 2) suffered nuptial moulting and spawning, increasing the amount of atretic oocytes and reducing the amount of oocytes in secondary vitellogenesis. This difference was already expected due to the natural ovarian development, similar to that previously described for this species by Carvalho & Pereira (1981) and other *Macrobrachium* species (Chaves & Magalhães, 1993; Meeratana & Sobhon, 2007).

In general, ovarian development in crustaceans is regulated by the gonad inhibitor/vitellogenesis hormone (GIH) (De Kleijn & Van Herp, 1998), which inhibits the synthesis of vitellogenin (VTG) in the ovaries (Okumura, 2007). With eyestalk ablation, the source of the GIH is removed and the ovaries are released from its suppressive action (Okumura, 2007). However, despite removal of the ocular peduncle, ablation may not be sufficient to accelerate the maturation process in *M. acanthurus*, as found in the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844, by Aktas et al. (2003). In the referred study, the ablation was not sufficient for the occurrence of ovarian maturation and captive spawning in winter periods, requiring temperature and photoperiod control.

In the present study, the ablation process in *M. acanthurus* was performed during the summer, when the reproductive activity of this species is highest in the southern region of São Paulo state (Valenti et al., 1986; Bertini et al., 2014). However, based on a histological comparison of the first reproductive cycle after ablation, we could not find an acceleration in the ovarian development of females, although Cunha & Oshiro (2010) found that the ablation technique played an

important role in ovarian development, and in the reduction of time between spawnings of *M. acanthurus*. However, this study was conducted between autumn and spring, and the stage of development of the ovaries at which females started the experiment was not defined, furthermore, histological analysis of the ovaries was not performed either, making more robust comparisons difficult.

The results found in this study cannot be generalised, as this technique has been widely used since 1970 to increase larval production in marine shrimp farming (Bray & Lawrence, 1992). In freshwater shrimp farming, it has proven to be efficient in gonadal maturation, anticipation of spawning and reduction of the interval between spawnings (Santos & Pinheiro, 2000), and in inducing rapid growth and spawning (Shailender et al., 2013) in females of *M. rosenbergii*. In studies with immature females of *M. dayanum* and *M. lamarrei lamarrei*, an increase in ovarian indices of ablated females was observed when compared to intact females (Pervaiz et al., 2011; Hussain et al., 2017).

Therefore, the results of eyestalk ablation may vary according to species and stage of gonadal maturation at the time of performing the technique. To verify its real efficacy, it should be tested on the species of interest at different stages of gonadal maturation and times of the year. According to Marsden et al. (2007), the variation in ablation efficacy can be attributed to the physiological condition of the shrimp or its nutritional status prior to capture. In this work, although females have matured as expected, there was no acceleration of ovarian maturation in ablated females, so it can be inferred that this variation in the effectiveness of the technique among *Macrobrachium* species, may also have been influenced by genetic and environmental factors.

The rapid ovarian maturation observed for *M. acanthurus*, is another factor that may have contributed to the observation that unilateral eyestalk ablation, does not show the same efficiency found in other species. Regardless of ablation, in just 5 days after spawning, the ovaries were reorganised and had many oocytes in advanced vitellogenesis. This observation shows that *M. acanthurus* is able to release larvae, mate, and spawn in a short period (a few days). This early maturation was probably enhanced by the fact that the experiment was carried out at the end of January; when temperatures are high and the species increases its reproductive rate (Valenti et al., 1986; Bertini et al., 2014).

In shrimp and other decapods, eyestalk ablation is known to result in high mortality (Koshio et al., 1992; Sainz-Hernández et al., 2008; Liu et al., 2014). Nevertheless, no statistical differences were found in the survival rates of ablated and intact females of *M. acanthurus* in both experiments. Santos & Pinheiro (2000) also found high survival rates in unilaterally ablated *M. rosenbergii*.

The highest mortality observed in ablated females occurred after ecdysis, although the difference was not significant. Similar results were obtained for ablated females of *Penaeus monodon* Fabricius, 1798, who had lower survival when compared to non-ablated females, the main cause of mortality being the stress of moulting and cannibalism (Makinouchi et al., 1995). In caridean shrimps, spawning is preceded by moulting, requiring the sharing of energy available for both processes (Varalakshmi & Reddy, 2010; Bauer, 2004). In the present study, females were individualised, thus preventing cannibalism. We suppose that verified mortality occurred, because ablated females spent energy to maintain homeostasis after the loss of the eye peduncle, and were unable to successfully complete the nuptial moult.

The ovarian characteristics found for *M. acanthurus* were similar to those previously described by Carvalho & Pereira (1981). Reproductive activity is cyclic, with 4 stages of gonadal activity: immature (not observed since adult females were used), maturing, mature, and post-spawning. However, Carvalho & Pereira (1981) stated that females of *M. acanthurus* have ovaries with full maturity and partial spawning. In the present experiment, we found that the newly spent ovaries do not have oocytes in secondary vitellogenesis or that they are very few in number. In addition, the remaining oocytes in secondary vitellogenesis were not subsequently spawned, they underwent atresia and were reabsorbed. Thus, we observed that the ovaries had reached the state of fully matured, but showed no evidence of partial spawning in this population of *M. acanthurus*.

With the histochemical analysis of the ovaries, we found that unilateral ablation apparently did not influence the accumulation of nutrients in the ovaries, and therefore possibly ensured oocyte quality. A similar result was also found by Marsden et al. (2007) for the penaeid shrimp *P. monodon*, in which the combination of captivity and unilateral ablation, did not cause significant changes in lipid or protein levels in ovaries that matured during the first post-ablation ovarian development cycle. These results stand contrary to what was found by Varalakshmi & Reddy (2010), who found

that in *M. lanchesteri* ovarian carbohydrate profiles, increased by both unilateral and bilateral ablation, and proteins increased and decreased in unilaterally and bilaterally ablated females, as a function of the ovarian index.

The main constituents of yolk granules are proteins and lipids, which accumulate in the ovaries during vitellogenesis (Chen et al., 1999). Such nutrients are very important for reproduction as yolk substances provide primary nutrition for embryogenesis and early larval development (Browdy et al., 1990; Quackenbush, 2001). Although ocular peduncle hormones regulate carbohydrate, nitrogen, and lipid metabolism in crustaceans (Highnam & Hill, 1977), the formation of *M. acanthurus* oocytes was possibly not impaired by the removal of only one eye, suggesting that this technique was not enough to deregulate vitellogenesis in this species.

The difference in protein and polysaccharide distribution in the *M. acanthurus* oocytes (more intense in the cytoplasm near the nucleus of pre-vitellogenic oocytes and in the peripheral cytoplasm of oocytes in vitellogenesis) indicates that protein synthesis occurs initially endogenously (in the oocyte itself) and later exogenously as observed for *M. rosenbergii* (Meeratana & Sobhon, 2007), *Exhippolysmata oplophoroides* (Holthuis, 1948) (Braga et al., 2016), and *Callichirus major* (Say, 1818) (Souza et al., 2017), among others.

Regarding calcium, a greater accumulation was observed in pre-vitellogenic oocytes, which decreased when it moved to the vitellogenesis stage, as observed in *E. oplophoroides* by Braga et al. (2016). According to the authors, this stage of oocyte development is a temporary storage site for calcium, and with the progressive development of oocytes, calcium is possibly mobilised for constitution of the chorion in the final vitellogenic oocytes, in addition to future cuticle formation in the embryo.

In conclusion, the present study showed that the unilateral eyestalk ablation technique, apparently did not accelerate the ovarian maturation of *M. acanthurus*. Besides this, it did not impair survival, maturation, moulting, and posture. However, to understand the physiological and hormonal changes associated with ovarian maturation and ablation, future work should use hemolymph extraction, observing the hormone and vitellogenin levels in order to verify if ablation generates significant changes in these parameters.

6. REFERENCES

- Akaike, H. (1974). A New look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control AC*, 19, 716-723.
- Aktas, M., & Kumlu, M. (1999). Gonadal maturation and spawning of *Penaeus semisulcatus* (Penaeidae: Decapoda). *Turkish Journal of Zoology*, 23, 61-66.
- Aktas, M., Kumlu, M., & Eroldogan, O. T. (2003). Off-season maturation and spawning of *Penaeus semisulcatus* by eyestalk ablation and/or temperature photoperiod regimes. *Aquaculture*, 288, 361-370.
- Albertoni, E., Palma-Silva, C., & Esteves, F. (2002). Distribution and growth in adults of *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae) in a tropical coastal lagoon, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19, 61-70.
- Anger, K. (2013). Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology*, 33, 151-183. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002124>
- Bauer, R. T. (2004). *Remarkable shrimps. Adaptations and natural history of the carideans* (p. 316). Oklahoma, United States: University Oklahoma Press.
- Bertini, G., & Baeza, J. A. (2014). Fecundity and fertility in a freshwater population of the neotropical amphidromous shrimp *Macrobrachium acanthurus* from the southeastern Atlantic. *Invertebrate Reproduction & Development*, 58, 207-217.
- Bertini, G., Baeza, J. A., & Perez, E. (2014). A test of large-scale reproductive migration in females of the amphidromous shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) from south-eastern Brazil. *Marine and Freshwater Research*, 65, 81-93.
- Bertini, G., & Valenti, W. C. (2010). Importância econômica dos camarões de água doce. In R. B. Silva & L. C. Ming (Eds.), *Relatos de pesquisas e outras experiências vividas no Vale do Ribeira* (pp.155-170). Jaboticabal, Brazil: FUNEP.
- Braga, A. A., Nunes, E. T., López-Greco, L. S., Camargo-Mathias, M. I., & Fransozo, V. (2016). Histological and histochemical features of the oogenesis in the simultaneous protandric hermaphrodite shrimp *Exhippolysmata oplophoroides* (Decapoda: Caridea). *Micron*, 88, 60-67.

- Bray, W., & Lawrence, A. (1992). Reproduction in *Penaeus* species in captivity. In A. W. Fast & J. Lester (Eds.), *Marine shrimp culture: principles and practices* (pp. 93-170). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Browdy, C. L., Fainzilber, M., Tom, M., Loya, Y., & Lubzens, E. (1990). Vitellin synthesis in relation to oogenesis in vitro-incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *The Journal of Experimental Zoology*, 255, 205-215.
- Carvalho, H. A., & Pereira, M. C. G. (1981). Descrição dos estádios ovarianos de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann 1836) (Crustacea, Palaemonidae) durante o ciclo reprodutivo. *Ciência e Cultura*, 33, 1353-1358.
- Chaves, P. T. C., & Magalhães, C. O. (1993). O desenvolvimento ovocitário em *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae), camarão dulcícula da região amazônica. *Acta Amazonica*, 23, 17-23.
- Chen, Y. N., Tseng, D. Y., Ho, P. Y., & Kuo, C. M. (1999). Site of vitellogenin synthesis determined from a cDNA encoding a vitellogenin fragment in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Molecular Reproduction and Development*, 54, 215-222.
- Costa, T. V., Yoshii-Oshiro, L. M., López-Greco, L. S., Melo, E. P., Mattos, L. A., & Bambozzi-Fernandes, A. (2016). Determinación del voltaje y el tamaño del animal óptimos para la extracción de espermatóforos en el camarón de agua dulce *Macrobrachium acanthurus* (Palaemonidae). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44, 422-428.
- Costa, T. V., Yoshii-Oshiro, L. M., Mattos, L. A., López-Greco, L. S., Melo, E. P., & Flor, H. R. (2017). Toxicity, freezing and cold storage test of native species semen. *Boletim do Instituto de pesca*, 43, 334-346.
- Cunha, C. H., & Yoshii-Oshiro, L. M. (2010). The influence of eyestalk ablation on the reproduction of the freshwater *Macrobrachium acanthurus* shrimp in captivity. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 32, 217-221.
- De Kleijn, D. P. V., & Van Herp, F. (1998). Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction & Development*, 33, 263-272.

