

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – CAMPUS DE BOTUCATU

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ZOOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOTÍPICA E ANÁLISES
HISTOLÓGICAS DO SISTEMA REPRODUTOR EM
MACHOS DE *Macrobrachium brasiliense* (HELLER, 1862)
(CRUSTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE) E A
INFLUÊNCIA NAS RELAÇÕES INTRAESPECÍFICAS**

Caio dos Santos Nogueira

**Orientador: Prof. Dr. Rogerio Caetano da Costa
Coorientadora: Profa. Dra. Ariádine Cristine de Almeida**

BOTUCATU

2019

CAIO DOS SANTOS NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOTÍPICA E ANÁLISES
HISTOLÓGICAS DO SISTEMA REPRODUTOR EM MACHOS DE
Macrobrachium brasiliense (HELLER, 1862) (CRUSTACEA,
DECAPODA, PALAEMONIDAE) E A INFLUÊNCIA NAS
RELAÇÕES INTRAESPECÍFICAS**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas do Instituto de
Biociências da Universidade
Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Botucatu, como parte
dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas – Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Rogerio Caetano da Costa

Coorientadora: Profa. Dra. Ariádine Cristine de Almeida

FEVEREIRO/2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Nogueira, Caio dos Santos.

Caracterização morfológica e ultraestrutural de *macrobrachium* *brasiliense* (Heller, 1862) (crustacea, decapoda, palaemonidae) e a discussão sobre a influência nas relações intraespecíficas / Caio dos Santos Nogueira. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rogério Caetano da Costa

Coorientador: Ariádine Cristine de Almeida

Capes: 20402007

1. Histologia. 2. *Macrobrachium*. 3. Aparelho genital. 4. Morfologia (Animais).

Palavras-chave: Crescimento relativo; Histologia; Morfotipos; Sistema reprodutor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rogério Caetano da Costa pela oportunidade concedida de realizar o mestrado sendo seu aluno, e também, por todos os ensinamentos, suporte, paciência e conselhos durante esses dois anos de mestrado.

A Profa. Dra. Ariádine Cristine de Almeida que mais uma vez fez parte da minha vida acadêmica, sendo minha coorientadora nesta oportunidade. Devo muito a você, foi quem me iniciou na ciência, e com certeza fez toda a diferença para quem sou hoje.

Ao Prof. Dr. Fernando José Zara por toda a orientação durante a segunda etapa desta dissertação, sendo essencial para a construção final de todo este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências/UNESP Botucatu durante o mestrado. Ao auxílio referente a CAPES Ciências do Mar (CIMAR) II (Proc. 1989/2014). Ao auxílio concedido pela PROPG UNESP (Conv. 817737/2015 – Edital 12/2017).

Ao Ministério do Meio Ambiente e ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por conceder a licença para coleta de material nas áreas de estudo.

Ao Instituto de Biociências – IB e à Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Unesp de Botucatu e ao Departamento de Zoologia.

Ao Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências da Unesp de Bauru, o qual o LABCAM está vinculado.

A toda minha família, em especial, minha mãe e meu irmão, por todo o apoio e suporte nas minhas decisões.

A minha namorada Natalia, por toda paciência, apoio e conselhos que me concedeu ao longo destes dois anos, muito obrigado por tudo. Sem você tudo teria sido muito difícil.

A minha segunda família, Abner, Bruno e Rafael (República do Amor), por todos os momentos que passamos juntos.

Aos meus grandes amigos de pós-graduação, Alexandre (Dino), Alexandre (Seu Jorge), Andréa, Bruno, Ícaro, Isabela, Júlia, Lizandra, Mariana e Natália, por me receberem e me tratarem muito bem, e claro, todos os momentos que passamos juntos, fazendo com que meus dias fossem mais alegres.

Aos meus amigos de Minas Gerais, André, Carlos Alberto, Elton, Felipe Simão, Leonardo, Luis, Luiz, Sullivan, que mesmo com essa distância nunca deixaram de me apoiar.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia de Camarões Marinhos e Água Doce (LABCAM - UNESP/FC), Abner, Andréa, Daphine, João, Régis, Sarah e Thiago, por todos os ensinamentos e conselhos ao longo desses dois anos.

A todos os integrantes do Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML - UNESP/FCAV), Barbara, Camila, Fernanda, Lucas, Marcia e Maria Alice, por me acolherem tão bem e pela grande ajuda no desenvolvimento do meu mestrado.

Gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO	1
INTRODUÇÃO	2
MATERIAL E MÉTODOS	8
Coleta dos espécimes e análises morfométricas	8
Análises do crescimento relativo entre os morfotipos	9
Análise de caracteres morfológicos dos morfotipos	11
Análises histológicas.....	12
Contagem espermática	13
RESULTADOS	14
Análises morfométricas	14
Anatomia do sistema reprodutor de machos	24
Análise geral da histologia e histoquímica	26
Testículos	26
Vaso deferente.....	28
Contagem espermática	34
DISCUSSÃO	34
REFERÊNCIAS	41

RESUMO

Em algumas espécies de decápodos é possível verificar variações morfológicas em indivíduos adultos de uma mesma população, as quais resultam em distintos morfotipos. Esses morfotipos podem influenciar a estrutura da população, muitas vezes representando um caráter relacionado à dominância social e reprodução. O crescimento relativo e histologia do sistema reprodutor de *Macrobrachium brasiliense* foram analisados a fim de investigar a ocorrência de distintos grupos morfológicos em machos adultos. Os espécimes analisados foram coletados em dois locais, no córrego Água Limpa, região de Uberlândia-MG e no Rio Batalha, região de Bauru-SP. Cada macho foi medido em relação a sete dimensões corporais: comprimento da carapaça (CC), comprimento do maior quelípodo (CMQ), comprimento do dátilo (CD), comprimento do própodo (CPr), comprimento do carpo (CCa), comprimento do mero (CM) e comprimento do ísquio (CI). O crescimento relativo foi analisado com base na mudança dos padrões de crescimento das estruturas corpóreas mencionadas (variáveis dependentes) em relação ao CC (variável independente). Em seguida, uma análise exploratória (análise de componentes principais – PCA) foi realizada com os dados morfométricos em busca de possíveis grupos morfológicos distintos na população. O sistema reprodutor masculino também foi descrito e comparado para análise de diferenças durante a maturação de células reprodutivas e produtividade espermática entre os morfotipos. Dois morfotipos foram identificados entre os indivíduos: *minor male*, com quelípodos menos desenvolvidos ($22,35 \pm 3,36\text{mm}$) e com poucos espinhos ou em formação, e o *bigger male*, com quelípodos maiores ($36,57 \pm 12,49\text{mm}$), muitos espinhos ao longo dos mesmos, principalmente a partir do mero, e todos os espinhos completamente desenvolvidos. Os resultados da relação entre CC vs CMQ diferiu significativamente ($p < 0,01$) entre os dois morfotipos. Foi feita uma minuciosa descrição com base nos principais caracteres macroscópicos de diferenciação entre os morfotipos para se tornar mais fácil a identificação em pesquisas futuras. Não houve diferenças na histoanatomia e histoquímica entre os morfotipos, porém, a produtividade espermática diferiu significativamente entre as duas castas, com o morfotipo *bigger male* produzindo mais espermatozoides (teste T, $p = 0,03$). Os quelípodos foram considerados um grande determinante de castas dentro de uma população, seguindo o proposto por outros trabalhos de descrições morfotípicas, sendo tal apêndice diretamente relacionado ao comportamento reprodutivo desses animais. A anatomia do sistema reprodutor não apresentou variações, apesar da diferença entre produção final de espermatozoides, algo que pode estar correlacionado ao tamanho desses animais. A presença de morfotipos detectada aqui contribuiu para um aumento no conhecimento da biologia populacional principalmente quantos aos aspectos reprodutivos da espécie.

Palavras-chave: Crescimento relativo, histologia, morfotipos, sistema reprodutor

INTRODUÇÃO

O gênero *Macrobrachium* (Spence Bate, 1868) é constituído, atualmente, por 246 espécies descritas e distribuídas no mundo todo, com ocorrência de 19 espécies no Brasil (MANTELATTO *et al.*, 2014), entre elas, *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862), possui distribuição em 11 estados do território brasileiro, além de também ocorrerem países adjacentes (HOLTHUIS, 1952; COELHO e RAMOS-PORTO, 1984; MELO, 2003; PILEGGI *et al.*, 2013). Mediante a vasta distribuição dessa espécie, ainda assim a maioria dos trabalhos científicos se refere a estudos populacionais (GARCÍA-DÁVILA *et al.*, 2000; MANTELATTO e BARBOSA, 2005) ou ocorrências de distribuição (GARCÍA-DÁVILA e MAGALHÃES, 2003; KENSLEY e WALKER, 1982; SANTOS *et al.*, 2018). Poucos são os trabalhos que abordam outros caracteres biológicos, entre esses, revisões taxonômicas (COELHO e RAMOS-PORTO, 1984; PILEGGI e MANTELATTO, 2012), comportamento (NOGUEIRA *et al.*, 2018), dieta alimentar (MELO e NAKAGAKI, 2013), fator de condição (TADDEI *et al.*, 2017), potencial reprodutivo (OLIVEIRA *et al.*, 2017) e descrição larval (PANTALEÃO *et al.*, 2011).

Algumas espécies do gênero *Macrobrachium*, como *M. amazonicum* (Heller, 1862) e *M. rosenbergii* (De Man, 1879) são consideradas de médio e grande porte, respectivamente, sendo muito utilizadas para fins pesqueiros e de cultivo (MACIEL e VALENTI, 2009; NEW e SINGHOLKA, 1982). Diferente de *M. brasiliense*, considerado de pequeno porte junto a outras espécies do mesmo gênero, como *M. borellii* (Nobili, 1896), *M. iheringi* (Ortmann, 1897), e *M. potiuna* (Muller, 1880) (VALENTI *et al.*, 1989). Ao decorrer do ciclo de vida de algumas espécies de *Macrobrachium*, é possível que ocorra um fenômeno morfológico entre os machos de uma mesma população, existindo assim, machos sexualmente maduros com diferentes

caracteres morfológicos, principalmente em relação aos quelípodos, além de demonstrarem diferentes comportamentos agonísticos e produção espermática (SAGI e RA'ANAN, 1988). Tal fenômeno já foi observado em algumas espécies, como por exemplo, *M. amazonicum*, *M. rosenbergii* e *M. grandimanus* (Randall, 1840) (KURIS *et al.*, 1987; MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO *et al.*, 2014; WHORTHAM e MAURIK, 2012).

Atualmente, morfotipos foram descritos para espécies que possuem o ciclo de vida estendida, incluindo as citadas anteriormente como *M. rosenbergii* (KURIS *et al.*, 1987), *M. amazonicum* (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO *et al.*, 2014) e *M. grandimanus* (WORTHAM e MAURIK, 2012), e as espécies *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (ROJAS *et al.*, 2012), e *M. idella* (SOUNDARAPANDIAN *et al.*, 2014). Os tipos de desenvolvimento larval dessas espécies podem refletir características do ambiente em que vivem, por exemplo, espécies que possuem o ciclo larval estendido são encontradas mais próximas de regiões estuarinas do que espécies com o ciclo larval abreviado (BAUER, 2004). As larvas que possuem desenvolvimento estendido se desenvolvem em regiões estuarinas pelo fato desses ambientes serem ricos em alimento, portanto, as larvas dessas espécies eclodem em instares larvais menos desenvolvidos, se desenvolvem no estuário e retornam na fase jovem para os rios (BAUER, 2004; JENNERJAHN e ITTEKKOT, 2002). Espécies de ciclo de vida abreviado ocorrem em córregos ou rios interiores, locais que possuem menor disponibilidade de alimento quando comparado ao estuário, portanto, esses animais possuem uma estratégia em que os embriões se desenvolvem a maior parte dos estágios larvais dentro do ovo, eclodindo em um estágio bem mais avançado, ou em alguns casos, apresentando desenvolvimento direto. Neste sentido, uma grande quantidade de vitelo é disponibilizada no interior dos ovos desses animais, para que a

embrião tenha uma fonte de alimento para se desenvolver no interior do ovo por um maior período de tempo (BUENO e RODRIGUES, 1995; PEREIRA e GARCÍA, 1995).