- FAO. (2020). Fishery and Aquaculture Statistics. [Global Aquaculture Production 1950-2016] (FishStatJ). Rome, Italy: FAO Fisheries and Aquaculture Department. [online]. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>
- Fingerman, M. (1987). The endocrine mechanisms of Crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 7, 1-24.
- Fukuda, B., Bertini, G., Santos, D. C., Braga, A. C. A., & Nunes, E. T. (2013). *Efeito da ablação do pedúnculo ocular no desenvolvimento ovariano de Macrobrachium acanthurus (Palaemonidae)*. IV Congresso Brasileiro de Aquicultura de Espécies Nativas. Belém, Pará, Brazil.
- Highnam, H. C., & Hill, L. (1977). *The comparative endocrinology of the invertebrates* (p. 357). London, England: Edward Arnold Publishers.
- Hussain, S., Yadav, P., Manohar, S., & Parmar, P. (2017). Effect of unilateral eyestalk ablation on ovarian maturation of female freshwater prawn, *Macrobrachium lamarrei lamarrei* {H. Milne Edwards, 1837}. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5, 178-181.
- Junqueira, L. C. U., & Junqueira, L. M. M. S. (1983). *Técnicas básicas de citologia e histologia* (p. 123). São Paulo, Brazil: Santos.
- Koshio, S., Teshima, S., & Kanazawa, A. (1992). Effects of unilateral eyestalk ablation and feeding frequencies on growth, survival and body compositions of the juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 1419-1425.
- Kuo, C., Chen, Y., Fan, H., Chuang, H., & Hsieh, S. (2009). Enhancement of vitellogenin synthesis by secretion by serotonin in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Zoological Studies*, 48, 597- 606.
- Kutty, M. N., Herman, F., & Menn, H. L. (2000). Culture of other prawn species. In M. B. New & W. C. Valenti (Eds.), *Freshwater prawn culture: the farming of Macrobrachium rosenbergii* (pp. 393-410). Oxford, United Kingdom: Blackwell Science.
- Kutty, M. N., & Valenti, W. C. (2010). Culture of other freshwater prawn species. In M. B. New, W. C. Valenti, J. H. Tidwell, L. R. D'Abramo & M. N. Kutty (Eds.), *Freshwater prawns: biology and farming* (pp. 502-523). Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell.

- Li, L., Pan, L., Hu, D., Liu, D., & Liu, M. (2017). The effect of bilateral eyestalk ablation on signal transduction pathways of ion regulation of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48, 145-155.
- Liu, S., Gong, S., Li, J., & Huang, W. (2014). Inducing synchronous ovarian maturation in the crayfish, *Procambarus clarkii*, via eyestalk interventional injection as compared with eyestalk ablation and combined injection of serotonin and domperidone. *Aquaculture Research*, 45, 1402-1414.
- Maciel, C. R., & Valenti, W. C. (2009). Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: A Review. *Nauplius*, 17, 61-79.
- Makinouchi, S., Sugama, K., Ruchimat, T., Tridjoko, Sutarmat, T., & Lante, S. (1995). Effects of eyestalk ablation on maturation, spawning, hatching, molting and growth of precocious pond reared *Penaeus monodon*. *Suisanzoshoku*, 43, 103-108.
- Marsden, G., Mather, P., & Richardson, N. (2007). Captivity, ablation and starvation of the prawn *Penaeus monodon* affects protein and lipid content in ovary and hepatopancreas tissues. *Aquaculture*, 271, 507-515.
- Meeratana, P., & Sobhon, P. (2007). Classification of differentiating oocytes during ovarian cycle in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de man. *Aquaculture*, 270, 249-258.
- Okumura, T. (2007). Effects of bilateral and unilateral eyestalk ablation on vitellogenin synthesis in immature female kuruma prawns, *Marsupenaeus japonicus*. *Zoological Science*, 24, 233-240. <https://doi.org/10.2108/zsj.24.233>
- Okumura, T., & Aida, K. (2001). Effects of bilateral eyestalk ablation on molting and ovarian development in the giant freshwater prawn, *M. rosenbergii*. *Fisheries Science*, 67, 1125-1135. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00370.x>
- Pervaiz, P. A., Jhon, S. M., Sikdar-Bar, M., Khan, H. A., & Wani, A. A. (2011). Studies on the effect of unilateral eyestalk ablation in maturation of gonads of a freshwater prawn *Macrobrachium dayanum*. *World Journal of Zoology*, 6, 159-163.
- Pileggi, L. G., Rossi, N., Wehrtmann, I. S., & Mantelatto, F. L. (2014). Molecular perspective on the American transisthmian species of *Macrobrachium* (Caridea, Palaemonidae). *ZooKeys*, 457, 109-131.

- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & R Core Team. (2017). *nlme: linear and nonlinear mixed effects models*. R package.
- Primavera, J. H. (1985). A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In Y. Taki, J. H. Primavera & J. A. Llobrera (Eds.), *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps* (pp. 47-64). Iloilo City, Philippines, SAEFDEC Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Quackenbush, L. S. (2001). Yolk synthesis in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *American Zoologist*, 41, 458-464.
- Ravi, R., Manisseri, M. K., & Sanil, N. K. (2013). Ovarian maturation and oogenesis in the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* (Decapoda: Portunidae). *Acta Zoologica*, 94, 291-299.
- Revathi, P., Iyapparaj, P., Vasanthi, L. A., Jeyanthi, S., Sankaralingam, S., Ramasubburayan, R., Prakash, S., & Krishnan, M. (2013). Impact of eyestalk ablation on the androgenic gland activity in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5, 373-381.
- R Core Team. (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rodrigues, M. M., Almeida, L. C. F., & Bertini, G. (2018). Survival rate of *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) larvae in laboratory conditions under different salinities and diets. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 13, 121-130.
- Rodrigues, R. A., Vetorelli, M. P., & Araújo, P. F. R. (2017). Regime alimentar na larvicultura de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) em sistema aberto. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 10, 17-30.
- Sainz-Hernández, J. C., Racotta, I. S., Dumas, S., & Hernández-López, J. (2008). Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture*, 283, 188-193.
- Santos, M. J. M., & Pinheiro, M. A. A. (2000). Ablação ocular no camarão *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae):

- efeitos sobre a reprodução, pigmentação epidérmica e atividade alimentar. *Revista Brasileira de Zoologia*, 17, 667-680.
- Sindhukumari, S., & Pandian, T. J. (1987). Effects of unilateral eyestalk ablation on moulting, growth, reproduction and energy budget of *Macrobrachium nobilii*. *Asian fisheries Science*, 1, 1-17.
- Shailender, M., Amarnath, D., Kishor, B., & Suresh, B. C. H. (2013). Effect of unilateral eyestalk ablation (UEA) on the reproductive success of giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) in captivity. *International Journal of Chemical and Life sciences*, 2, 1112-1120.
- Sharifian, S., Kamrani, E., Safaie, M., & Sharifian, S. (2015). Oogenesis and ovarian development in the freshwater crab *Sodhiana iranica* (Decapoda: Gecarcinuidae) from the south of Iran. *Tissue Cell*, 47, 213-220.
- Souza, T. L., Braga, A. A., López-Greco, L. S., & Nunes, E. T. (2017). Dynamics of oogenesis in ghost shrimp *Callichirus major* (Crustacea: Axiidea): a morphofunctional and histochemical study. *Acta Histochemica*, 119, 769-777.
- Tamburus, A. F., Mossolin, E. C., & Mantelatto, F. L. (2012). Populational and Reproductive aspects of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea: Palaemonidae) from north coast of São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 16, 9-18.
- Tsukimura, B. (2001). Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *American Zoologist*, 41, 465-476.
- Valenti, W. C., Mello, J. T. C., & Lobão, V. L. (1986). Dinâmica da reprodução de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) e *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Ciência e Cultura*, 38, 349-355.
- Varalakshmi, K. N., & Reddy, R. (2010). Effects of eyestalk ablations on growth and ovarian maturation of the freshwater prawn *Macrobrachium lanchesteri* (de Man). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10, 403-410.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Elphick C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1, 3-14.

DESEMPENHO REPRODUTIVO EM FÊMEAS DE
Macrobrachium acanthurus (CRUSTACEA, PALAEMONIDAE)
SUBMETIDAS À ABLAÇÃO UNILATERAL DO PEDÚNCULO
OCULAR

1. RESUMO

A técnica de ablação do pedúnculo ocular é conhecida por induzir maturação e desova em muitas produções comerciais de camarões peneídeos em todo o mundo, apesar de também estar associada à menor qualidade de descendentes. Neste sentido, o presente estudo investigou o efeito de tal técnica no desempenho reprodutivo de fêmeas do carídeo *Macrobrachium acanthurus* por meio de dois experimentos (fertilidade e fecundidade). Em ambos os experimentos foram utilizadas fêmeas com comprimento de carapaça entre 12-15 mm apresentando estágio esgotado de desenvolvimento gonadal, divididas em 2 tratamentos: abladas unilateralmente e intactas (não-abladas). Essas fêmeas foram mantidas em aquários até a maturação dos ovários e, posteriormente, colocadas para o acasalamento, na proporção de 2 fêmeas para cada macho. As fêmeas ovadas foram individualizadas em recipientes de 1 L e mantidas por 3 dias para a análise de fecundidade e até a eclosão das larvas para a fertilidade. A fecundidade e a fertilidade foram maiores nas fêmeas intactas (1741 ovos e 1045 larvas) quando comparadas às fêmeas abladas (1373 ovos e 741 larvas). A ablação também reduziu a porcentagem de fêmeas com ovos (68% intactas vs 49% abladas) e larvas viáveis (82% intactas vs 64% abladas). Além disso, com o uso da técnica foi observado o aumento da perda de embriões e diminuição do tamanho das larvas. O formato (elipsoide) e o volume do ovo foram semelhantes nos dois tratamentos, assim como a duração do desenvolvimento embrionário que foi de aproximadamente 11 dias. Os resultados desse trabalho esclarecem muitos pontos sobre a viabilidade do uso da técnica de ablação unilateral do pedúnculo ocular em fêmeas de *M. acanthurus* em cultivos comerciais, sugerindo que apesar de exibir alta taxa de sobrevivência, pode reduzir o desempenho reprodutivo.

Palavras-chave: Camarão-canela; Cativo; Desova; Fecundidade; Fertilidade; Reprodução.

2. INTRODUÇÃO

No Brasil, os camarões do gênero *Macrobrachium* Spence Bate, 1861 são representados por 17 espécies (Pileggi & Mantelatto, 2012), das quais apenas três apresentam interesse econômico e alto potencial de cultivo: *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836), *M. carcinus* (Linnaeus, 1758) e *M. amazonicum* (Heller, 1862) (Bertini & Valenti, 2010). *Macrobrachium acanthurus* é um camarão de água doce popularmente conhecido como “camarão-canela” (Kutty & Valenti, 2010), apresenta ampla distribuição geográfica em rios, estuários e pequenas lagoas que deságuam no Oceano Atlântico (Tamburus et al., 2012).

O camarão-canela é um recurso natural muito explorado pela pesca artesanal no Brasil, principalmente, nos rios das bacias do Rio Amazonas, do Araguaia-Tocantins e do Atlântico Sul-trechos norte e nordeste, nos açudes do semiárido do Nordeste, nos rios da bacia do baixo São Francisco (Estados da Bahia, Alagoas e Sergipe) e nas bacias dos Rios Paraíba do Sul e Ribeira de Iguape, da bacia do Atlântico Sul, trechos sudeste e sul (New et al., 2000). Na bacia do Ribeira de Iguape (SP), é fortemente explorado pela pesca artesanal, tanto para consumo humano quanto para o mercado de iscas vivas e pesca esportiva, atividade muito comum na região (Bertini & Valenti, 2010). Essa atividade provoca uma forte redução do estoque, comprometendo esse recurso pesqueiro e afetando seu ciclo reprodutivo (Bertini & Baeza, 2014; Bertini et al., 2014).

A reprodução de *M. acanthurus* no sul do estado de São Paulo acontece ao longo do ano todo, embora apresente maior atividade reprodutiva durante o verão (Valenti et al., 1986; Bertini et al., 2014). Sua estratégia reprodutiva envolve as fêmeas carregarem um grande número de ovos relativamente pequenos (Albertoni et al., 2002; Bertini & Baeza, 2014), característica típica de camarões anfídromos que requerem um ambiente estuarino para completar seu ciclo de vida (Wowor et al., 2009; Bauer, 2013).

Um dos fatores chave na carcinicultura é o conhecimento da capacidade reprodutiva da espécie, sendo a fecundidade (número de ovos) e a fertilidade (número de larvas) de grande importância para avaliar o seu potencial para cultivo comercial (Lobão et al., 1986; Valenti et al., 1989), principalmente, por ser uma

informação essencial para a manutenção do estoque de reprodutores na realização de larviculturas em escala comercial (Jee & Kok, 1991).

Os camarões do gênero *Macrobrachium* normalmente maturam e se reproduzem em cativeiro sem a necessidade de qualquer manipulação especial das condições ambientais ou uso de ablação ocular (New et al., 2010). Já na carcinicultura de peneídeos a produção de ovos e larvas é frequentemente estimulada através da técnica de ablação do pedúnculo ocular para a aceleração da maturação ovariana de reprodutores, principalmente, em espécies que não maturam e desovam espontaneamente em cativeiro (Benzie, 1998; Kuo et al., 2009).

Nos decápodes, o complexo órgão X-glândula do seio está localizado no pedúnculo ocular e tem a função de secretar o hormônio inibidor das gônadas (HIG) (Tan-Fermin, 1991). A ablação do pedúnculo ocular destrói o órgão-X, reduzindo o nível de HIG na hemolinfa e, conseqüentemente, induz a maturação ovariana (Wen et al., 2015). No entanto, resultados conflitantes foram relatados sobre o efeito da ablação ocular unilateral na reprodução e qualidade da progênie de camarões peneídeos (Tan-Fermin, 1991).

Estudos com peneídeos demonstram que as fêmeas abladas apresentam menores números de ovos e sucessos de eclosão quando comparadas com as fêmeas não-abladas (Emmerson, 1980) e que a superestimulação da reprodução de camarões ablados em cativeiro pode reduzir a performance reprodutiva, diminuindo a fecundidade, a fertilidade e a taxa de eclosão de fêmeas de várias espécies (Uddin & Rahman, 2015). Adicionalmente, a ablação ocular afeta muitos aspectos da fisiologia do camarão, acelerando a reprodução e muda, exigindo energia adicional para os dois processos ao mesmo tempo, podendo influenciar o desempenho reprodutivo das fêmeas, reduzindo a qualidade da progênie (Zacarias et al., 2019). Essa diminuição da qualidade da prole pode não ser uma consequência direta da ablação do pedúnculo ocular, mas um efeito da reprodução forçada durante um curto período (Racotta et al., 2003).

Para os carídeos, alguns estudos foram efetuados sobre os efeitos da ablação ocular na produção de ovos e larvas (Santos & Pinheiro, 2000; Bastos et al., 2018), mas a grande parte das pesquisas abordam, principalmente, o efeito da técnica na maturação gonadal (Han & Kim, 1993; Okumura & Aida, 2001; Pandey & Kumar, 2006; Kuo et al., 2009; Varalakshmi & Reddy, 2010; Pervaiz et al., 2011;

Hussain et al., 2017). Com relação a *M. acanthurus*, somente Cunha & Oshiro (2010) analisaram os efeitos da ablação do pedúnculo ocular em fêmeas. Estes autores testaram a influência da técnica na fertilidade, no intervalo e no número de desovas, porém, não abordaram a fecundidade e nem outros parâmetros que auxiliam na avaliação do desempenho reprodutivo.

Em camarões cultivados, fatores como a condição fisiológica, variabilidade genética, nutrição, condições de cultivo, tamanho, idade, origem e possíveis manipulações endócrinas dos reprodutores podem influenciar na qualidade da prole (Racotta et al., 2003). Maiores taxas de fecundidade, fertilização e eclosão são os principais objetivos de uma instalação de larvicultura, sendo assim, a maioria das pesquisas que avalia o desempenho reprodutivo baseia seu sucesso nesses critérios de produção (Zacarias et al., 2019).

Atualmente não existem dados sobre a fecundidade e/ou fertilidade de *M. acanthurus* mantidos em cativeiro, sendo que os resultados disponíveis foram realizados com fêmeas ovadas capturadas da natureza. Desses, destacam-se os realizados no Brasil com populações do Vale do Ribeira, SP (Valenti et al., 1989; Bertini & Baeza, 2014); Florianópolis, SC (Müller et al., 1992); São Sebastião, SP (Anger & Moreira, 1998; Tamburus et al., 2012) e Macaé, RJ (Albertoni et al., 2002). No México, foram utilizadas fêmeas de Veracruz (Mejía-Ortíz et al., 2001) e Campeche (Román-Contreras & Campos-Lince, 1993; Cruz-Sánchez, 2018).

No primeiro capítulo dessa tese, com base nas análises histológicas e histoquímicas dos ovários de fêmeas abladas e intactas de *M. acanthurus*, não foi possível detectar diferenças nos oócitos, porém como as análises foram principalmente qualitativas, há a necessidade de verificar a verdadeira capacidade reprodutiva de fêmeas submetidas à técnica de ablação. Sendo assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o desempenho reprodutivo de fêmeas submetidas à técnica de ablação unilateral peduncular, levando em consideração as seguintes variáveis: número e volume dos ovos, número e tamanho das larvas e período de desenvolvimento embrionário.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de *M. acanthurus*

Os camarões foram obtidos no Rio Ribeira de Iguape (24°64'87"S, 47°51'09"W), no município de Iguape, sul do estado de São Paulo, Brasil. Com o intuito de avaliar o efeito da ablação unilateral do pedúnculo ocular sobre o desempenho reprodutivo de *M. acanthurus*, no mês de fevereiro/18 foi realizado o experimento sobre a fertilidade e, em outubro/18, o experimento sobre a fecundidade.

Em laboratório, para ambos experimentos, os animais recém-coletados foram desinfetados em formaldeído (25 ppm) por 30 minutos. Em seguida, foram selecionadas somente as fêmeas adultas com ovários no estágio esgotado (pós-liberação dos oócitos), encontrado nas fêmeas ovígeras que estão com os ovos em estágio inicial do desenvolvimento embrionário, de acordo com Carvalho & Pereira (1981) (Fig. 1). Tais fêmeas foram mensuradas na região do comprimento da carapaça (CC) (do seio orbital ao ponto médio da margem posterior da carapaça) sendo selecionadas as que possuíam o tamanho entre 12 – 15 mm.

Em relação aos machos, estes foram coletados 7 dias após as fêmeas, sendo selecionados os indivíduos de morfotipo dominante na população, caracterizados por possuir quelípodos com espinação robusta no carpo e própodo e pubescência nos dedos fixo e móvel (Bertini et al., em preparação) e pela visualização macroscópica da presença do vaso deferente distal e ampola terminal na base do quinto par de pereiópodos com aspecto esbranquiçado o que representa que os testículos estão desenvolvidos (Figs. 2 A, B).

3.2. Manutenção dos animais, ablação e maturação dos ovários

Antes da ablação, as fêmeas foram aclimatizadas por um dia no laboratório. O método de ablação unilateral do pedúnculo ocular utilizado foi adaptado do descrito para camarões marinhos por Primavera (1985). Antes da ablação, foi aplicada a pomada anestésica Lidocaína® na base do pedúnculo ocular, em seguida, o corte foi feito próximo à base com uma tesoura. O local da incisão foi cauterizado

"a quente" com um ferro de solda. Nos locais cauterizados foi ministrada uma mistura de pomadas antibióticas (Furacin[®] e Terramicina[®]), na proporção 1:1. A técnica de ablação foi realizada rapidamente sob estereomicroscópio para minimizar o estresse dos animais.

As fêmeas unilateralmente abladas e as intactas (não abladas) foram separadas em caixas pretas de polietileno com capacidade para 60L providas com água doce em sistema de recirculação de água com aeração constante. Tais fêmeas ovígeras foram mantidas nesses tanques até a liberação das larvas e rematuração dos ovários, ou seja, de 8 a 12 dias. Para evitar o estresse, foram colocados pedaços de canos de PVC e macrófitas aquáticas artificiais, possibilitando áreas de refúgio aos animais. O fotoperíodo foi de 12 h em luz e 12 h no escuro. A temperatura da água ficou mantida a $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com um aquecedor acoplado a um termostato. Durante esse período, os animais foram alimentados diariamente com pedaços de lula e ração para camarões de água doce adultos (30% de proteína bruta) (Nutriave[®]) na taxa de 3% da biomassa dividida duas vezes ao dia, os restos dos alimentos foram sifonados das caixas para manter a qualidade da água.

Os machos foram mantidos nos tanques de reprodução (24 L) nas mesmas condições de alimentação, fotoperíodo e temperatura que as fêmeas.

3.3. Reprodução para obtenção de fêmeas ovígeras

Ambos experimentos (fecundidade e fertilidade) tiveram 2 tratamentos: fêmeas abladas unilateralmente e intactas. As fêmeas de cada tratamento foram transportadas para as caixas de reprodução (24 L), onde os machos estavam, à medida que os ovários atingiam o estágio maduro (coloração verde escura ocupando toda a região dorsal do cefalotórax). A proporção sexual nestas caixas foi de 2 fêmeas para 1 macho, totalizando 12 indivíduos por caixa. A alimentação e os parâmetros de qualidade de água foram mantidos como o descrito para o período de maturação gonadal. Diariamente, foi observada a presença de muda nupcial das fêmeas e exteriorização dos ovos.

A reprodução finalizou quando foram obtidas 65 fêmeas ovadas/tratamento para a análise de fecundidade e 45 fêmeas ovadas/tratamento para a fertilidade. Em seguida, as fêmeas ovadas foram retiradas das caixas e transferidas para

recipientes individuais de 1 L de volume de água doce com aeração constante e com um pedaço de cano PVC para possibilitar abrigo. As fêmeas foram mantidas em incubadora do tipo BOD (Eletrolab[®], EL 202) com temperatura em $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro. Como alimento, foram ofertados pedaços de lula e ração extrusada para camarões de água doce adultos (30% de proteína bruta) no período da manhã *ad libitum*. Diariamente, após a alimentação, a água foi trocada totalmente dos recipientes, e realizada a observação para detecção de viabilidade e/ou aborto dos embriões ou morte das fêmeas.

3.4. Análise da fecundidade e fertilidade

Para a detecção da fecundidade, três dias após a exteriorização dos ovos as fêmeas com embriões viáveis foram anestesiadas por choque térmico em um recipiente com água e gelo com intuito de retirar os ovos. A fim de determinar o volume do ovo, um total de 15 ovos foi retirado aleatoriamente de cada fêmea recém-anestesiada. Estes ovos foram colocados na lâmina (sem lamínula) e imediatamente fotografados em um microscópio (Leica DM2500[®]) provido de sistema de imagem (software Leica LAS EZ 3.0.0: Leica Microsystems[®]) para a posterior mensuração. Em seguida, toda a massa de ovos aderida no abdome foi cuidadosamente extraída pelo corte dos pleópodos e acondicionada em frascos contendo álcool 70%. Posteriormente, os pleópodos foram imersos em um erlenmeyer contendo hipoclorito de sódio (0,05%), que foi gentilmente agitado até o ponto em que todos os ovos foram separados dos pleópodos. Finalmente, o número de ovos foi contado em sua totalidade sob um estereomicroscópio. Posteriormente, foram calculadas a fecundidade ($F_c = n^{\circ}\text{ovos} \cdot \text{fêmea}^{-1}$) e fecundidade relativa ($F_{cr} = n^{\circ}\text{ovos} \cdot \text{comprimento da carapaça da fêmea}^{-1} \cdot \text{fêmea}^{-1}$).

Para o volume dos ovos as medidas foram efetuadas na região do maior diâmetro (L_d = funículo até a margem oposta) e menor diâmetro (S_d = entre as margens laterais, oposto ao funículo) com o uso do sistema de imagem acoplado ao microscópio. A razão L_d / S_d de cada ovo medido foi calculada para determinação do formato do ovo, podendo ser esférico ($L_d / S_d = 1$) ou elipsóide ($L_d / S_d \neq 1$). O volume do ovo foi calculado de acordo com Odinetz-Collart & Rabelo (1996) pela seguinte fórmula: $V = \pi \cdot L_d \cdot S_d^2 / 6$, onde $\pi = 3,14$.

Para a detecção da fertilidade, as fêmeas ovadas foram acompanhadas diariamente durante o período de desenvolvimento embrionário. Após a eclosão das zoeas I, estas foram retiradas dos recipientes pela filtragem da água em uma rede com malha de 125 µm de diâmetro, transferidas para recipiente com álcool (70%) e contadas sob um estereomicroscópio. Posteriormente, foram calculadas a fertilidade ($Ft = n^{\circ} \text{larvas eclodidas} \cdot \text{fêmea}^{-1}$) e fertilidade relativa ($Ftr = n^{\circ} \text{ de larvas eclodidas} \cdot \text{comprimento da carapaça da fêmea}^{-1} \cdot \text{fêmea}^{-1}$). O comprimento da carapaça das larvas (da extremidade do rostro até a margem posterior da carapaça) (Fig. 3) foi medido com o sistema de imagem acoplado ao microscópio utilizando uma amostragem aleatória de 15 larvas/fêmea.