A ocorrência de machos com diferentes morfotipos em uma população pode influenciar diretamente nas relações intraespecíficas e interespecíficas desses animais, sendo um fator muito importante para a estrutura populacional devido o comportamento de dominância das castas superiores (VALENTI et al., 1993). O desenvolvimento de morfotipos resulta em variações morfológicas como coloração, espinhos no segundo par de quelípodos e crescimento diferencial de algumas partes do corpo, entre indivíduos de uma mesma espécie e sexo, podendo ser facilmente visualizados e identificados em uma população (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; SAGI e RA'ANAN, 1988). Essa ornamentação dos quelípodos nos morfotipos dominantes auxilia os animais em disputas por fêmeas ou território, influenciando nos comportamentos agonísticos e, de certa forma, refletindo também na estruturação histoanatômica e processos fisiológicos desses animais (KARPLUS e BARKI, 2018; PASCHOAL, 2017).

A quantidade de morfotipos existentes pode variar de espécie para espécie; em *M. amazonicum*, por exemplo, há quatro diferentes morfotipos que são diferenciados macroscopicamente a partir da coloração e tamanho de seus quelípodos, denominados como *Translucent Claw* (TC), *Cinnamon Claw* (CC), *Green Claw 1* (GC1) e *Green Claw 2* (GC2), sendo GC2 o macho dominante (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO et al., 2014). Para *M. rosenbergii* foram descritos três morfotipos (KURIS et al., 1987), *Blue Claw* (BC), *Orange Claw* (OC) e *Small Male* (SM), também diferenciados a partir do tamanho e coloração dos quelípodos. Em *M. grandimanus*, mais uma vez, a principal diferença morfológica foi observada nos quelípodos dos machos, sendo categorizados dois diferentes morfotipos dentro dos machos, *Small Symmetrical Males* e *Large Asymmetrical Males* (WORTHAM e MAURIK, 2012). Em

outros gêneros, nem sempre os quelípodos são o caractere principal de diferenciação entre os morfotipos; no camarão *Rhynchocinetes brucei* Okuno, 1994, outra estrutura também foi considerada importante para essa caracterização, e, neste caso, foi observado diferenças no tamanho e formato do terceiro par de maxilípedes entre os machos. Assim foram registrados três diferentes morfotipos em *R. brucei*: *Typus Morphotype* (TM), *Intermedius Morphotype* (IM) e *Robustus Morphotype* (RM) (THIEL *et al.*, 2010).

Além da diferenciação macroscópica por meio da morfologia de estruturas corpóreas, alguns autores observaram a existência da diferenciação microscópica nos órgãos reprodutivos em animais de populações que apresentam diferentes morfotipos, sendo caracterizadas diferenças morfofisiológicas, a saber: tamanho entre células germinativas, área das zonas de produção dessas células, e localização dessas zonas dentro das diferentes regiões que compõem o sistema reprodutor (SAGI e RA'ANAN, 1988; PAPA *et al.*, 2004). Por exemplo, Papa *et al.* (2004), observaram a organização histológica dos testículos entre os morfotipos de *M. amazonicum*. No morfotipo TC as zonas espermatogênicas e espermiogênicas estão situadas em regiões diferentes, sendo a primeira encontrada na parte central dos lobos testiculares e a segunda encontrada na periferia dos testículos. A região espermatogênica possui células em maturação e de sustentação, enquanto a região espermiogênica possui as células mais desenvolvidas provenientes da região anteriormente citada, sendo essas células espermátides e espermatozoides. No morfotipo CC, essas regiões testiculares estavam completamente ocupadas pelas zonas espermatogênicas, com diminuta presença de zonas espermiogênicas. Já os morfotipos GC1 e GC2 apresentaram o mesmo padrão testicular, pois, nesses dois morfotipos foi possível a visualização das zonas espermatogênicas e espermiogênicas na região dos testículos, sendo essa última zona ocupando mais espaço

da região testicular, local onde ocorre o desenvolvimento das espermatídes em espermatozoides. Logo, para os morfotipos GC1 e GC2 foi observado mais células em fases finais de maturação e maduras do que nos demais morfotipos TC e CC. Tais variações implicam que, possivelmente, os morfotipos não se diferenciam apenas macroscopicamente e sim alterando também a morfofisiologia do animal (PAPA, 2004).

Seguindo a linha de raciocínio, Sagi & Ra'anani (1988) observaram diferenças no órgão reprodutivo entre os morfotipos de *M. rosenbergii*, sendo que o morfotipo SM apresentou o sistema reprodutor bem desenvolvido juntamente ao morfotipo BC, porém, não na mesma proporção de peso, e ambos se distinguiram quanto ao sistema reprodutor encontrado nos morfotipos OC, que se mostrou menos desenvolvido que os demais. O peso relativo do sistema reprodutor em relação ao peso total corpóreo e o alongamento do ducto espermático dos morfotipos SM e BC são relacionados, enquanto o morfotipo OC apresentou os menores pesos. Estas observações podem refletir o comportamento agonístico desses animais, sugerindo que machos OC não são ativos sexualmente. Outra característica morfofisiológica que pode demonstrar diferenciações entre morfotipos seria a produção espermática em cada casta. Paschoal (2017) demonstrou em seu trabalho sobre *M. amazonicum* que a concentração espermática no ducto ejaculatório dos morfotipos TC, GC1 e GC2 diferiu significativamente do morfotipo CC, refletindo assim que, possivelmente, os animais dessa casta não invistam em reprodução, mas apenas em crescimento somático, a fim de se tornarem morfotipos dominantes.

Analisando trabalhos que abordaram a estrutura populacional de *M. brasiliense* de diferentes localidades (GÁRCIA-DÁVILA *et al.*, 2000, MANTELATTO e BARBOSA, 2005; PEREIRA e CHACUR, 2009), foi observado uma grande variação entre os tamanhos máximos e mínimos comprimentos de carapaça (CC) nessas populações. Pereira & Chacur (2009), no Mato Grosso do Sul, relataram variações do

CC em machos do menor ao maior indivíduo de 7,6 mm a 30,5 mm ($14,0 \pm 4,5$ mm) e, para as fêmeas, observaram-se variação no CC de 7,4 mm a 23,1 mm ($11,0 \pm 3,1$ mm). Gárcila-Davila *et al.* (2000), na Amazônia Peruana, relataram apenas as médias de $14,8 \pm 3,4$ mm para os machos e $12,9 \pm 2,0$ mm para as fêmeas. Mantelatto & Barbosa (2005), em São Paulo, observaram tamanhos menores de animais, quando comparado aos estudos acima, encontrando machos com variação do CC entre 4,3 mm a 19,8 mm ($10,56 \pm 4,05$) e fêmeas com variação do CC entre 3,1 mm a 16,1 mm ($7,32 \pm 2,82$ mm), os resultados dos trabalhos foram similares quando comparada a variação do CC entre os sexos. Além disso, Pereira & Chachur (2009) verificaram uma relação significativa entre o crescimento do segundo par de pereópodos com o CC dos machos, destacando assim, a possível existência de morfotipos dentro de populações, necessitando de maiores análises para a confirmação da ocorrência de morfotipos (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO *et al.*, 2014).

Deste modo, estudos específicos sobre a morfologia de estruturas corpóreas macroscópicas e microscópicas podem viabilizar importantes informações a respeito das variações morfológicas em uma população, e, conseqüentemente, na biologia reprodutiva de espécies, evidenciando quais características morfológicas e histológicas podem estar se diferenciando entre grupos de animais do mesmo sexo em uma população. Assim, o presente estudo possui dois objetivos; (1) investigar se há existência de diferentes grupos morfológicos em machos adultos de *M. brasiliense*, e também, após se caracterizar possíveis grupos macroscopicamente, (2) investigar a ocorrência de diferenças a níveis histológicos no sistema reprodutivo, buscando dissimilaridades na morfohistologia e morfofisiologia reprodutiva, as quais podem influenciar o ciclo de vida de *M. brasiliense* e suas relações intraespecíficas, juntamente a morfologia macroscópica.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos espécimes e análises morfológicas

Para as análises morfológicas e caracterização de morfotipos, foram utilizados animais coletados nos meses de julho/2012 a junho/2013, agosto/2015, fevereiro, abril, julho e agosto/2016, utilizando-se apenas peneiras (3,0 mm malha). As coletas dessa etapa foram realizadas no Ribeirão Água Limpa (19°08'24", 48°22'44") na região do Triângulo Mineiro, próximo à cidade de Uberlândia (MG). Durante o período da tarde, por 60 minutos, dois coletores usaram peneiras próximo à margem do rio, onde havia vegetação aquática, no intuito de obter camarões adultos e jovens (adaptado de MANTELATTO e BARBOSA, 2005).

Os camarões capturados foram armazenados em sacos plásticos e mantidos em água do local até serem levados ao laboratório, onde foram preservados em etanol 70% até análise. Os espécimes foram identificados por espécie de acordo com Melo (2003), separados por sexo pela presença do apêndice masculino no endopodito do segundo par de pleópodos (Lobão et al., 1986) e medidos com um paquímetro digital (0,01 mm). Indivíduos menores que o macho de menor tamanho foram classificados como sexualmente indiferenciados e não foram utilizados nas análises, por não ser possível identificar corretamente o sexo desses animais (Pantaleão *et al.*, 2012).

As seguintes estruturas corporais foram medidas para machos e selecionadas para análises morfológicas: comprimento da carapaça (CC); comprimento do maior quelípodo (CMQ); comprimento do ísquio (CI); comprimento do mero (CM); comprimento do carpo (CCa); comprimento do própodo (CPr); comprimento do dátilo (CD). A medida CMQ corresponde à soma dos valores dos artículos que a compõem, sendo esses, ísquio, mero, carpo e própodo (Figura 1).

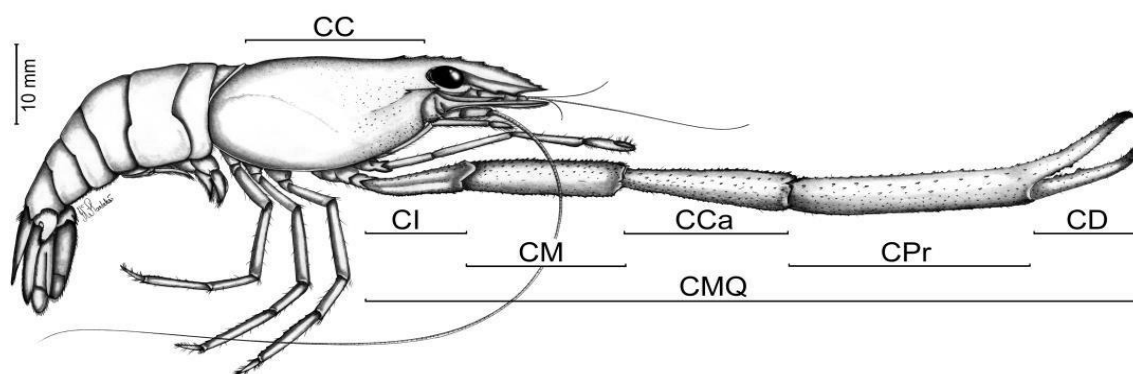


Figura 1. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). Vista lateral de um indivíduo macho com enfoque nas estruturas analisadas morfometricamente. Comprimento da carapaça (CC); comprimento do maior quelípodo (CMQ); comprimento do ísquio (CI); comprimento do mero (CM); comprimento do carpo (CCa); comprimento do própodo (CPr); comprimento do dátilo (CD) (Figura 1). Ilustração por João Alberto Farinelli Pantaleão.

Análises do crescimento relativo entre os morfotipos

Primeiramente, todos os dados foram tratados de forma para investigar a existência de outliers pelo método de análise do intervalo interquartil (IQR), quando identificados, esses dados eram removidos do conjunto de dados (Hawkins, 1980; Knox e Ng, 1998). O teste de Mann-Whitney (Zar, 2010) foi realizado para investigar a existência do fenômeno da heteroquelia na população, fator que poderia influenciar diretamente os resultados das análises morfométricas.

Posteriormente, os indivíduos foram analisados nos grupos definidos pela análise de componentes principais (PCA), a partir do conjunto de dados das estruturas corporais em relação ao comprimento da carapaça, essa análise indica qual das estruturas analisadas influencia na separação dos grupos (Pearson, 1901).

A análise não hierárquica de agrupamento *K-means* (Sokal e Rohlf, 1979) foi aplicada considerando as relações morfométricas entre os grupos de machos morfotipados. Essa análise distribui o grupo de dados em grupos previamente estabelecidos por um processo iterativo, que minimiza a variância entre os grupos e os maximiza. Após o *K-means*, para sobreposição de dados, uma análise discriminante foi

realizada com indivíduos dentro do intervalo de sobreposição para refinar os dados para categorização. O ponto de quebra entre os grupos identificados pela análise discriminante foi considerado o início da maturidade sexual morfológica.

Ambas as análises (*k-means* e análise discriminante) foram usadas baseadas nas investigações de Sampedro *et al.* (1999) e Hirose *et al.* (2013). Depois de refinar os dados entre as categorias, estes foram submetidos a uma análise de covariância (ANCOVA) para testar os coeficientes angulares e lineares entre os grupos definidos pelas análises. Isto mostrou se os dados para cada relação foram mais bem ajustados em uma única equação ou se as relações morfométricas deveriam ser representadas por diferentes equações lineares.

Mudanças no padrão de crescimento de estruturas corporais relacionadas a variável independente (CC) foram verificadas usando a análise de crescimento relativo. Gráficos de dispersão foram construídos a partir do conjunto de dados obtidos pela mensuração das estruturas corpóreas e ajustados à equação alométrica $y = ax^b$ (HARTNOLL, 1974, 1978; HAWKINS e HARTNOLL, 1982). Posteriormente, os dados foram linearizados ($\log y = \log a + b \times \log x$) na qual y é a dimensão estudada, x o comprimento da carapaça, a a interseção do eixo y e b o coeficiente alométrico (angular) que reflete a inclinação e angulação da reta. O valor da constante alométrica b foi calculado para cada relação biométrica e a hipótese nula ($H_0: b = 1$) foi testada com o teste de *Student* ($\alpha = 95\%$). Os valores da constante alométrica correspondem ao crescimento isométrico ($b = 1$), a alometria positiva ($b > 1$) ou a alometria negativa ($b < 1$) (ZAR, 2010). Apenas indivíduos que apresentaram intactas todas as estruturas do quelípodo citadas anteriormente foram utilizados para as análises.

Análise de caracteres morfológicos dos morfotipos

Posteriormente as análises estatísticas, foram realizadas a verificação de possíveis diferenças morfológicas macroscópicas entre os indivíduos de cada grupo estabelecido, como ornamentação dos quelípodos e angulação dos espinhos, como observado nas espécies *M. amazonicum* e *M. rosenbergii* (KURIS *et al.*, 1987; MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO *et al.*, 2014). Em seguida, uma análise exploratória (análise de componentes principais – PCA) foi realizada com os dados morfométricos a fim de verificar qual variável analisada possui maior influência na diferenciação de categorias morfológicas (PANTALEÃO *et al.*, 2014).

Posteriormente a identificação da presença de morfotipos, foram analisadas a angulação e altura dos espinhos (Figura 2) presentes em todos os artículos do segundo quelípodo, sendo mensurado sempre os espinhos do quelípodo mais desenvolvido, utilizando-se um estereomicroscópio Zeiss e software Zeiss AxioVision. Um total de 10 indivíduos de cada morfotipo tiveram seus quelípodos analisados, sendo 10 espinhos de cada artículo mensurados.



Figura 2. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). Fotografia demonstrando como foi realizada a mensuração da angulação e altura dos espinhos.

Análises histológicas

Para as análises histológicas, foram utilizados cinco animais de cada morfotipo identificado nas análises morfométricas. As coletas dessa etapa foram realizadas no Rio Batalha (22°18'35", 49°13'15"), próximo à cidade de Bauru (SP).

Os camarões capturados foram armazenados em sacos plásticos e mantidos com água do local até serem levados ao laboratório, onde foram preservados em paraformaldeído 4% até a dissecação dos testículos e vasos deferentes (VD). Os espécimes foram identificados por espécie de acordo com Melo (2003), separados por sexo pela presença do apêndice masculino no endopodito do segundo par de pleópodos (MANTELATTO e BARBOSA, 2005) e, o comprimento da carapaça (CC) foi mensurado com um paquímetro digital (0,01 mm).

Após a fixação em paraformaldeído, os testículos e VD dissecados foram lavados duas vezes em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,2), desidratados em uma série crescente de etanol (70 a 95%) e incluídos em historesina glicol-metacrilato Leica®. Os blocos foram cortados com 4 µm de espessura em micrótomo rotativo. Após a microtomia, as lâminas foram coradas com PAS (Ácido periódico de Schiff) contracorado com Hematoxilina (PAS &H) e Hematoxilina e eosina (H&E) para descrição geral dos testículos e VD, respectivamente (POLJAROEN *et al.*, 2010; ZARA *et al.*, 2012), e com azul de toluidina pH 4,0 para a descrição da espermatogênese (ZARA *et al.*, 2012). Para as análises histoquímicas foram utilizadas técnicas de azul de Alcian (pH 1 e 2,5) e ácido periódico de Schiff (PAS) para polissacarídeos ácidos e neutros, respectivamente (PEARSE, 1960; JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). Para a identificação de proteínas totais utilizou-se a coloração aniônica do Xylidine Ponceau (MELO e VIDAL, 1980).

Contagem espermática

Ambos morfotipos caracterizados nas populações de *M. brasiliense* foram utilizados para determinar a contagem de espermatozoides. Um total de 10 machos de cada morfotipo (N: 20) tiveram o sistema reprodutor cuidadosamente removido. Nesta análise, indivíduos coletados em Uberlândia-MG e Bauru-SP foram utilizados sendo cinco indivíduos de cada morfotipo, de cada um dos locais de amostragem. O vaso deferente esquerdo foi escolhido e padronizado para estas análises. Já o ducto ejaculatório (DE) presente na porção distal do VD foi seccionado no início da dilatação anatômica, situada nessa porção distal do VD, e mantido momentaneamente em água destilada. No presente estudo, consideramos esta região do ducto deferente como a área fixa para a contagem de espermatozoides em *M. brasiliense*, ou seja, uma área anatomicamente padronizada (PASCHOAL e ZARA, 2018).

Todo o DE foi macerado em uma solução contendo 9 mL de água destilada e 1 mL de azul de metileno. Posteriormente, foi retirado 1 mL desta solução, e adicionado em 9 mL de água destilada, constituindo uma diluição 1:10. Na etapa seguinte, 1 μ L da solução 1:10 foi pipetada e inserida na parte central de uma câmara de Neubauer (Figura 3), para contagem de espermatozoides sob microscópio de luz (aumento de 20x). A preparação, randomização e estimativa da contagem de espermatozoides seguiram os procedimentos descritos por Paschoal e Zara (2018). No presente estudo, a contagem de espermatozoides foi relatada como número de espermatozoides / μ L (spz / μ L).

Primeiramente, foi feito um teste de normalidade dos dados, a partir do qual foi observado uma distribuição normal. Portanto, foi feito um teste “t” para examinar se as concentrações de espermatozoides diferiram entre morfotipos de *M. brasiliense*.

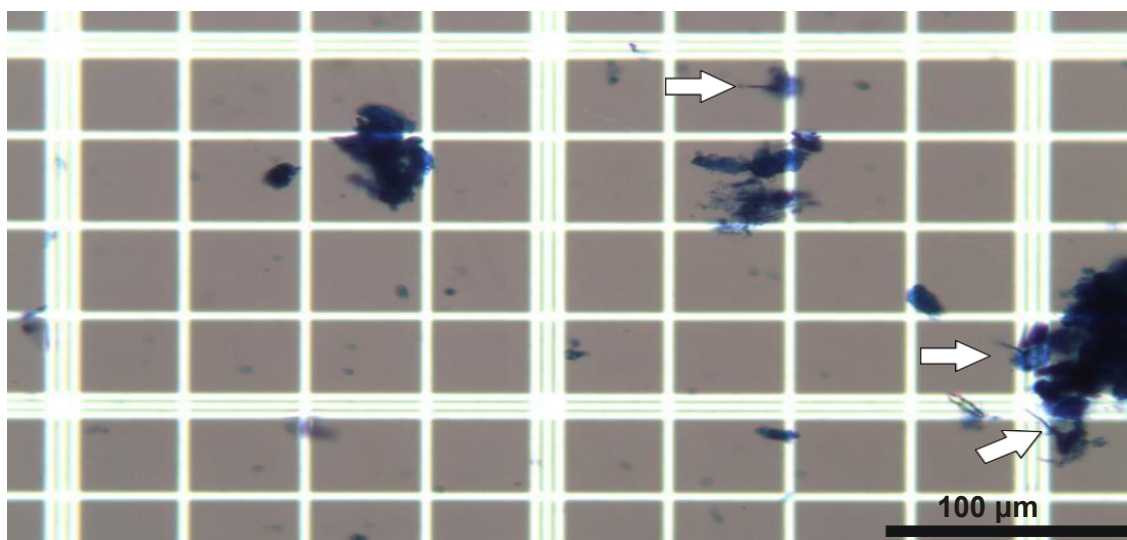


Figura 3. Vista da área de contagem de uma câmara de Newbauer, com presença de espermatozoides, em azul de metileno, indicados por setas brancas.

RESULTADOS

Análises morfométricas

Foi constatada a presença de heteroquelia nos animais examinados, porém, não houve lateralidade definida. Desta forma, o maior quelípodo de cada animal foi mensurado. Um total de 97 machos foi amostrado durante o período de coletas, mas apenas 74 machos foram utilizados devido ao fato de possuírem todos os seus apêndices intactos.

A análise de componentes principais (PCA) indicou a separação de dois distintos grupos morfológicos além dos juvenis para os machos adultos de *M. brasiliense* analisados no presente estudo, esses morfotipos foram denominados como *Minor male* (MM) e *Bigger male* (BM) (Figura 1 e Tabela I). Os componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2) explicaram a maior parte da variação morfométrica, sendo essas 45,56% e 24,71%, respectivamente. O comprimento do maior quelípodo (CMQ) foi a variável que obteve a maior contribuição para PC1, seguido do comprimento do mero (CM) para PC2, constatando assim, que tais variáveis morfológicas podem ser usadas para separar os morfotipos de machos em *M. brasiliense*.

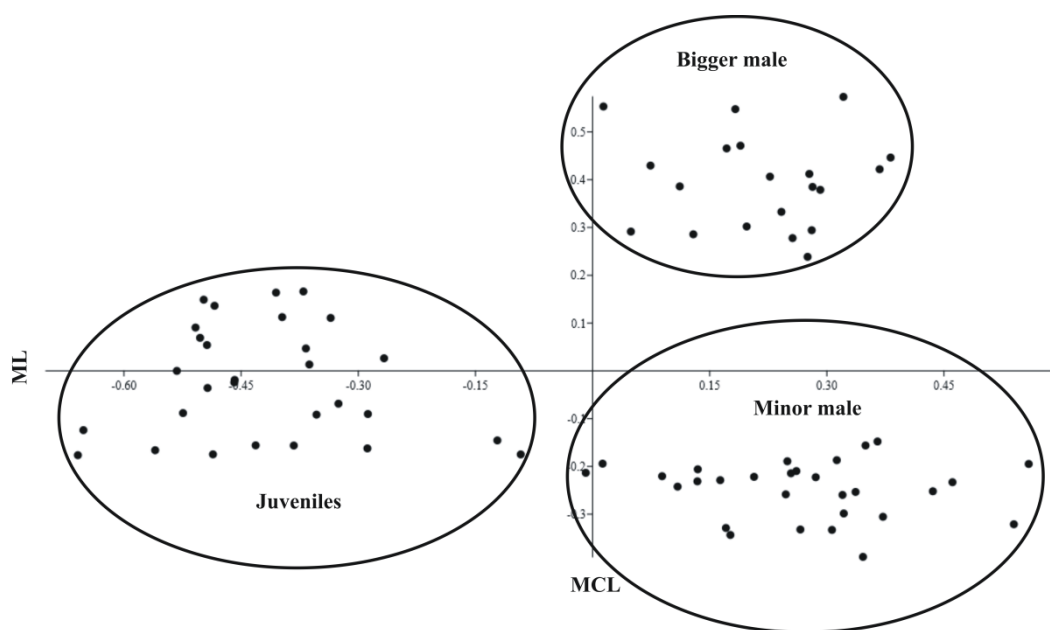


Figura 1. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). Análise de componentes principais (PCA), valores das projeções do primeiro e segundo componentes principais, realizadas a partir das variáveis morfométricas.