A perda de embriões ocorrida ao longo do desenvolvimento embrionário foi calculada pela diferença das médias entre fecundidade e fertilidade (Bertini & Baeza, 2014).

3.5. Análises estatísticas

Em todas as variáveis analisadas os resultados foram comparados entre os tratamentos (fêmeas abladas e intactas). As análises estatísticas para número de fêmeas com ovos/larvas viáveis e perda de ovos foram realizadas no programa BioEstat 5.3 usando o teste Binomial para duas proporções. O restante das análises estatísticas foi realizado no programa SPSS (Trial version). Os dados referentes às fêmeas, ovos e larvas foram verificados tanto em relação à variância das amostras quanto à hipótese de igualdade pelo teste de Levene e, posteriormente, foi realizado um teste t para averiguar a igualdade das médias de duas amostras independentes. Todas as diferenças foram testadas com um intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

4.1. Comprimento da carapaça das fêmeas

Não houve diferença estatística do CC médio das fêmeas intactas e abladas utilizadas no experimento de fecundidade ($13,99 \pm 0,95$ mm- intactas e $14,0 \pm 0,75$ mm- abladas) (Teste $t = -0,519$; $p > 0,05$) assim como no de fertilidade ($13,98 \pm 0,84$ mm- intactas e $13,61 \pm 0,85$ mm- abladas) (Teste $t = 1,770$; $p > 0,05$).

4.2. Fêmeas com ovos e larvas viáveis

Para a análise de fecundidade, do total de 65 fêmeas ovadas/tratamento (ablada/intacta), houve mortalidade de somente 2 fêmeas abladas. Das fêmeas sobreviventes, 43 intactas (68,25%) e 32 abladas (49,23%) tiveram ovos viáveis. A diferença entre os tratamentos foi confirmada pelo teste de proporções, ou seja, o tratamento de fêmeas intactas teve um maior número de fêmeas com ovos viáveis ($p = 0,03$). O restante das fêmeas apresentou ovos não fecundados, que apresentavam coloração amarela opaca e fungaram ao longo dos 3 dias. Estes ovos foram descartados e não foram contados.

Na análise de fertilidade foram usadas 45 fêmeas ovadas/tratamento, 37 das intactas (82,22%) e 28 das abladas (63,63%) tiveram as larvas eclodidas, apresentando diferenças entre os tratamentos ($p = 0,02$). Não houve mortalidade no tratamento de fêmeas intactas, e apenas 1 fêmea ablada morreu. As outras fêmeas que não tiveram as larvas eclodidas, abortaram os ovos ou apresentaram estes fungados ao longo do desenvolvimento embrionário.

4.3. Fecundidade e volume dos ovos

As médias de fecundidade e fecundidade relativa das fêmeas intactas foram maiores em relação às fêmeas abladas (fecundidade: Teste $t = 2,701$; fecundidade relativa: Teste $t = 2,985$; $p < 0,05$) (Tab. 1). Os ovos exibiram uma forma elipsoide, tanto nas fêmeas abladas quanto nas intactas, conforme evidenciado pela razão $Ld/Sd \neq 1$ e, ainda, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos

(Teste $t = 1,179$; $p = 0,24$). Além disso, não houve diferença estatística no volume dos ovos de fêmeas abladas e intactas (Teste $t = -0,803$; $p > 0,05$) (Tab. 1).

4.4. Fertilidade e comprimento da carapaça das larvas

As fêmeas intactas apresentaram maiores valores médios tanto de fertilidade (Teste $t = -2,838$; $p < 0,05$) como de fertilidade relativa em relação às abladas (Teste $t = 2,675$; $p < 0,05$) (Tab. 1). Nas fêmeas intactas, também foi observado que o comprimento de carapaça das larvas recém-eclodidas foi maior em relação às larvas de fêmeas abladas ($p < 0,05$) (Tab. 1).

4.5. Duração do desenvolvimento embrionário

A média do período de desenvolvimento embrionário foi sutilmente maior nas fêmeas intactas ($11,59 \pm 0,50$ dias) quando comparada às abladas ($11,18 \pm 0,77$ dias), mas apresentou diferença estatística entre os tratamentos ($p = 0,01$).

4.6. Embriões perdidos

Os valores de fertilidade média foram menores que os encontrados para fecundidade em ambos os tratamentos. A perda média de ovos foi de 38% em fêmeas intactas e 46% nas abladas, apresentando diferença estatística entre os tratamentos ($p = 0,0001$).

Tabela 1. Médias de fecundidade, fertilidade, volume de ovos e comprimento da carapaça das larvas (CC) de *Macrobrachium acanthurus* provenientes de reprodução em cativeiro nos diferentes tratamentos (ablada/intacta).

Tratamento	Fecundidade		Fecundidade relativa	Volume dos ovos (mm ³)
	média ± dp	min-máx		
Intacta	1741,26 ± 600,15 a	506-3204	124,15 a	0,091 ± 0,007 a
Ablada	1372,91 ± 561,83 b	484-2590	97,27 b	0,090 ± 0,005 a

Tratamento	Fertilidade		Fertilidade relativa	CC das larvas (mm)
	média ± dp	min-máx		
Intacta	1045,16 ± 409,93 a	108-1819	74,50 a	0,777 ± 0,019 a
Ablada	740,79 ± 451,25 b	58-1936	54,19 b	0,764 ± 0,025 b

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

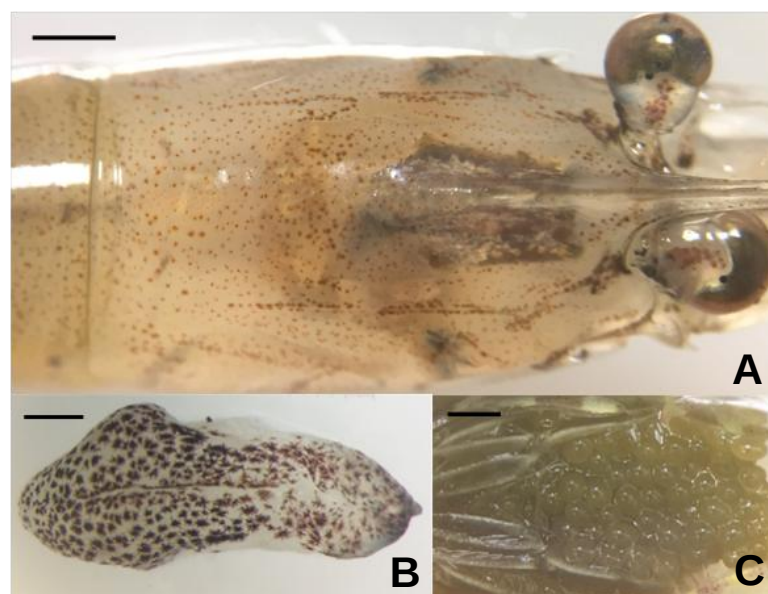


Figura 1. A- Vista dorsal do cefalotórax de *Macrobrachium acanthurus* com ovários no estágio de desenvolvimento esgotado (pós-desova); B- Ovários esgotados; C- Ovos em estágio inicial de desenvolvimento. Barra de escala- 2 mm.

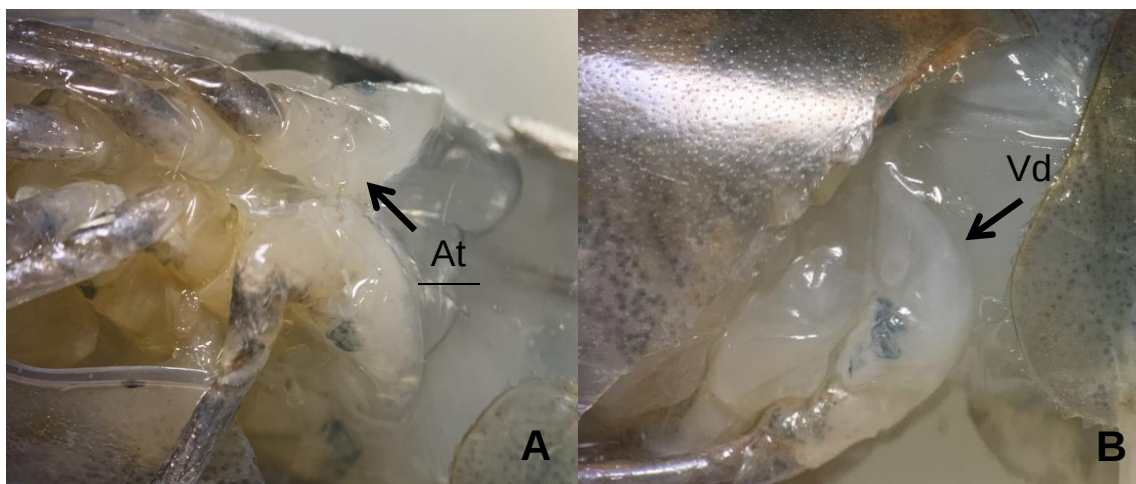


Figura 2. Exemplar macho de *Macrobrachium acanthurus* em estágio maduro de desenvolvimento gonadal (CC = 22,5 mm). A- Vista ventral mostrando a ampola terminal (At) esbranquiçada na base do quinto par de pereiópodos; B- Vista lateral da carapaça cortada, evidenciando vaso deferente (Vd) esbranquiçado desde a parte superior do cefalotórax até a base do quinto par de pereiópodos.



Figura 3. Larva de *Macrobrachium acanthurus* no estágio de zoea I evidenciando o comprimento de carapaça (CC), mensurado da ponta do rostro até a margem posterior da carapaça.

5. DISCUSSÃO

A técnica de ablação do pedúnculo ocular é conhecida por induzir picos de maturação e desova em muitas produções comerciais de camarões peneídeos e instalações de pesquisa em todo o mundo (Kumlu et al., 2011), apesar de também estar associada à baixa qualidade de descendentes (Primavera & Posadas, 1981). No presente estudo, o uso dessa técnica também influenciou no desempenho reprodutivo do camarão *M. acanthurus* em relação ao número de ovos produzidos (fecundidade), a quantidade (fertilidade) e tamanho das larvas e perda de embriões.

De acordo com estudos prévios, sabe-se que a fecundidade e a fertilidade de *M. acanthurus* aumentam com o tamanho do corpo das fêmeas (Bertini & Baeza, 2014). Entretanto, o fato das fêmeas abladas e intactas não terem apresentado diferenças entre a média de CC em cada experimento, confirma que apresentaram tamanhos semelhantes não influenciando os resultados dos experimentos.

A quantidade de fêmeas ovadas de *M. acanthurus* que produziu ovos/larvas viáveis diminuiu com a técnica da ablação ocular. Resultados similares foram obtidos por Bray et al. (1990) com fêmeas abladas do camarão peneídeo *Penaeus stylirostris* Stimpson, 1871, no qual foi observado uma alta variação no desempenho reprodutivo feminino na obtenção de larvas (fertilidade). Tais autores verificaram que a produção de náuplios é suportada por uma baixa proporção de fêmeas abladas, enquanto o resto da população ablacionada gera nenhuma ou poucas ninhadas. O uso da ablação ocular afeta o rendimento de vários parâmetros reprodutivos, além de diminuir a vida útil das fêmeas reprodutoras (Ferriol et al., 2018). No presente trabalho, a ablação pode ter influenciado na formação dos oócitos de *M. acanthurus*, diminuindo o número de fêmeas com ovos e larvas viáveis. Para aumentar a produção de larvas, Bray et al. (1990) sugeriram a substituição das fêmeas inviáveis, após uma avaliação de fatores como o tempo e frequência de maturação ovariana, taxa de eclosão de larvas e acasalamento.