Tabela I. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). Coordenadas de fatores baseada nas correlações (Cor.) e contribuições (Con.) das variáveis morfométrica de acordo com a análise de componentes principais (PCA). Comprimento da carapaça (CC); comprimento do maior quelípodo (CMQ); comprimento do ísquio (CI); comprimento do mero (CM); comprimento do carpo (CCa); comprimento do própodo (CPr); comprimento do dátilo (CD).

Variáveis	CMQ		CM	
(log)	Cor.	Con.	Cor.	Con.
CC	0,505	-0,368	0,175	0,213
CMQ	0,514	-0,496	0,133	0,243
CI	0,061	-0,047	0,319	0,361
CM	0,131	-0,043	0,693	0,691
CCa	-0,472	0,455	-0,041	-0,151
CPr	-0,330	0,450	0,498	0,443
CD	-0,356	0,450	0,345	0,258
Eig/Var	3,189/45,56		1,73/24,71	

De acordo com os resultados da ANCOVA (Tabela II), observamos valores significativos em quase todas as relações morfométricas entre os morfotipos estabelecidos, com exceção, da relação CIvsCC quando comparadas entre todos os grupos. Portanto, nessa relação não houve diferença entre juvenis, MM e BM. Nas demais relações, CMvsCC, CCavsCC, CPrvsCC, CDvsCC e CMQvsCC que analisaram

todas possibilidades de relações entre os grupos (BMvsMM, BMvsJ e MMvsJ), foram obtidos valores significativos (ANCOVA, $p < 0,05$), condizendo assim que o comprimento dos artículos de cada grupo é significativamente diferente.

Tabela II. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). Resultados da análise de covariância (ANCOVA) dos dados morfométricos.

Relação	Grupos	Par. (log)	F	p
CI vs CC	BM vs MM	a	0,20	0,64
		b	1,38	0,24
	BM vs J	a	2,06	0,15
		b	0,62	0,43
	MM vs J	a	3,36	0,07
		b	0,26	0,6
CM vs CC	BM vs MM	a	5,37	<0,05
		b	1,92	0,17
	BM vs J	a	5,23	<0,05
		b	0,11	0,74
	MM vs J	a	4,5	<0,05
		b	3,17	0,08
Cca vs CC	BM vs MM	a	6,12	<0,05
		b	3,34	0,07
	BM vs J	a	-	-
		b	5,1	<0,05
	MM vs J	a	12,39	<0,01
		b	0,99	0,32
CPr vs CC	BM vs MM	a	-	-
		b	20,20	<0,01
	BM vs J	a	-	-
		b	27,36	<0,01
	MM vs J	a	-	-
		b	11,07	<0,01
CD vs CC	BM vs MM	a	-	-
		b	18,81	<0,01
	BM vs J	a	-	-
		b	24,9	<0,01
	MM vs J	a	14,11	<0,01
		b	0,87	0,35
CMQ vs CC	BM vs MM	a	9,76	<0,01
		b	1,79	0,18
	BM vs J	a	-	-
		b	6,28	<0,01
	MM vs J	a	10,46	<0,01
		b	2,13	0,15

De acordo com o crescimento relativo e PCA, a melhor relação que explica a diferenciação entre os morfotipos foi CMQvsCC, sendo estimada a maturidade sexual morfológica para 8,5mm de CC, separando assim os machos juvenis dos outros dois morfotipos (Figura 5). Essa e as demais relações investigadas (CPrvsCC, CDvsCC, CCavsCC, CMvsCC, CIvsCC) foram utilizadas na análise de classificação *K-means*. A análise de regressão linear para a relação CQMvsCC demonstrou um menor coeficiente alométrico (b) para os machos juvenis, quando comparando com os outros dois grupos (Tabela III).

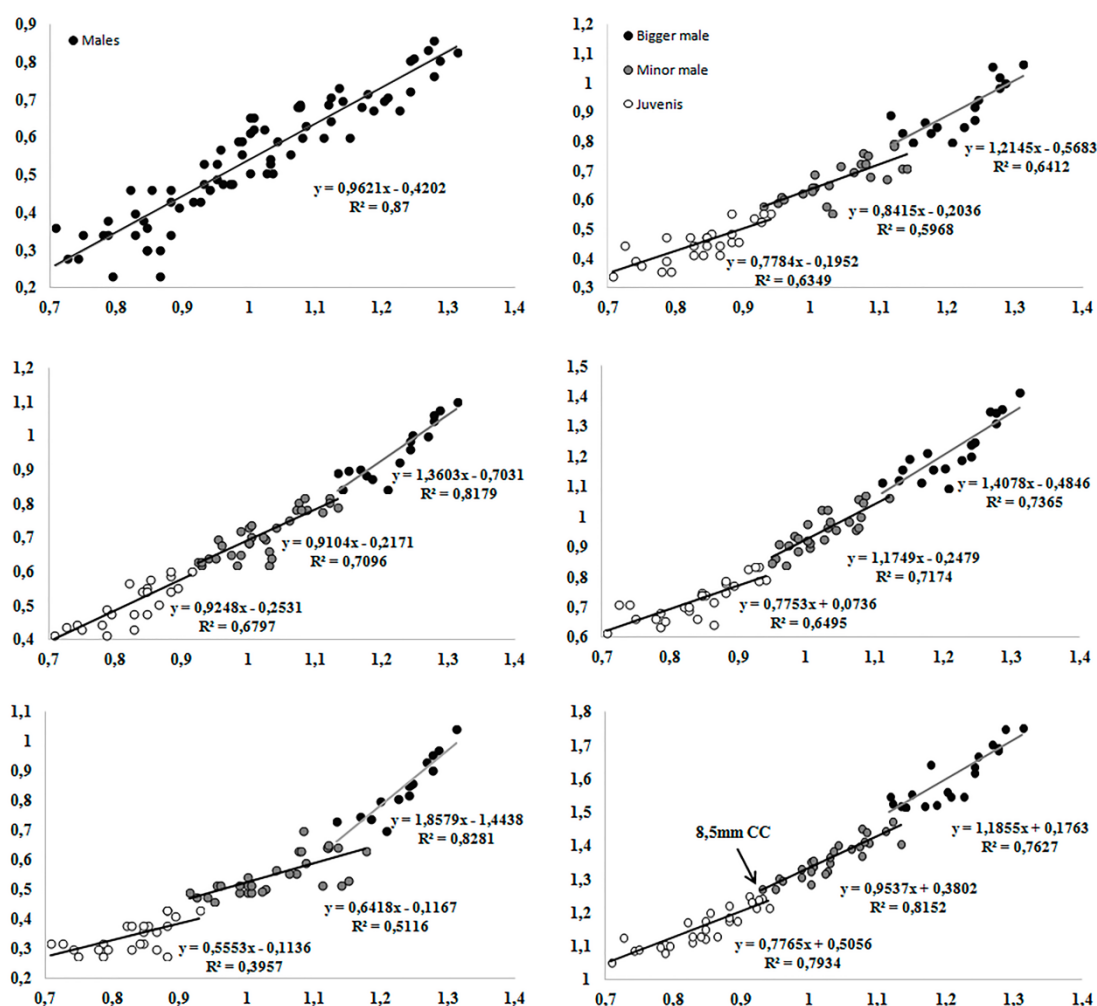


Figura 5. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). Dispersão dos pontos para as relações morfométricas em machos, exibindo a separação dos morfotipos e a estimativa da maturidade morfológica. O tamanho estimado da maturidade sexual morfológica corresponde ao CC do menor indivíduo após a quebra das equações para machos jovens e adultos na relação CMQvsCC.

Na análise de regressão linear, todas as relações demonstraram diferenças significativas. Apenas duas relações apresentaram estado alométrico distinto entre cada grupo morfológico, sendo as relações CPrvsCC e CMQvsCC, sendo caráter alométrico positivo para o morfotipo BM, isométrico para MM, e alométrico negativo para jovens (Tabela III).

De acordo com as relações dos morfotipos, para BM, quase todas as relações entre as variáveis demonstraram alometria positiva, com exceção da relação CMvsCC, onde foi caracterizado como isométrico. No morfotipo MM, quase todas as relações apresentaram caráter isométrico, com exceção da relação CDvsCC, onde foi caracterizado estado alométrico negativo. Nos juvenis, apenas a relação CCavsCC demonstrou um crescimento isométrico, enquanto as demais relações foram classificadas como alométricas negativas. Como não houve diferença na ANCOVA para todos os grupos na relação CIvsCC, os animais foram analisados no geral, e foram caracterizados como desenvolvimento isométrico (Tabela III).

Tabela III. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). Análises de regressão de dados morfométricos. O comprimento da carapaça (CC) foi utilizado como variável independente.

Relação	Morfotipos	N	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> ²	<i>T</i> (<i>b</i> =1)	<i>p</i>	Alometria
CIvsCC	Males	74	-0,4202	0,9621	0,87	0,86	>0,001	=
CMvsCC	BM	16	-0,5683	1,2145	0,64	0,88	>0,001	=
	MM	24	-0,2036	0,8415	0,59	1,07	>0,001	=
	J	26	-0,1952	0,7784	0,63	1,83	>0,001	-
CCavsCC	BM	16	-0,7031	1,3603	0,81	2,1	>0,001	+
	MM	32	-0,2171	0,9104	0,7	0,84	>0,001	=
	J	22	-0,2531	0,9248	0,67	0,52	>0,001	=
CPrvsCC	BM	18	-0,4846	1,4078	0,73	1,93	>0,001	+
	MM	27	-0,2479	1,1749	0,71	1,18	>0,001	=
	J	27	0,0736	0,7753	0,64	1,97	>0,001	-
CDvsCC	BM	14	-1,4438	1,8579	0,82	3,51	>0,001	+
	MM	30	-0,1167	0,6418	0,51	3,02	>0,001	-
	J	24	-0,1136	0,5553	0,39	3,03	>0,001	-
CMQvsCC	BM	19	0,1763	1,1855	0,76	2,05	>0,001	+
	MM	27	0,3802	0,9537	0,81	0,5	>0,001	=
	J	27	0,5056	0,7765	0,79	2,81	>0,001	-

O comprimento da carapaça (CC) geral dos machos analisados variou entre 5,1 a 20,5 mm. Na Tabela IV verificam-se detalhadamente os valores de cada variável entre os grupos estabelecidos. Os dois grupos distintos de machos também foram caracterizados macroscopicamente baseando-se nos padrões de espinhação e desenvolvimento de quelípodos. As figuras 6 e 7 mostram um espécime de cada grupo, dando enfoque em suas principais diferenciações macroscópicas. Cada grupo foi detalhadamente descrito abaixo.

No morfotipo MM, a carapaça é lisa, e o CC nesse grupo variou entre 8,4 a 13,6mm. O comprimento do maior quelípodo (CMQ) variou de 18,7 a 27,9mm (Tabela IV). O ísquio possui coloração marrom claro, parcialmente translúcido, espínulos dispostos em todo o artícullo, presença de cerdas em maior quantidade a partir da região medial, sendo essas aglomeradas na articulação ísquio-mero. O mero possui coloração marrom claro, presença de pequenos espinhos ao longo de todo o artícullo, com angulação média de 31,68° graus e altura média de 0,11mm, maior quantidade de cerdas do que no artícullo anterior. O carpo possui coloração marrom opaca, espinhos bem desenvolvidos, com angulação média de 30,42° graus e altura média de 0,15mm, presença de cerdas ao longo do artícullo e também presença de pequenos tubérculos na região distal. O própodo e dáctilo possuem coloração marrom opaca, espinhos bem desenvolvidos, espaçados igualmente até a região do dáctilo, quando o espaçamento dos espinhos é maior e o ângulo menor, no própodo, a angulação média foi de 45,68° graus e altura média de 0,18mm, no dáctilo, a angulação média foi de 38,6° graus e altura média de 0,12mm. Presença de tubérculos ao longo de todo o própodo e em maior número na face superior do dáctilo. Cerdas presentes em maior abundância na região proximal do própodo e no dáctilo, principalmente no dedo móvel. Toda a superfície do

dedo fixo e móvel se encontram, não formando hiato na região distal dos dois dedos (Figura 6A e 7A; Tabela IV e V).

Em geral no morfotipo BM, o conjunto de espinhos, desde o mero até o própodo, é mais desenvolvido na região interna do que na região externa, tendo o corpo do animal como referência. A carapaça nesse morfotipo é áspera, devido à presença de inúmeros espínulos, e o CC variou entre 13,1 a 20,5 mm. O CMQ variou de 33,1 a 56,8mm (Tabela IV). O ísquio possui coloração marrom, presença de inúmeros espinhos desenvolvidos, a angulação média foi de 75,61° graus e altura média de 0,25mm poucas cerdas dispostas ao longo do artículo. O mero possui coloração marrom, inúmeros espinhos bem desenvolvidos, a angulação média foi de 73,58° graus e altura média de 0,30mm, poucas cerdas presentes, sendo que a maioria se encontra na região proximal, inúmeros tubérculos presentes na região superior. O carpo possui coloração marrom, inúmeros espinhos bem desenvolvidos, a angulação média foi de 61,92° graus e altura média de 0,44mm, poucas cerdas, essas localizadas na região distal, tubérculos em toda a região superior do artículo. O própodo e dáctilo possuem coloração marrom, igualmente aos demais artículos, séries longitudinais de grandes espinhos desenvolvidos, com espinhos menores entre essas séries, que estão espaçados igualmente até a região proximal do dáctilo, após essa região, o espaçamento entre os espinhos aumenta e o ângulo continua similar. No própodo a angulação média foi de 60,41° graus e altura média de 0,50mm, no dáctilo a angulação média foi de 58,07° graus e altura média de 0,37mm. Presença de tubérculos na região superior, em maior abundância na região distal do própodo e dáctilo. Poucas cerdas presentes ao longo do própodo, porém, há uma pequena quantidade na região distal do dedo fixo e móvel. Desde a região proximal, a superfície dos dedos não se encontra, havendo a formação de um hiato entre os dedos (Figura 6B e 7B; Tabela IV e V).

O CC nos camarões juvenis variou entre 5,1 a 8,9 mm. O CMQ variou entre 11,3 a 17,8mm. Em geral, os quelípodos nesses animais são translúcidos e ausência de espinhos ou tubérculos, com presença de cerdas ao longo de todo o quelípodo (Tabela IV).

Tabela IV. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862): estatística descritiva de cada morfotipo para todas as variáveis morfométricas. Comprimento da carapaça (CC); comprimento do maior quelípodo (CMQ); comprimento do ísquio (CI); comprimento do mero (CM); comprimento do carpo (CCa); comprimento do própodo (CPr); comprimento do dactilo (CD).

Morfotipos	Variável	N	Média	D.P.	Min.	Max.
Jovens	CC	29	7,11	1,1	5,1	8,9
	CMQ	27	14,51	1,92	11,3	17,8
	CI	29	3,23	0,97	1,7	3,4
	CM	26	2,88	0,41	2,2	3,6
	CCa	22	3,24	0,47	2,6	3,9
	CPr	27	5,35	0,77	4,1	6,8
	CD	24	2,22	0,26	1,9	2,7
Minor male	CC	32	10,75	1,49	8,4	13,6
	CMQ	27	23,31	3,08	18,7	27,9
	CI	29	4	0,67	3	5,4
	CM	24	4,75	0,74	3,6	6,2
	CCa	32	5,2	0,79	4,2	6,6
	CPr	22	9,07	1,36	6,9	11,7
	CD	30	3,6	0,57	2,9	4,5
Bigger male	CC	19	16,32	2,27	13,1	20,5
	CMQ	19	41,39	8,14	33,1	56,8
	CI	16	5,6	0,94	4	7,2
	CM	16	8,33	1,77	6,3	11,6
	CCa	16	9,22	1,84	7	12,6
	CPr	18	17,1	4,03	12,5	25,9
	CD	14	7,21	1,75	5	11

Tabela V. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862): valor médio, máximo e mínimo da angulação e altura dos espinhos dos artículos de cada morfotipo.

	Minor Male				Bigger Male				
	Mero	Carpo	Própodo	Dáctilo	Ísquio	Mero	Carpo	Própodo	Dáctilo
Angulação média (°)	31,68	30,42	45,68	38,60	75,61	73,58	61,92	60,41	58,07
Máximo (°)	50,19	54,27	63,6	53,4	90	90	86,96	88,23	82
Mínimo (°)	19,66	21,3	30,1	24,9	50,65	26,16	27,8	32,93	44
Altura média (mm)	0,11	0,15	0,18	0,12	0,25	0,30	0,44	0,50	0,37
Máximo (mm)	0,21	0,33	0,27	0,2	0,38	0,5	0,64	0,61	0,48
Mínimo (mm)	0,04	0,08	0,1	0,05	0,15	0,16	0,14	0,28	0,25

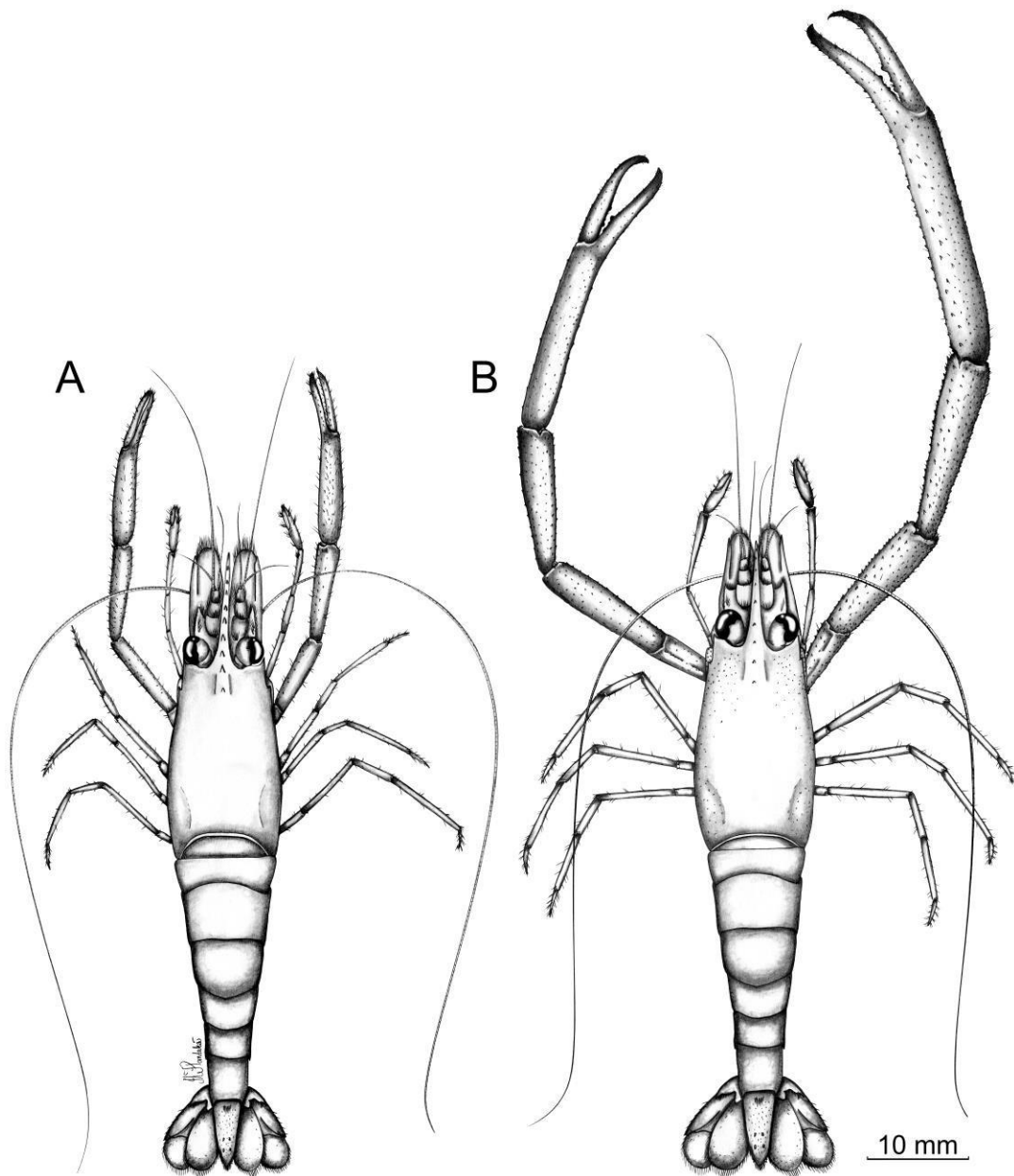


Figura 6. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). Visão geral dos dois morfotipos descritos baseados nas análises morfométricas. À esquerda, o morfotipo *Minor male* (A) e a direita o morfotipo *Bigger male* (B). Ilustração por João Alberto Farinelli Pantaleão.

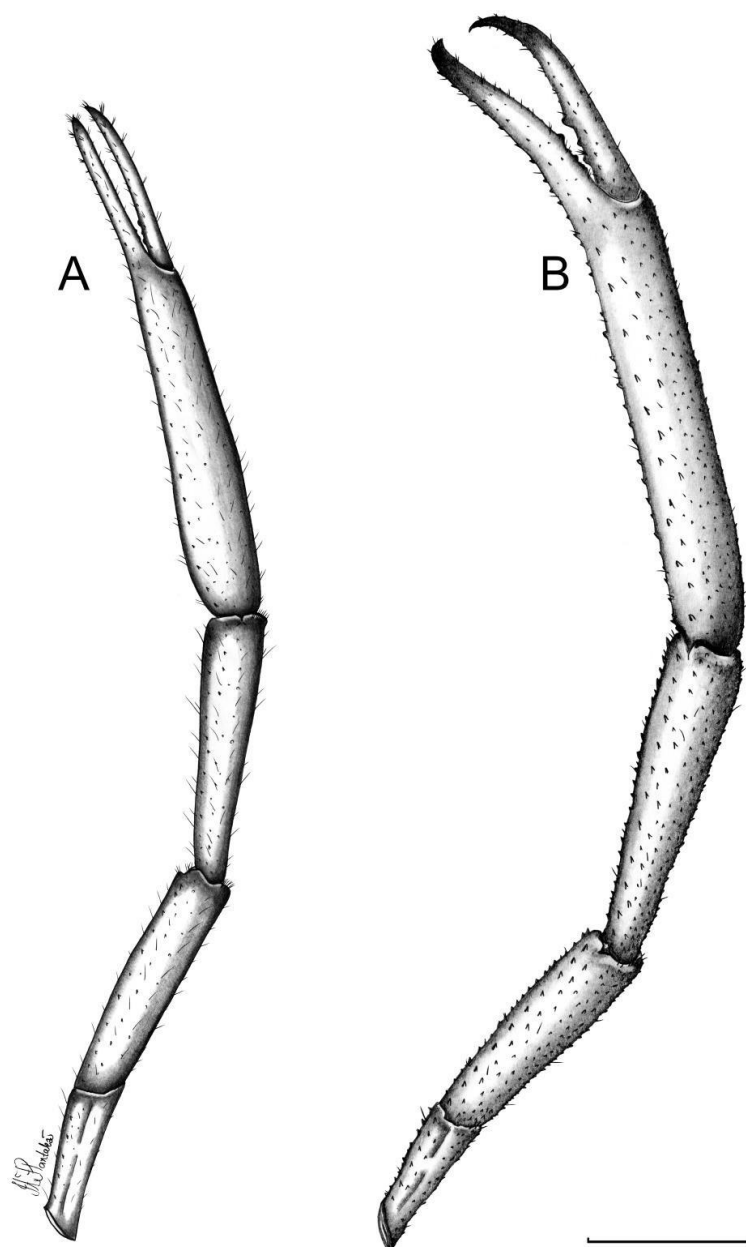


Figura 7. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). Visão detalhada dos padrões de espinação dos maiores quelípodos de cada morfotipo. À esquerda, o morfotipo *Minor male* (A) e a direita o morfotipo *Bigger male* (B). Barra de escala: 10mm para A e 5mm para B. Ilustração por: João Alberto Farinelli Pantaleão.