Macrobrachium acanthurus apresenta fecundidade relativamente alta, quando comparado a algumas espécies congêneres (*M. borellii* (Nobili, 1896) – Bond & Buckup, 1982; *M. potiuna* (Müller, 1880) – Bond & Buckup, 1982; Nazari et al., 2003; *M. nattereri* (Heller, 1862) – Odinetz-Collart & Magalhães, 1994). Dados prévios obtidos para esta espécie demonstraram que a fecundidade pode variar de

171 (Tamburus et al., 2012) a 17.769 ovos (Valenti et al., 1989). No presente estudo, a fecundidade média (1.741 ovos) nas fêmeas intactas foi semelhante a encontrada por Tamburus et al. (2012) (950-1.700 ovos) e menor do que a verificada por Bertini & Baeza (2014) (2.500-2.900 ovos), ambos estudos com fêmeas provenientes da natureza, mesma faixa de tamanho (CC=12-15 mm) e estágio de desenvolvimento dos ovos (inicial). Apesar das fêmeas terem sido coletadas na mesma região do estudo de Bertini & Baeza (2014), a variação da fecundidade pode ter ocorrido pelo fato de no presente trabalho a maturação gonadal, a reprodução e o desenvolvimento embrionário terem ocorrido em laboratório, podendo causar um maior estresse nas fêmeas. Sabe-se ainda, que essas diferenças também podem ser decorrentes das condições fisiológicas das fêmeas, estações do ano e condições ambientais (Lobão et al., 1986; Valenti et al., 1989; Vargas-Ceballos et al., 2018).

A fertilidade de *M. acanthurus* no Rio Ribeira de Iguape chegou a 12.465 larvas em fêmeas com aproximadamente 27 mm de CC (Bertini & Baeza, 2014). No presente estudo, a fertilidade média de fêmeas intactas com CC de 12 a 15 mm, maturadas e reproduzidas em cativeiro foi de 1.046 larvas. Bertini & Baeza (2014) encontraram valor médio de aproximadamente 1.500 larvas em fêmeas de 15 mm (CC) provenientes da natureza. Essa pequena diferença encontrada pode ter ocorrido pelos mesmos fatores indicados para a fecundidade.

As fêmeas intactas de *M. acanthurus* apresentaram maior fecundidade e fertilidade quando comparadas às fêmeas abladas. Porém, para essa mesma espécie, Cunha & Oshiro (2010) não detectaram diferenças significativas na fertilidade das fêmeas intactas (757 larvas, N=5) e abladas (743 larvas, N=4) com CC entre 12 a 15 mm (CT = 55,1-65,0 mm), após acompanhar os animais por 8 meses em laboratório. Entretanto, os valores médios obtidos para fêmeas intactas foram bem inferiores aos do presente estudo e o N utilizado para essa classe de tamanho foi muito baixo, o que pode ter prejudicado a análise. A ablação também não influenciou a fecundidade (850 ovos nas fêmeas intactas vs 792 nas abladas) e fertilidade (860 larvas em fêmeas intactas vs 662 nas abladas) de *M. amazonicum* (Bastos et al., 2018). Entretanto, o N encontrado no presente estudo para *M. acanthurus* foi maior do que o dobro utilizado por esses autores, além disso, a fertilidade apresentada por eles esteve abaixo do registrado para *M. amazonicum* como observado por Da Silva et al. (2004).

Baixas taxas de fecundidade e fertilidade também foram verificadas em experimentos de ablação com camarões peneídeos por Uddin & Rahman (2015). Adicionalmente, Magaña-Gallegos et al. (2018), observaram que apesar da ablação aumentar a frequência de desovas, os melhores desempenhos na taxa de fertilização e no número de náuplios viáveis foram melhores nas fêmeas não-abladas. O baixo desempenho reprodutivo pode estar relacionado com a rapidez do desenvolvimento dos ovários em fêmeas abladas, o que produz uma desova "acelerada", na qual os oócitos não estão adequadamente maduros (Beard & Wickins, 1980; Emmerson, 1980), o que pode ter ocorrido após a ablação das fêmeas de *M. acanthurus*. Os resultados do primeiro capítulo desta tese mostraram que os oócitos de fêmeas abladas e intactas aparentemente foram semelhantes, porém as análises utilizadas foram, principalmente, qualitativas não podendo ser possível afirmar que esses oócitos eram igualmente aptos de serem fecundados. Sendo assim, com os resultados obtidos neste trabalho, observa-se que, provavelmente, algum outro fator pode ter influenciado na qualidade da desova de fêmeas abladas de *M. acanthurus*, reduzindo a sua capacidade reprodutiva.

No geral, os valores obtidos para a fertilidade de *M. acanthurus* foram inferiores aos da fecundidade, tal diferença pode estar relacionada à mortalidade embrionária que ocorre ao longo da incubação (Ohtomi, 1997). Apesar das fêmeas utilizadas em nossos experimentos terem sido capturadas em diferentes épocas do ano, a maturação dos ovários e a reprodução ocorreram em condições controladas de laboratório, permitindo uma maior liberdade na comparação da perda média de ovos. Os resultados das análises sugerem que *M. acanthurus* tem uma perda média de embriões de 38% nas fêmeas intactas e 46% nas abladas. O aumento do volume dos ovos que ocorre ao longo do desenvolvimento embrionário de *M. acanthurus* (Tamburus et al., 2012; Fukuda et al., 2017) intensifica a competição pelo espaço entre os ovos, diminuindo sua fixação, podendo favorecer sua perda durante os movimentos de ventilação dos pleópodos (Balasundaram & Pandian, 1982).

A estimativa de perda encontrada no presente estudo foi maior do que a relatada previamente por Anger & Moreira (1998) (~ 23% de perda de ovos) e Bertini & Baeza (2014) (24%) para a mesma espécie, em fêmeas que se reproduziram na natureza. O maior valor de perda embrionária observado no presente estudo pode ser devido ao possível estresse dos animais por terem permanecido mais tempo em

cativeiro, já que as fêmeas maturaram as gônadas, reproduziram e ficaram durante todo desenvolvimento embrionário em laboratório.

Adicionalmente, as fêmeas abladas tiveram maior perda de embriões quando comparadas às fêmeas intactas, provavelmente, causada pelo estresse ocorrido após a ablação. Segundo Benzie (1998), o estresse pode reduzir a taxa reprodutiva e a qualidade dos gametas em camarões. Com o estresse após a retirada do olho (Taylor et al., 2004), as fêmeas abladas também podem ter deixado de limpar a massa de ovos, levando ao surgimento de fungos e morte de embriões. De acordo com Bauer (1979), o comportamento de limpeza dos embriões pelas fêmeas é muito importante para remoção de partículas e parasitas presentes na massa de ovos de muitas espécies de decápodes, sendo que os embriões não limpos podem sofrer mortalidade significativa.

O período de incubação dos ovos de *M. acanthurus* foi de 11,2 dias nas fêmeas intactas e de 11,6 dias nas abladas. Apesar da diferença estatística encontrada, biologicamente essa diferença não deve ser considerada, já que a variação foi menor que um dia. Fukuda et al. (2017) utilizando fêmeas capturadas na mesma região de estudo e, após a reprodução em cativeiro, encontraram tempo semelhante (cerca de 12 dias) na mesma temperatura (29°C). No entanto, no sul do Brasil, esta espécie exibiu um desenvolvimento mais prolongado (16 dias em 25°C) (Müller et al., 2007). Tal diferença pode estar relacionada à temperatura da água durante o período de incubação, pois temperaturas mais altas aumentam a velocidade dos processos metabólicos e, conseqüentemente, reduzem o tempo do desenvolvimento embrionário (Fukuda et al., 2017).

O formato dos ovos de *M. acanthurus* foi elipsóide e com volume médio de 0,09 mm³. Em estudos anteriores com este camarão foram encontrados diferentes volumes médios para ovos iniciais (0,052 mm³ por Müller et al., 2007; 0,078 mm³ por Tamburus et al., 2012). O maior volume de ovo encontrado no presente estudo pode ter acontecido pelo fato dos ovos mensurados estarem no 3º dia de desenvolvimento embrionário, então, apesar de estarem no estágio inicial, eles não eram recém-postos. O volume dos ovos de *M. acanthurus* foi semelhante entre os tratamentos (ablada/intacta). No geral, as diferenças no volume de ovos dos carídeos são atribuídas a uma diferença real na alocação de energia para o embrião (Clarke, 1993). Como essa diferença não foi detectada, tal fato corrobora com os resultados

obtidos no primeiro capítulo desta tese, cujos oócitos maduros de fêmeas abladas e intactas apresentaram diâmetros sem diferença estatística, indicando que os oócitos/ovos teriam as mesmas características. Porém, as fêmeas intactas apresentaram larvas maiores quando comparadas às abladas, além disso, os resultados de fecundidade, fertilidade e perda de embriões mostram uma menor capacidade reprodutiva em fêmeas abladas. Segundo Marsden et al. (2007), a ablação pode causar uma depleção rápida das reservas do hepatopâncreas resultando em um déficit de nutrientes disponíveis para transferência para os ovários. Isso sugere que apesar das fêmeas de *M. acanthurus* apresentarem o mesmo tamanho de oócitos/ovo, provavelmente, estes apresentam composições nutricionais diferentes, as quais não foram detectadas com as análises efetuadas no primeiro capítulo.

Magaña-Gallegos et al. (2018) também verificaram náuplios maiores no peneídeo *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) provenientes de fêmeas intactas. Tais autores relacionaram o maior tamanho, a maior concentração de proteína solúvel total nos ovos dessas fêmeas e a maior viabilidade da prole, já que os náuplios maiores podem aumentar a chance das protozoa ingerirem grandes itens alimentares, quando a alimentação exógena começar. Substâncias presentes no vitelo fornecem nutrição primária para a embriogênese e para o desenvolvimento larval inicial (Browdy et al., 1990; Quackenbush, 2001). Desta maneira, como as zoeas I de *M. acanthurus* são lecitotróficas (Rodrigues et al., 2018), seu desenvolvimento depende de reservas bioquímicas transferidas da fêmea para os ovos. Sendo assim, uma possível diferença na concentração de proteínas e/ou outros nutrientes (ácidos graxos, carotenóides) responsáveis pela formação dos oócitos em fêmeas abladas podem indicar oócitos de qualidade inferior, resultando em menor êxito na fecundação e larvas de tamanhos menores.

Estudos para a melhoria do desempenho de reprodutores de espécies nativas de interesse comercial em cativeiro são extremamente importantes para o desenvolvimento do seu pacote tecnológico. Os resultados desse trabalho esclarecem muitos pontos sobre a viabilidade do uso da técnica de ablação unilateral do pedúnculo ocular em fêmeas de *M. acanthurus* em cultivos comerciais, sugerindo que apesar de exibir alta taxa de sobrevivência, pode reduzir o desempenho reprodutivo.

Para os camarões peneídeos, Primavera (1985) também destacou a redução de alguns parâmetros reprodutivos em várias espécies. Porém, mencionou que para fins de produção, a alta previsibilidade na disponibilidade e número de náuplios compensa a tendência de diminuição da fecundidade e das taxas de eclosão de matrizes abladas. Desta forma, tal técnica ainda é muito utilizada em cultivos comerciais, mesmo para espécies que demonstraram maturar sem a ablação em cativeiro. Com isso, são necessários mais estudos com a ablação peduncular em *M. acanthurus* e outras espécies nativas, a fim de avaliar fatores como a capacidade de pareamento durante a cópula de fêmeas e composição bioquímica dos oócitos e larvas após a ablação, de forma a reunir mais informações sobre o cultivo de tais espécies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertoni, E. F., Palma-Silva, C., & Esteves, F. A. (2002). Fecundity of *Macrobrachium acanthurus* Wiegmann, 1836 (Decapoda: Palaemonidae) in a tropical coastal lagoon subjected to human impacts (Macaé, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 14(1), 71-80.
- Anger, K., & Moreira, G. S. (1998). Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. *Journal of Crustacean Biology*, 18, 823-838.
- Balasundaram, C., & Pandian T. (1982). Egg loss during incubation in *Macrobrachium nobilii* (Henderson & Mathai). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 59, 289-299.
- Bastos, A. M., Lima, J. F., & Tavares-Dias, M. (2018). Unilateral eyestalk ablation improves molting frequency and reproduction in *Macrobrachium amazonicum* females. *Journal of Applied Aquaculture*, 30(4), 337-352.
- Bauer, R. T. (1979). Antifouling adaptations of marine shrimp (Decapoda: Caridea): gill cleaning mechanisms and grooming of brooded embryos. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 65, 281-303.
- Bauer, R. T. (2013). Amphidromy in shrimps: a life cycle between rivers and the sea. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(4), 633-650.
- Beard, T. W., & Wickins, J. F. (1980). Breeding of *Penaeus monodon* Fabricius in laboratory recirculation systems. *Aquaculture*, 20, 79-89.
- Benzie, J. A. H. (1998). Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture*, 164, 23-47.
- Bertini, G., & Baeza, J. A. (2014). Fecundity and fertility in a freshwater population of the neotropical amphidromous shrimp *Macrobrachium acanthurus* from the southeastern Atlantic. *Invertebrate Reproduction & Development*, 58(3), 207-217.
- Bertini, G., Baeza, J. A., & Perez, E. (2014). A test of large-scale reproductive migration in females of the amphidromous shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) from south-eastern Brazil. *Marine and Freshwater Research*, 65, 81-93.