Anatomia do sistema reprodutor de machos

A morfologia do sistema reprodutor não apresentou diferenças entre os dois morfotipos estabelecidos. O sistema reprodutor em *M. brasiliense* possui um par de testículos bilobulados, sendo o lóbulo anterior mais delgado e o posterior mais espesso (Figura 8A e B). O testículo desemboca no vaso deferente (VD) (Figura 8B), o qual se estende lateralmente no cefalotórax, progredindo posteriormente em direção ao quinto par de pereópodos. O vaso deferente foi dividido em três regiões, sendo essas denominadas como: proximal (PVD), medial (MVD) e distal (DVD). O PVD está ligado ao testículo sendo bastante convoluta (Figura 8B). O MVD forma um tubo reto a partir do final da região enovelada do PVD, aumentando discretamente o calibre até a última região do VD (Figura 8C). A DVD corresponde à área da VD com maior calibre, formando uma região dilatada, o ducto ejaculatório (DE). O DVD tem como característica anatômica a presença na margem anterior ventral da glândula androgênica (Figura 8D).

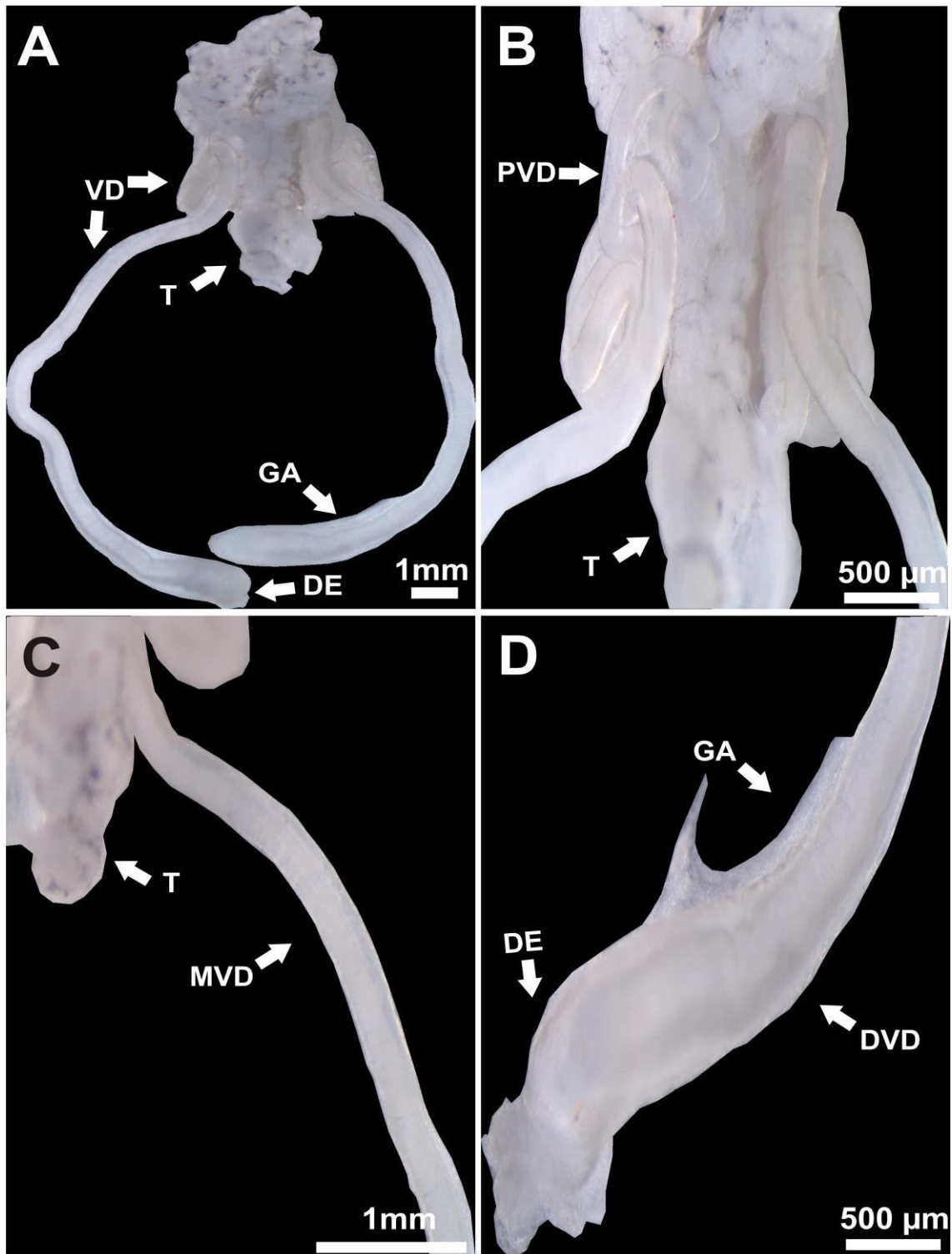


Figura 8. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). A. Vista geral do sistema reprodutor masculino do morfotipo MM e BM de *M. brasiliense* (Heller, 1862), mostrando o testículo (T) associado à região convoluta dos vasos deferentes (PVD), e as regiões subsequentes (MVD e DVD). B. Vista da ligação entre testículo e PVD. C. Vista da geral MVD com ligação a DVD. D. Vista da região PVD, com presença da glândula androgênica (GA) e ducto ejaculatório (DE).

Análise geral da histologia e histoquímica

Analisando as regiões denominadas como proximal, medial e distal dos vasos deferentes de ambos morfotipos de *M. brasiliense* observou-se que não há diferenças na histologia, histoquímica, padrão de espermatogênese e produção de fluido espermático nessas regiões entre esses grupos. Portanto, a descrição de cada região do vaso deferente entre os morfotipos foi associada.

Testículos

O testículo foi classificado como tipo lobular. No interior, os túbulos seminíferos são envoltos por células acessórias ou Sertoli envoltas por tecido conjuntivo (Figura 9A). As espermatogônias e espermátocitos primários podem ser encontrados nos túbulos seminíferos. O padrão de distribuição das células imaturas (espermatogônias, espermátocitos e espermátides) e células maduras (espermatozoides) são idênticos entre os dois morfotipos. É possível visualizar o lúmen dos túbulos seminíferos situados no interior dos lóbulos, havendo espermátides iniciais, finais e espermatozoides (Figura 9A e B). O lúmen dos túbulos seminíferos possui secreção com mesma característica química em ambos morfotipos, sendo formada por uma secreção basófila, fortemente reativa para polissacarídeos neutros, pouco reativa para proteínas e polissacarídeos ácidos (Figura 9C-E). As espermátides finais e espermatozoides são fortemente reativos para proteínas e polissacarídeos ácidos (Figura 9C-E).

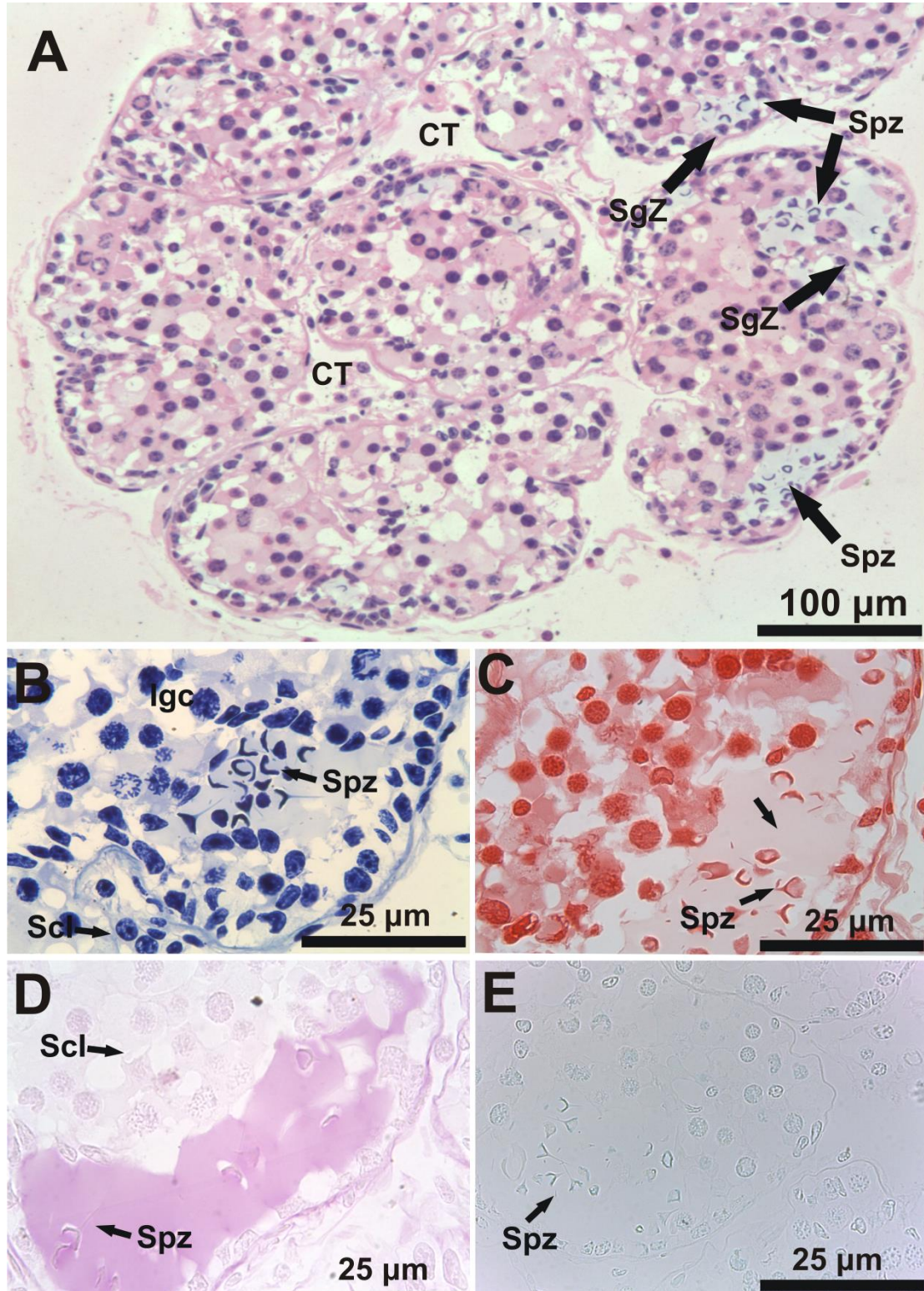


Figura 9. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). A. Morfologia geral do testículo lobular de *M. brasiliense*, morfotipo MM, evidenciando os espermatozoides imersos em secreção no lúmen. B. Detalhe em maior aumento de um túbulo seminífero, morfotipo BM, células germinativas presentes na porção central do túbulo com lúmen e matriz espermática [Azul de toluidina (pH 4,0)]. C. Detalhes do lúmen do túbulo seminífero, morfotipo MM, os espermatozoides situados numa matriz fracamente reativa para proteínas, enquanto as células germinativas (espermatócitos, espermátides e espermatozoides), são fortemente reativas. [xylydine ponceau]. D-E. Detalhes do lúmen do túbulo seminífero, morfotipo

MM, os espermatozoides estão situados numa matriz sendo formada por uma secreção fortemente reativa para polissacarídeos neutros, fracamente reativa para ácidos. A vesícula acromossal dos espermatozoides fortemente positiva a polissacarídeos ácidos [PAS, Azul de Alcian]. CT: tecido conjuntivo, SgZ: zona espermatogênica, Spz: espermatozoide, Igc: células imaturas, ScI: espermócito I.

Vaso deferente

O PVD é caracterizado por uma modificação no epitélio simples, formando um agrupado de células colunares compactadas formando uma saliência em direção do lúmen, em uma face do tubo, o tiflossole. O restante do epitélio do PVD é simples com células cúbicas, núcleos irregulares e revestidos por uma delgada camada muscular (Figuras 10A e B). No lúmen nota-se que as massas de espermatozoides ocupam a maior parte da região central imersos em secreção denominada de tipo I, levemente basófila. Progressivamente na PVD ocorre na face sobre o tiflossole a presença da secreção tipo II, a qual produz uma maior compactação da massa espermática na face do epitélio cúbico (Fig 10C-F). A secreção tipo II tem metacromasia α (verde) ao azul de toluidina, sendo fortemente reativa a proteínas e polissacarídeos neutros e fracamente reativa para os ácidos (Figura 10C-F). A vesícula acrossomal dos espermatozoides foi reativa a polissacarídeos ácidos (Figura 10F).

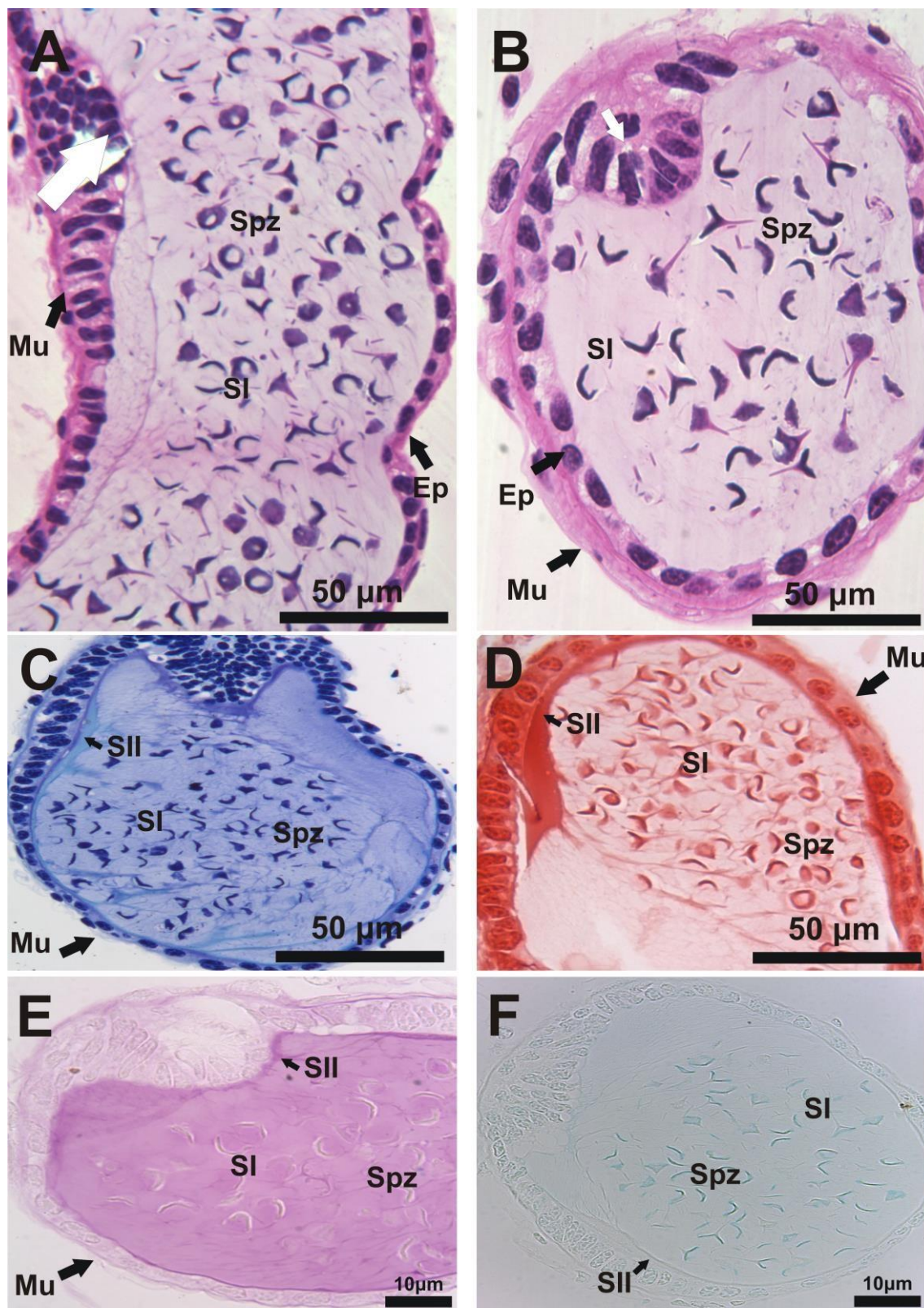


Figura 10. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). A. Seção longitudinal da região proximal do vaso deferente de *M. brasiliense* (Heller, 1862), morfotipo MM, mostrando espermatozoides imersos em secreção do tipo I. O epitélio foi caracterizado pela presença de tiflosole em uma das paredes (apontado por seta branca), a outra parede foi caracterizada pela formação de células cúbicas (seta preta), com núcleos irregulares e revestidos por uma fina camada muscular. B. Seção transversal da região proximal do vaso deferente, morfotipo BM,

tiflossole apontado por setas brancas e epitélio cúbico em setas pretas. C. Detalhe em maior aumento da seção transversal, morfotipo MM, visualizando a matriz espermática envolta pela secreção I, e essa envolta pela secreção tipo II, ocorrendo metacromasia α , devido a presença de proteínas [Azul de tolúidina (pH 4,0)]. D. Detalhe em maior aumento da seção transversal, morfotipo BM, a secreção tipo I fracamente reativa a proteínas, enquanto a secreção tipo II e a vesícula acrossomal dos espermatozoides foram fortemente reativos. E. Secreção tipo I é moderadamente reativa para polissacarídeos neutros, e secreção tipo II (seta preta) fortemente reativa. F. Detalhe em maior aumento da seção transversal, as secreções I e II são fracamente reativas a polissacarídeos ácidos, e a vesícula acrossomal dos espermatozoides foi fortemente reativa. Ep: tecido epitelial, Mu: músculo, Spz: espermatozoides, SI e II: secreções.

O epitélio do MVD foi caracterizado pela ampliação das células do epitélio simples colunares modificando a estrutura do tiflossole, o qual não se encontra saliente em direção ao lúmen da MVD. O restante do epitélio da MVD continua simples com células cúbicas e núcleo bastante volumoso, arredondado, sendo o epitélio revestido por camada muscular mais espessa que no PVD (Figuras 11A, B e C). Nessa região, observamos que a massa espermática está mais compactada junto a face do epitélio cúbico, provavelmente, devido ao acúmulo de secreção das células do antigo tiflossole, o qual agora é mais amplo (Figura 11C). Os espermatozoides estão imersos na secreção tipo I, basófila, e essa, está envolta por uma secreção tipo II, eosinófila, e essa última, envolta por uma secreção tipo III, basófila (Figura 11B e C). A composição química das secreções I e II não sofreu alteração, sendo a secreção tipo I moderadamente reativa a polissacarídeos neutros e fracamente reativa a proteínas e polissacarídeos ácidos. A secreção tipo II foi fortemente reativa a polissacarídeos neutros e proteínas e fracamente positiva a polissacarídeos ácidos. A secreção III foi menos reativa a proteínas do que a secreção tipo II, possui metacromasia, moderadamente reativa a polissacarídeos neutros e ligeiramente positiva a polissacarídeos ácidos (Figuras 11D, E, F e G).

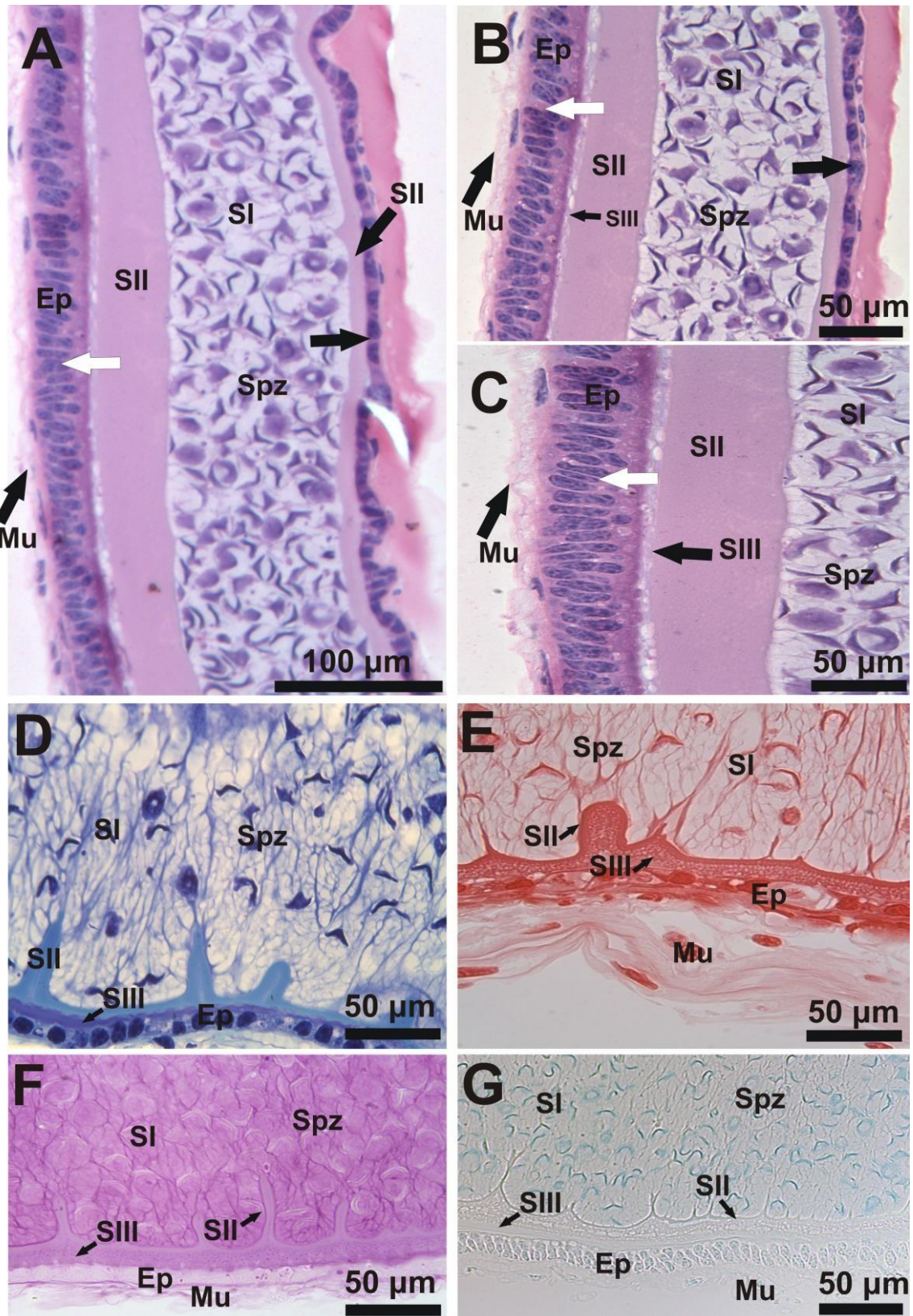


Figura 11. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). A. Seção longitudinal da região medial do vaso deferente de *M. brasiliense* (Heller, 1862), morfotipo MM, mostrando espermatozoides imersos em secreção do tipo I, circundado pela secreção do tipo II. O epitélio dessa região foi caracterizado pela formação de células colunares, e a outra parede epitelial foi caracterizada pela formação de células cúbicas. A camada muscular nessa região é mais

espessa do que na região proximal. B-C. Visão ampliada da seção longitudinal pode ser visto a secreção tipo I, basófila, secreção tipo II eosinófila e secreção tipo III, basófila. D. Detalhe em maior aumento da seção longitudinal, morfotipo BM, visualizando a matriz espermática envolta pela secreção I, e essa envolta pela secreção tipo II, ocorrendo metacromasia α , devido a presença de proteínas, e a secreção tipo III, ocorrendo metacromasia β , menos proteica que a secreção II. [Azul de toluidina (pH 4,0)]. E. Detalhe da seção longitudinal, morfotipo MM, a secreção tipo I fracamente reativa a proteínas, enquanto a secreção tipo II e a vesícula acrossomal dos espermatozoides foram fortemente reativas. A secreção tipo III, também reativa a proteínas, porém, em menor proporção a secreção tipo II. F-G. Detalhe da seção longitudinal, morfotipo MM, secreção I, moderadamente reativa a polissacarídeos neutros, enquanto a secreção II e III foram fortemente reativas. As três secreções foram fracamente reativas a polissacarídeos ácidos, vesícula acrossomal fortemente reativa. Ep: tecido epitelial, Mu: músculo, Spz: espermatozoides, SI, II e III: secreções.