- Bertini, G., & Valenti, W. C. (2010). Importância econômica dos camarões de água doce. In R. B. Silva & L. C. Ming (Eds.), *Relatos de pesquisas e outras experiências vividas no Vale do Ribeira* (pp.155-170). Jaboticabal, FUNEP.
- Bertini, G., Rodrigues, M. M., & Teles, J. (in prep.). Diferenciação morfortípica de machos do camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae).
- Bond, G., & Buckup, L. (1982). O ciclo reprodutor de *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896) e *M. potiuna* (Müller, 1880) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) e suas relações com a temperatura. *Revista Brasileira de Biologia*, 42, 473-483.
- Bray, W. A., Lawrence, A. L., & Lester, L. J. (1990). Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipid. *Journal of the World Aquaculture Society*, 21(1), 41-52.
- Browdy, C. L., Fainzilber, M., Tom, M., Loya, Y., & Lubzens, E. (1990). Vitellin synthesis in relation to oogenesis in vitro-incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *The Journal of Experimental Zoology*, 255, 205-215.
- Carvalho, H. A., & Pereira, M. C. G. (1981). Descrição dos estádios ovarianos de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann 1836) (Crustacea, Palaemonidae) durante o ciclo reprodutivo. *Ciência e Cultura*, 33(10), 1353-1358.
- Clarke, A. (1993). Egg size and egg composition in polar shrimps (Caridea: Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 168, 189-203.
- Cunha, C. H., & Yoshii-Oshiro, L. M. (2010). The influence of eyestalk ablation on the reproduction of the freshwater *Macrobrachium acanthurus* shrimp in captivity. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 32(3), 217-221.
- Cruz-Sánchez, J. L., Wakida-Kusunoki A. T., Perera-García M. A., & Brito-Pérez, R. (2018). Fecundidad del camarón de río *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda: Palaemonidae) en el río Palizada, Campeche, México. *Ciencia Pesquera* 26(1), 37-43.
- Da Silva, R. R., Sampaio, C. M. S., & Santos, J. A. (2004). Fecundity and fertility of *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Palaemonidae). *Brazilian Journal of Biology*, 64(3A), 489-500.

- Emmerson, W. D. (1980). Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Marine Ecology - Progress Series*, 2, 121-131.
- Ferriol, M. G., Aguiar, J. L. B., & Trujillo L. R. (2018). Endocrinología de la reproducción em crustáceos decápodos (Crustacea: Dcapoda): avances científicos y perspectivas futuras. *Revista de Investigaciones Marinas*, 38(2), 1-8.
- Fukuda, B., Bertini, G., & Almeida, L. C. F. (2017). Effect of salinity on the embryonic development of *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda: Palaemonidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 61(1), 1-8.
- Han, C. H., & Kim, D. J. (1993). Studies on the X-organs of eyestalk and the photoperiod for the control of gonadal maturation in a freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Bulletin of the Korean Fisheries Society*, 26(1), 76-90.
- Hussain, S., Yadav, P., Manohar, S., & Parmar, P. (2017). Effect of unilateral eyestalk ablation on ovarian maturation of female freshwater prawn, *Macrobrachium lamarrei lamarrei* {H. Milne Edwards, 1837}. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5, 178-181.
- Jee, A. K., & Kok, L. Y. (1991). Fecundity changes in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) during egg incubation. *Aquaculture and Fisheries Management*, 22, 1-6.
- Kumlu, M., Türkmen, S., Kumlu, M., & Eroldoğan, O. T. (2011). Off-season maturation and spawning of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in sub-tropical conditions. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11, 15-23.
- Kuo, C., Chen, M., Fan, Y. N., Chuang, F., & Hsieh, H. S. (2009). Enhancement of vitellogenin synthesis by secretion by serotonin in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Zoological Studies*, 48(5), 597- 606.
- Kutty, M. N., & Valenti, W. C. (2010). Culture of other freshwater prawn species. In M. B. New, W. C. Valenti, J. H. Tidwell, L. R. D'Abramo & M. N. Kutty (Eds.), *Freshwater prawns: biology and farming* (pp. 502-523). Oxford, Wiley-Blackwell.
- Lobão, V. L., Rojas, N. E. T., & Valenti, W. C. (1986). Fecundity and fertility of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda) em laboratório. *Boletim do Instituto de Pesca*, 13, 15-20.

- Magaña-Gallegos, E., Bautista-Bautista, M., González-Zuñiga, L. M., Arevalo, M., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2018). Does unilateral eyestalk ablation affect the quality of the larvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Decapoda: Dendrobranchiata: Penaeidae)? *Journal of Crustacean Biology*, 38(4), 401-406.
- Marsden, G., Mather, P., & Richardson, N. (2007). Captivity, ablation and starvation of the prawn *Penaeus monodon* affects protein and lipid content in ovary and hepatopancreas tissues. *Aquaculture*, 271, 507-515.
- Mejía-Ortíz, L. M., Alvarez, F., Román, R., & Viccon-Pale, J. A. (2001). Fecundity and distribution of freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* in the Huitzilapan River, Veracruz, Mexico. *Crustaceana*, 74, 69-77.
- Müller, Y. M. R., Bressan, C. M., & Nazari, E. M. (1992). Dados de fecundidade de *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae) do rio Capivari, Praia dos Ingleses, Florianópolis, SC. *Biotemas*, 5, 123-132.
- Müller, Y. M. R., Pacheco, C., Simões-Costa, M. S., Ammar, D., & Nazari, E. M. (2007). Morphology and chronology of embryonic development in *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). *Invertebrate Reproduction & Development*, 50, 67-74.
- Nazari, E. M., Simões-Costa, M. S., Müller, Y. M. R., Ammar, D., & Dias, M. (2003). Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiana* and *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, 23, 862-868.
- New, M. B., D' Abramo, L. R., Valenti, W. C., & Singholka, S. (2000). Sustainability of freshwater prawn culture. In M. B. New & W. C. Valenti (Eds.), *Freshwater prawn culture: the farming of Macrobrachium rosenbergii* (pp. 429-434). Oxford, Blackwell Science.
- New, M. B., D' Abramo, L. R., Valenti, W. C., & Singholka, S. (2010). Sustainability of freshwater prawn culture. In M. B. New, W. C. Valenti, J. H. Tidwell, L. R. D'Abramo & M. N. Kutty (Eds.), *Freshwater prawns: Biology and Farming* (pp. 524-530). Oxford, Wiley-Blackwell.
- Odinetz-Collart, O., & Magalhães, C. (1994). Ecological constraints and life history of palaemonid prawns in Amazonia. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 25, 2460-2467.

- Odinetz-Collart, O., & Rabelo, H. (1996). Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, 16(4), 684-688.
- Ohtomi J. (1997). Reproductive biology and growth of the deep-water pandalid shrimp *Plesionica semilaevis* (Decapoda: Caridea). *Journal of Crustacean Biology*, 17(1), 81-89.
- Okumura, T., & Aida, K. (2001). Effects of bilateral eyestalk ablation on molting and ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fisheries Science*, 67, 1125–1135.
- Pandey, A. K., & Kumar, A. (2006). Changes in neurosecretory cells of eyestalk, brain and thoracic ganglia of female giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, in relation to gonadal maturation. *Journal of Environmental Biology*, 27(2), 225-233.
- Pervaiz, P. A., Jhon, S. M., Sikdar-Bar, M., Khan, H. A., & Wani, A. A. (2011). Studies on the effect of unilateral eyestalk ablation in maturation of gonads of a freshwater prawn *Macrobrachium dayanum*. *World Journal of Zoology*, 6, 159-163.
- Pileggi, L. G., & Mantelatto, F. L. (2012). Taxonomic revision of some doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Iheringia, Série Zoologia*, 102(4), 426-437.
- Primavera, J. H. (1985). A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In Y. Taki, J. H. Primavera & J. A. Llobrera (Eds.), *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps* (pp. 47-64). Iloilo City, Philippines, SAEFDEC Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Primavera, J. H., & Posadas, R. A. (1981). Studies on the egg quality of *Penaeus monodon* Fabricius, based on morphology and hatching rates. *Aquaculture*, 22, 269-277.
- Quackenbush, L. S. (2001). Yolk synthesis in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *American Zoologist*, 41, 458-464.
- Racotta, I., Palacios, E., & Ibarra, A. M. (2003). Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture*, 227, 107-130.

- Rodrigues, M. M., Almeida, L. C. F., & Bertini, G. (2018). Survival rate of *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) larvae in laboratory conditions under different salinities and diets. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 13(2), 121-130.
- Román-Contreras, R., & Campos-Lince, L. S. (1993). Aspectos reproductivos y aproximación a un modelo de crecimiento para una población de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) en el Rio Palizada, Campeche, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 20, 55-65.
- Santos, M. J. M., & Pinheiro, M. A. A. (2000). Ablação ocular no camarão *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae): efeitos sobre a reprodução, pigmentação epidérmica e atividade alimentar. *Revista Brasileira de Zoologia*, 17(3), 667-680.
- Tamburus, A. F., Mossolin, E. C., & Mantelatto, F. L. (2012). Populational and reproductive aspects of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea: Palaemonidae) From North Coast of São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 16(1), 9-18.
- Tan-Fermin, J. D. (1991). Effects of unilateral eyestalk ablation on ovarian histology and oocyte size frequency of wild and pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture*, 93, 77-86.
- Taylor, J., Vinatea, L., Ozorio, R., Schuweitze, R., & Andreatta, E. R. (2004). Minimizing the effects of stress during eyestalk ablation of *Litopenaeus vannamei* females with topical anesthetic and a coagulating agent. *Aquaculture* 233, 173-179.
- Uddin, S. A., & Rahman, M. M. (2015). Gonadal maturation, fecundity and hatching performance of wild caught tiger shrimp *Penaeus monodon* using unilateral eyestalk ablation in captivity. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 13(2), 315-322.
- Valenti, W. C., Mello, J. T. C., & Lobão, V. L. (1986). Dinâmica da reprodução de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) e *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Ciência e Cultura*, 38, 349-355.

- Valenti, W. C., Mello, J. T. C., & Lobão, V. L. (1989). Fecundidade em *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6, 9-15.
- Varalakshmi, K. N., & Reddy, R. (2010). Effects of eyestalk ablations on growth and ovarian maturation of the freshwater prawn *Macrobrachium lanchesteri* (de Man). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10, 403-410.
- Vargas-Ceballos, M. A., López-Uriarte, E., García-Guerrero, M. U., Wehrtmann, I. S., Ríos-Jara, E., & Vega-Villasante, F. (2018). Fecundity, egg volume and reproductive output of *Macrobrachium tenellum* (Crustacea: Palaemonidae) from the northern coast of Jalisco, Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(3), 502-511.
- Wen, W., Yang, Q., Ma, Z., Jiang, S., Qiu, L., Huang, J., & Qin, J. G. (2015). Comparison of ovarian maturation and spawning after unilateral eyestalk ablation of wild-caught and pond-reared *Penaeus monodon*. *Spanish Journal of agricultural research*, 13(3), 1-6.
- Wowor, D., Muthu, V., Meier, R., Balke, M., Cai, Y., & Ng, P. K. L. (2009). Evolution of life history traits in Asian freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) based on multilocus molecular phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52, 340-350.
- Zacarias, S., Carboni, S., Davie, A., & Little, D. C. (2019). Reproductive performance and offspring quality of non-ablated Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under intensive commercial scale conditions. *Aquaculture*, 503, 460-466.

FIRST REPORTED OCCURRENCE OF A HETEROMORPH
ANTENNULE IN THE FRESHWATER PRAWN
MACROBRACHIUM ACANTHURUS (WIEGMANN, 1836)
(DECAPODA, CARIDEA)

RODRIGUES, M. M., LÓPEZ GRECO, L. S., & BERTINI, G. (2019). First reported occurrence of a heteromorph antennule in the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Caridea). *Crustaceana*, 92 (4), 505-511.

NOTES AND NEWS

FIRST REPORTED OCCURRENCE OF A HETEROMORPH ANTENNULE IN THE FRESHWATER PRAWN *MACROBRACHIUM ACANTHURUS* (WIEGMANN, 1836) (DECAPODA, CARIDEA)

BY

MARIA M. RODRIGUES^{1,3,4}), LAURA S. LÓPEZ GRECO²) and GIOVANA BERTINI³)

MARIA M. RODRIGUES^{1,3,4}), LAURA S. LÓPEZ GRECO²) and GIOVANA BERTINI³)

1) Federal Institute of Education, Science, and Technology of Espírito Santo State (IFES) Piúma — Rua Augusto Costa de Oliveira, 660 — Piúma-ES — 29285-000, Brazil

2) Laboratory of Reproduction Biology and Growth of Decapoda Crustaceans, Department of Biodiversity, and Experimental Biology, College of Exact and Natural Sciences, Institute of Biodiversity, and Experimental and Applied Biology (IBBEA), Buenos Aires University, CONICET, Buenos Aires C1428EGA, Argentina

3) Laboratory of Biology and Culture of Crustaceans (LABCRUST) — State University of São Paulo — UNESP — Registro — Rua Nelson Brihi Badur, 430 Registro — 11900-000, Brazil

In contrast with holometabolous insects, crustaceans undergo periodic shedding of the old exoskeleton (ecdysis) throughout their adult life. The occurrence of successive moultings indicates that crustaceans can regenerate lost or damaged limbs, including the eye (Ventura et al., 2018), through the moulting cycle (Chang & Mykles, 2011). The eyes, however, are not always perfectly regenerated, resulting in an anomaly known as heteromorphosis, which is the regeneration of an appendage in a foreign location, generally as a response to a natural injury or artificial ablation (Bliss, 1960; Nevin & Malecha, 1991).

Heteromorphic development, although considered rare, has been acknowledged since 1864 (Milne-Edwards, 1864), and was summarized for decapods by Von Buddenbrock (1954), who states that the most striking type of heteromorphosis was the growth of an appendage similar to an antenna or antennule in the expected position of one or both eyes.

In a series of experiments with crustaceans, Herbst (1896, 1900, 1917; apud Maynard, 1965) demonstrated the occurrence of heteromorphosis in decapods with

ablated eyestalks. Unilateral ocular peduncle ablation is a well-known and effective technique to induce ovarian maturation in penaeid shrimps (Primavera, 1985), as well as in some species of caridean prawns (Okumura & Aida, 2001; Varalakshmi & Reddy, 2010).

Thus, although heteromorphic growth occasionally occurs under natural conditions, the feature is also inducible. Apparently, most of these malformations are not genetic-level mutations; they are caused by chemical and/or mechanical disruption during the development or regeneration process (Scholtz et al., 2014).

The occurrence of artificially induced heteromorphic antennules or antennae by ablation of the eye has been described in several species of decapods (Steele, 1907): the lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (cf. Maynard, 1965) and the crayfish *Cherax destructor* (Clark, 1936) and *C. quadricarinatus* (Von Martens, 1868) (cf. Sandeman & Luff, 1974; Ventura et al., 2018). Further articles reported the occurrence of this phenomenon in a natural manner, such as in the caridean prawns *Caridina sumatrensis* De Man, 1892 (as *Caridina weberi sumatrensis*) (cf. Ravindranath, 1978) and *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879 (cf. Nevin & Malecha, 1991), and the brachyuran crab *Maja crispata* Risso, 1827 (cf. Carmona-Suarez, 1990).

Macrobrachium acanthurus (Wiegmann, 1836) is a freshwater shrimp, popularly known as the “cinnamon river prawn” (Kutty & Valenti, 2010). This species is a potential candidate for freshwater shrimp farming, an expanding activity in terms of both quantity and monetary value (New, 2010).

The present article reports the first registered occurrence of a heteromorphic antennule following unilateral ocular peduncle ablation in *M. acanthurus*, verified during an experiment under laboratory conditions to evaluate the reproductive success of this species based on female fertility (number of hatched larvae).

The prawns were collected in January 2018 from the Ribeira de Iguape River (24°64'87"S 47°51'09" W), on the south coast of the state of São Paulo, Brazil. The specimens were transferred to our laboratory. Forty-four mature females had one eye cut off at the base of the peduncle with scissors. Then, the region was cauterized, and a mixture of antibiotic ointments was applied, according to the methodology described by Primavera (1985). Female carapace length (measured from the orbital sinus to the midpoint of the posterior margin) ranged 12-15 mm. The animals were

monitored under laboratory conditions until the attainment of their first brood of larvae. After the experiment was discontinued, 32 females were kept in the laboratory for another reproductive cycle. In all of these females, the regeneration of an appendage similar to an antennule was observed in the position of the excised eyestalk. Therefore, an additional experiment was designed to confirm the appearance of the heteromorphic appendage.

The new experiment was conducted in July 2018 under the same laboratory conditions as the fertility experiment. In total, 15 prawns of both sexes were collected from the same sampling area. These prawns were submitted to unilateral ablation of the eyestalk as previously described and divided over three 29 l tanks with dynamic closed systems. To avoid stress and provide shelter for the animals, sections of PVC piping of variable sizes were placed in the tank. We applied the natural photoperiod, and the water temperature was maintained at 28°C with a heater coupled to a thermostat. As nourishment, pieces of squid and extruded ration were offered to the adult prawns.

In the fertility experiment, the exact moment of appearance of the heteromorphic appendage was not controlled because it was not the goal of the study. However, we detected the appearance of an appendage similar to an antennule in place of the excised eye in 32 females. This was observed as they were withdrawn from the experiment, which lasted 45 days. Additionally, these ablated females acquired a more reddish colour after successive moults compared to that of non-ablated females. This reddish pattern was similar to that observed by Santos & Pinheiro (2000) in bi-ablated *M. rosenbergii* prawns; this is related to the extirpation of the X-organ sinus gland system located in the eyestalk, which is responsible for the secretion of neurohormones that regulate tegumentary chromatophores in crustaceans (Kleinholz, 1976). Thus, the removal of the ocular peduncle reduces these hormones in the blood, and promotes changes in the characteristic staining pattern of the species (Shibley, 1968).

In the experiment to confirm heteromorphism, the animals were constantly observed for 45 days to identify the regeneration time. One month after ablation, we observed the first animal with an appendage similar to an antennule in place of the excised eye. Heteromorphism occurred in both males and females, and on the 39 th day, three prawns (one male and two females) had developed appendages. Steele

(1907) observed the appearance of heteromorphic appendages from 22 and 17 days, respectively, in *Pagurus longicarpus* Say, 1817 (as *Eupagurus longicarpus*) and *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758) (as *Crangon vulgaris*), in experiments on the regeneration of Decapoda eyes, in which she removed either part of the eye or the whole eye of the specimen. The temporal difference in the regeneration of appendages probably occurred because of the difference in regeneration capacity between species.

In the present study, mortality was low in both experiments. Furthermore, none of the animals displayed any evidence of normal eye regeneration in the region of the removed eyestalks.

We observed that the regeneration process that resulted in the development of a heteromorphic appendage occurred at different stages of development, probably depending on the number of moults each animal underwent during the experiments. However, despite the development of this anomalous structure, the prawns performed all locomotion, feeding, and reproduction activities normally.

The normal antennule of *M. acanthurus* is composed of a tri-segmented peduncle and two long whip-like flagella; namely, the inner and the outer flagellum, the latter being divided into two branches, both without aesthetascs. Some of the heteromorphic antennules resembled a true antennule of *M. acanthurus*, but the peduncles did not present the exact division into three segments in any of the specimens. The heteromorphic flagella had varying lengths, but did not approach the normal flagellum in length or number of segments (figs. 1a, 2a-c) in any of the specimens. Other forms of regeneration produced antennules with both flagella, with varying degrees of development from absent, to rudimentary, to long; in these cases, the outer flagella did not show division into two branches (figs. 1b-e, 2d, e). The most aberrant form of regeneration produced a globular, eye-like structure, from which several rudimentary flagella appeared (figs. 1f, g, 2f). Fig. 1h presents a male from the heteromorphism experiment having heteromorphic antennules with two developed flagella. The specimens were deposited in the scientific collection of the Museum of Zoology, University of São Paulo, Brazil (MZUSP 39044, MZUSP 39045).

Herbst (1896, 1899) (apud Scholtz et al., 2014) observed that heteromorphosis occurred only when the nervous system was inhibited by the removal of the optic ganglion along with the eye; that is, the withdrawal of optic

neuropils inhibits the normal regenerative mechanism of the nervous system. This indicates that the high occurrence of regeneration of heteromorphic antennules in *M. acanthurus* was because the eye was completely removed at the base of the peduncle. However, Steele (1907) suggested that the appearance of the antenna-like appendage occurs because of the tendency of arthropod structures to divide into segments, and also because the simplest form of articulation found in any appendage is in the antenna.

Physiological studies on the functionality of heteromorphic appendages (Maynard, 1965; Maynard & Cohen, 1965) demonstrated functional connections between sensory elements in the heteromorph and central nervous system. Further studies are needed on the heteromorphic antennule of *Macrobrachium acanthurus* to determine the presence of chemoreceptive and olfactory functions.

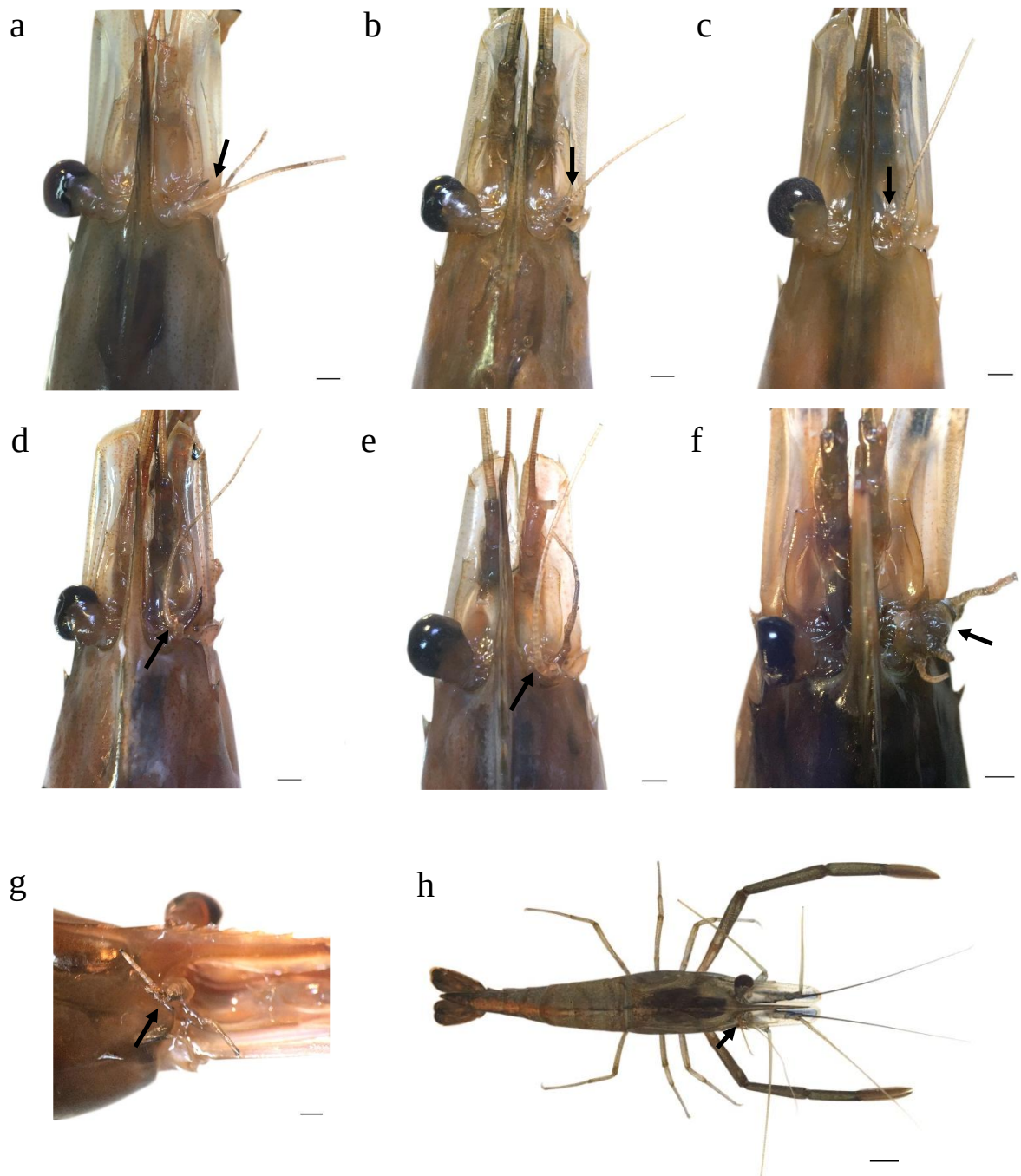


Fig. 1. *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836): a-g, dorsal view of the female cephalothorax from the fertility experiment, showing a heteromorphic antennule in place of the right eyestalk; h, dorsal view of a male specimen from the heteromorphism experiment, showing an antennule-like structure. Scale bars: 1 mm for a-g; 5 mm for h.

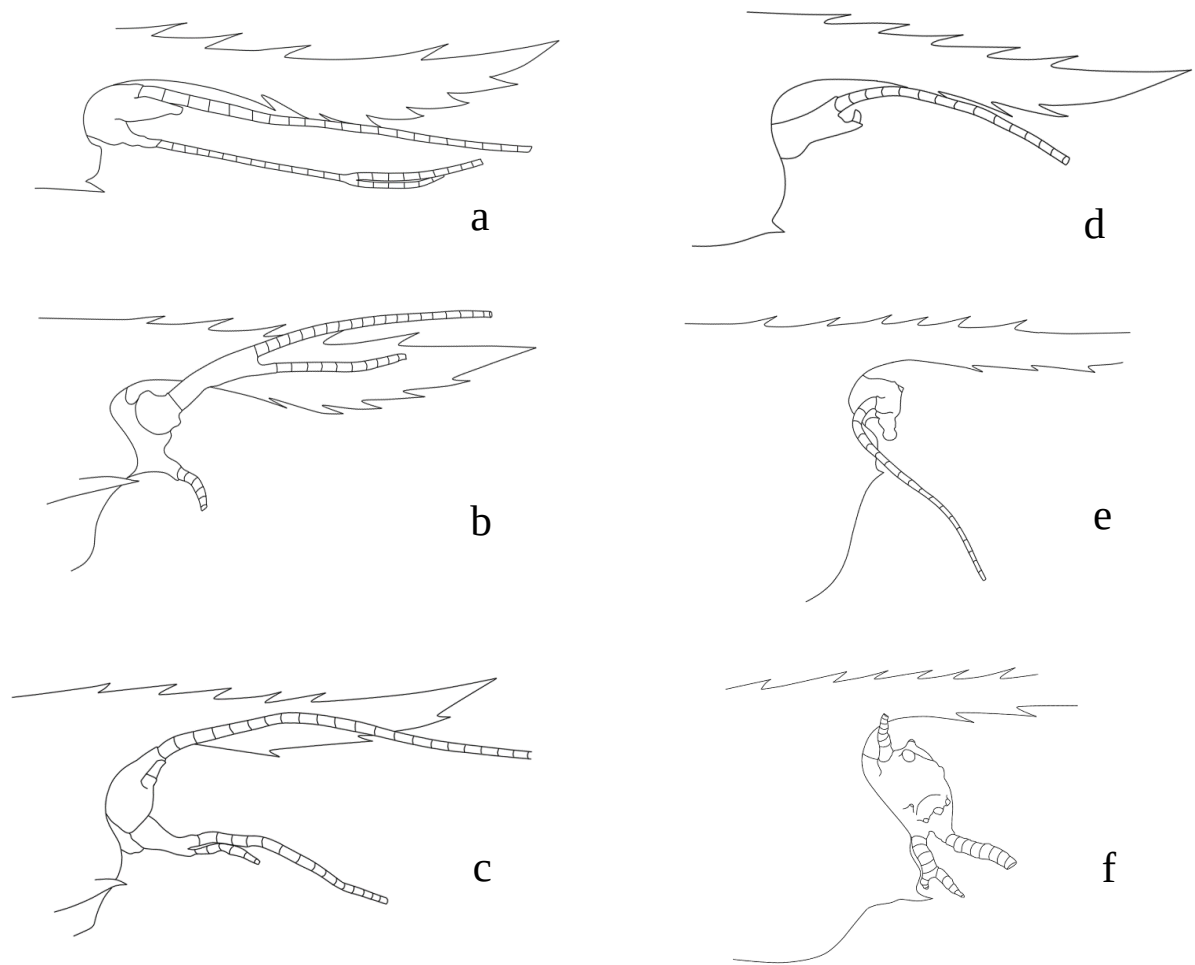


Fig. 2. Drawings of the different types of heteromorphic antennules found in the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) after ablation of the right eyestalk: a, heteromorphic antennule with two flagella (note that one divides into two branches at the end); b, heteromorphic antennule with a well-developed flagellum divided into two branches and one rudimentary flagellum; c, development of a heteromorphic antennule with flagella originating from different bases; d, heteromorphic antennule with a well-developed flagellum and a rudimentary flagellum; e, antennule-like structure with only one flagellum with lateral development; f, a globular structure similar to an eye, from which several rudimentary flagella arise.

ACKNOWLEDGEMENTS

To FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo) for financing part of the work (#13/06457-2). To Karyna Satomi Izumi for the drawings of heteromorphic antennules.

REFERENCES

- BLISS, D. E., 1960. Autotomy and regeneration. In: T. H. WATERMAN (Ed.). The physiology of Crustacea, **1**: 561-589. (Academic Press, New York).
- BUDDENBROCK, W. V., 1954. Physiologie der Decapoden. In: Bronn's Klassen und Ordmtngen des Tierreichs, Bd. 5, Abt. 1, Buch 7, Lf. 9 (Akademische Verlagsges, Leipzig). pp. 1151-1283.
- CARMONA-SUAREZ, C. A., 1990. An unusual type of heteromorphosis in a brachyuran crab *Maja crispata* Risso, 1827 (Decapoda, Majidae). Crustaceana, **59**: 220-223.
- CHANG, E. S. & D. L. MYKLES, 2011. Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. Gen. Comp. Endocrinol., **172**: 323- 330.
- KLEINHOLZ, L. H., 1976. Crustacean Neurosecretory Hormones and Physiological Specificity Amer. Zool., **16**, 151-166.
- KUTTY, M. N. & W. C. VALENTI, 2010. Culture of Other Freshwater Prawn Species. In: M. B. NEW, W. C. VALENTI, J. H. TIDWELL, L. R. D'ABRAMO & M. N. KUTTY (Eds.). Freshwater prawns: Biology and Farming. (Wiley-Blackwell, Oxford, UK). pp. 502-523.
- MAYNARD, D. M., 1965. The occurrence and functional characteristics of heteromorph antennules in an experimental population of spiny lobsters, *Panulirus argus*. J. Exp. Biol., **43**: 79-106.
- MAYNARD, D. M. & M. J. COHEN, 1965. The function of a heteromorphy antennule in a spiny lobster, *Panulirus argus*. J. Exp. Zool., **43**: 55-78.
- MILNE-EDWARDS, A., 1864. Sur un cas de transformation du petioncle oculaire en une antenne, observe chex une Langouste. C. R. Acad. Sci., Paris, **59**: 710-12.
- NEVIN, P. A. & S. R. MALECHA, 1991. The occurrence of a heteromorph antennule in acultured freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapoda, Caridea). Crustaceana, **60**: 105-107.

- NEW, M. B., 2010. History and Global Status of Freshwater Prawn Farming. In: NEW, M. B., VALENTI, W. C., TIDWELL, J. H, D'ABRAMO, L. R. & KUTTY, M. N. (Eds.). Freshwater prawns: Biology and Farming. (Wiley-Blackwell, Oxford, UK). pp. 1-11.
- OKUMURA T. & K. AIDA, 2001. Effects of bilateral eyestalk ablation on molting and ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Fisheries Science, **67**: 1125 -1135.
- PRIMAVERA, J. H., 1985. Review of maturation and reproduction in close thelycum penaeids. In: Y. TAKAI; J. H. PRIMAVERA & J. A. LLOBRERA (Eds). International Conference on Culture of Penaeid Prawns and Shrimps. I. Proceedings Hoiolo, SAEFDEC Aquaculture Department. pp. 47-67.
- RAVINDRANATH, K., 1978. An unusual abnormality in a freshwater shrimp (Decapoda, Atyidae). Crustaceana, **35**: 92-93.
- SANDEMAN, D. C. & S. E. LUFF, 1974. Regeneration of the antennules in the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. J. Neurobiol., **5**: 475-488.
- SANTOS, M. J. M. & M. A. A. PINHEIRO, 2000. Ablação ocular no camarão *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae): efeitos sobre a reprodução, pigmentação epidérmica e atividade alimentar. Revta bras. Zool. **17** (3): 667-680.
- SCHOLTZ, G., P. K. L. NG, & S. MOORE, 2014. A crab with three eyes, two rostra, and a dorsal antenna-like structure. Arthropod. Struct. Dev., **43**: 163-173.
- SHIBLEY, G. A., 1968. Eyestalk function in chromatophore control in a crab, *Cancer magister*. Physiol. Zool., **41** (3): 268-279
- STEELE, M. I., 1907. Regeneration in compound eyes of Crustacea. J. Exp. Zool., **5**: 163-243.
- VARALAKSHMI, K. & R. REDDY, 2010. Effects of eyestalk ablations on growth and ovarian maturation of the freshwater prawn *Macrobrachium lanchesteri* (de Man). Turk. J. Fish. Aquat. Sci., **10**: 403-410.
- VENTURA, T., M. J. STEWART, J. C. CHANDLER, B. ROTGANS, A. ELIZUR, & A. W. HEWITT, 2018. Molecular aspects of eye development and regeneration in the Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Aquac. Fish., <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2018.04.001>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de ablação do pedúnculo ocular é conhecida por acelerar a maturação gonadal e desova na carcinicultura de peneídeos em instalações de pesquisa em todo o mundo, mesmo em espécies que desovam naturalmente em cativeiro. Entretanto, essa técnica também está associada à baixa qualidade da progênie, e apesar dessa desvantagem, ainda é muito utilizada comercialmente.

Nesta pesquisa, o uso da técnica de ablação unilateral do pedúnculo ocular não prejudicou a sobrevivência, muda nupcial e postura das fêmeas de *Macrobrachium acanthurus* em estágio pré e pós-desova.

Com as análises histológicas e histoquímicas dos ovários não foi possível detectar diferença no desenvolvimento dos oócitos de fêmeas abladas e intactas em estágio pré e pós-desova, indicando que a ablação não acelerou a maturação gonadal desta espécie. Além disso, foi observado que independente da ablação o desenvolvimento ovariano de *M. acanthurus* é muito rápido, e que em poucos dias após a desova, os ovários já se reorganizam, confirmando a reprodução contínua descrita para a espécie. A maturação precoce dos ovários encontrada para *M. acanthurus*, provavelmente, foi potencializada pelo fato do experimento ter sido realizado no pico reprodutivo (verão) dessa espécie, sendo interessante que a avaliação dessa técnica, também, seja realizada nas demais estações do ano.

Apesar da ablação aparentemente não ter influenciado a maturação ovariana, prejudicou o desempenho reprodutivo das fêmeas, conforme já verificado por outros autores para outras espécies. As fêmeas intactas (não-abladas) apresentaram melhores resultados para: proporção de fêmeas com ovos/larvas viáveis, fecundidade, fertilidade, perda de embriões e comprimento de carapaça das larvas. O formato (elipsoide) e o volume do ovo foram semelhantes nos dois tratamentos, assim como a duração do desenvolvimento embrionário que foi de aproximadamente 11 dias. Embora não tenha sido encontrada diferença na oogênese, a aplicação da técnica pode ter influenciado na formação dos oócitos, alterando a capacidade reprodutiva das fêmeas.

Além disso, a retirada do pedúnculo ocular em fêmeas e machos resultou na regeneração de apêndices semelhantes à antênulas no local da incisão, sendo a primeira ocorrência de antênulas heteromórficas reportada para *M. acanthurus*. A

heterofomofose ocorreu em resposta à lesão causada pela ablação artificial, ou seja, o mecanismo regenerativo do sistema nervoso pode ter sido inibido pela extirpação do gânglio óptico juntamente com o olho, causando esta anomalia.

Sendo assim, os resultados desse trabalho contribuem com a pesquisa sobre o uso da técnica de ablação do pedúnculo ocular em camarões carídeos, agregando conhecimento para o desenvolvimento de futuros pacotes tecnológicos de *M. acanthurus*.