O DVD é caracterizado por lúmen muito amplo, formando o duto ejaculatório. Esta região apresenta um único tipo de epitélio, simples e cúbico, com núcleos arredondados e volumosos. A quantidade de secreção presente nessa região compacta as células colunares originárias da região do tiflossole, e por esse motivo, o epitélio constitui-se apenas de célula cúbicas. Ao redor do epitélio, nota-se uma espessa camada muscular característica desta região (Figuras 12A, B e C). Na matriz desse vaso, há presença de espermatozoides, a secreção tipo I e II aparentam estar misturadas nessa região, envolvendo os espermatozoides e formando uma capsula espessa (Figura 12A). Além disso, a secreção III pode ser caracterizada como basófila banhando toda essa matriz eosinófila (secreção II) (Figura 12A). Histoquimicamente nessa região, a secreção I é fortemente reativa a polissacarídeos neutros, fracamente para proteínas e polissacarídeos ácidos. A secreção II foi fracamente positiva a polissacarídeos neutros e ácidos e fortemente por proteínas. A secreção tipo III foi fracamente reativa a polissacarídeos neutros, ácidos e proteínas (Figuras 12D, E, F e G).

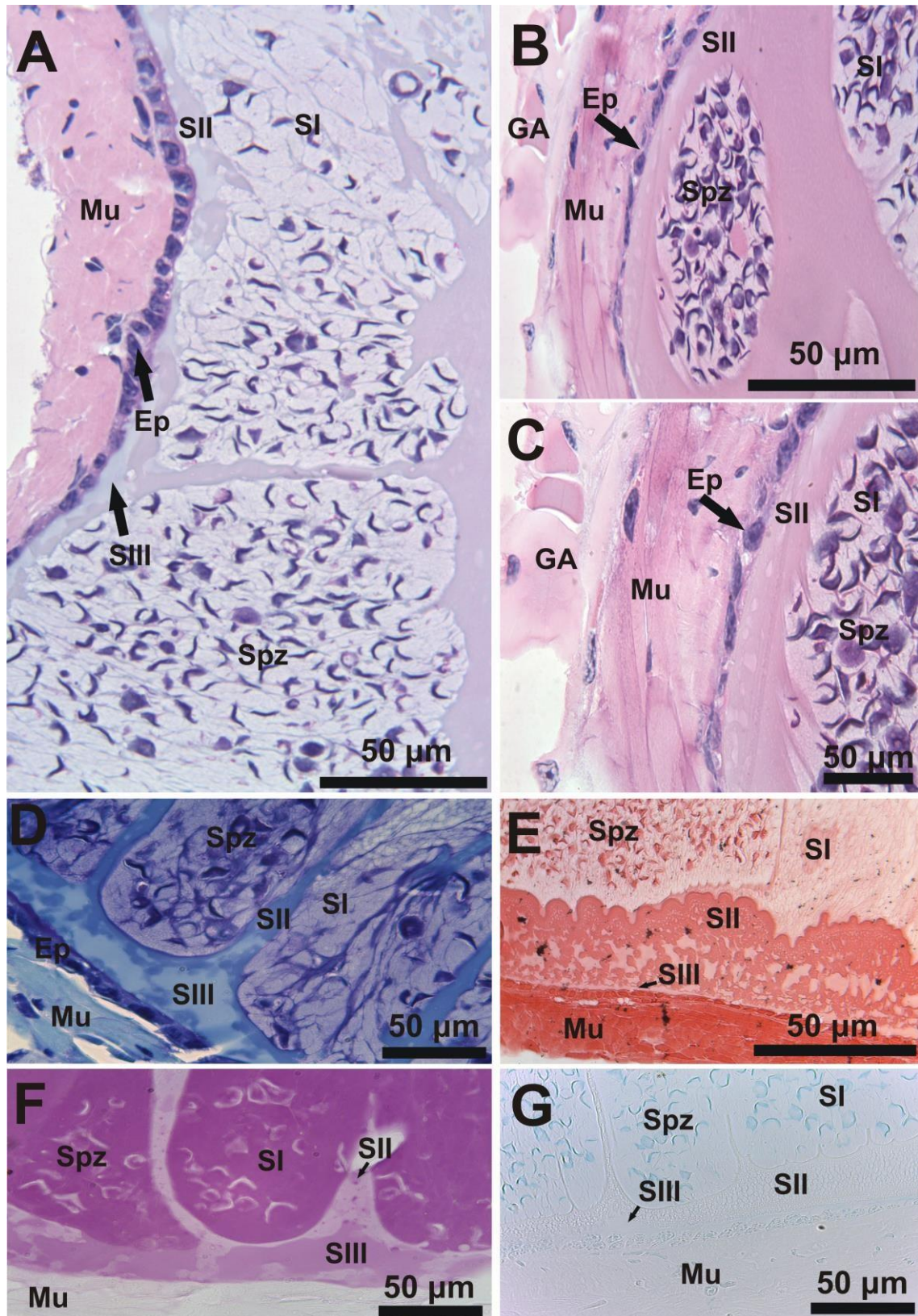


Figura 12. *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). A. Seção longitudinal da região distal do vaso deferente de *M. brasiliense* (Heller, 1862), morfotipo MM, mostrando espermatóides imersos em secreção do tipo I, circundado pela secreção do tipo II, ambas basófilas, e a secreção tipo III, também basófila. O epitélio dessa região foi caracterizado pela formação de células cúbicas. A camada muscular nessa região é mais espessa do que na região

medial. B-C. Visão ampliada da seção longitudinal, pode ser visto a secreção tipo I, basófila, e secreção tipo II, mais basófila revestindo a matriz espermática, e uma secreção tipo III, menos basófila. Também é possível visualizar a glândula androgênica D. Detalhe em maior aumento da seção longitudinal, morfotipo BM, visualizando a matriz espermática envolta pela secreção I, e essa envolta pela secreção tipo II, e a secreção tipo III, ocorrendo metacromasia β , menos proteica que a secreção II. [Azul de toluidina (pH 4,0)]. E. Detalhe da seção longitudinal, morfotipo BM, a secreção tipo I fracamente reativa a proteínas, enquanto a secreção tipo II e a vesícula acrossomal dos espermatozoides foram fortemente reativas. A secreção tipo III, também reativa a proteínas, porém, em menor proporção a secreção tipo II. F-G. Detalhe da seção longitudinal, morfotipo MM, secreção I, fortemente reativa a polissacarídeos neutros, enquanto a secreção II e III foram moderadamente reativas. As três secreções foram fracamente reativas a polissacarídeos ácidos, vesícula acrossomal fortemente reativa. Ep: tecido epitelial, Mu: músculo, Spz: espermatozoides, GA: glândula androgênica, SI, II e III: secreções.

Contagem espermática

Para a contagem espermática indivíduos de diferentes populações foram utilizados, pois, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na concentração espermática entre os mesmos morfotipos de diferentes populações. Nos indivíduos de Bauru, a média de concentração espermática foi de $5,6 \pm 4,1 \times 10^3$ spz/ μ l no morfotipo MM e de $9,9 \pm 5,5 \times 10^3$ spz/ μ l no morfotipo BM. Nos indivíduos de Uberlândia, a média foi de $5,3 \pm 0,75 \times 10^3$ spz/ μ l para o morfotipo MM e de $8,6 \pm 3,0 \times 10^3$ spz/ μ l no morfotipo BM.

A média geral da concentração espermática foi de $5,4 \pm 3,1 \times 10^3$ spz/ μ l no morfotipo MM, e de $9,2 \pm 4,3 \times 10^3$ spz/ μ l no morfotipo BM. A concentração espermática variou significativamente entre os morfotipos (teste T, $p = 0,03$).

DISCUSSÃO

As análises morfológicas, morfométricas e morfofisiológicas realizadas no presente estudo confirmaram a ocorrência de dois morfotipos nos machos adultos nas populações de *M. brasiliense*. Tais morfotipos diferiram em tamanho, morfologia do quelípodo, espinação, produção espermática e algumas relações morfométricas. Os grupos também apresentaram padrões alométricos distintos no desenvolvimento de

artículos do quelípodos, similar ao observado para algumas espécies de *Macrobrachium* (KURIS *et al.*, 1987, MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO *et al.*, 2014, WORTHAM e MAURIK, 2012). Portanto, confirma-se a hipótese de que existem grupos morfológicos distintos em *M. brasiliense*, sendo esses dois agrupamentos descritos no presente trabalho.

A ocorrência de machos de uma mesma espécie com diferentes caracteres morfológicos, como quelípodos muito desenvolvidos, quantidade de espinhos e diferentes colorações foi relatada por Holthuis (1952) para algumas espécies do gênero *Macrobrachium*. Contabilizando com o presente estudo, estão descritos morfotipos em cinco espécies de *Macrobrachium*, sendo essas, *M. rosenbergii* (KURIS *et al.*, 1987), *M. amazonicum* (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO *et al.*, 2014), *M. grandimanus* (WORTHAM e MAURIK, 2012), *M. idella* (Hilgendorf, 1898) (SOUNDARAPANDIAN *et al.*, 2014). Uma vez que Holthuis (1950, 1952) observou esse padrão em algumas espécies, Moraes-Riodades & Valenti (2004) na descrição dos morfotipos de *M. amazonicum*, sugeriram que a morfotipagem poderia ser uma característica do gênero *Macrobrachium*, mas que tal constatação dependeria de pesquisas com mais espécies por se tratar de um gênero com mais de 200 descritas. Com as pesquisas atuais, podemos observar que algumas espécies como *M. jelskii* ou então algumas populações situadas em represas ou reservatórios de *M. amazonicum* não possuem essa característica (Barros-Alves, 2012; Paschoal, 2017). Dessa forma algumas espécies ou populações podem apresentar exceções, uma vez que, a diferenciação morfotípica pode estar diretamente associada à produção específica de peptídeos de origem proteica pelas glândulas androgênicas, envolvendo outros fatores que podem estar associados à fisiologia endócrina desses animais (PANTALEÃO *et al.*, 2012, PASCHOAL, 2017; ROCHA e BARBOSA, 2017).

O ambiente onde esses animais habitam pode influenciar diretamente a ocorrência de morfotipos na população (MACIEL e VALENTI, 2009). Utilizando *M. amazonicum* como modelo, podemos observar uma gama de estudos, os quais foram listados abaixo, realizados após a descrição de morfotipos para essa espécie por Moraes-Riudades & Valenti (2004), os quais informam sobre a ocorrência ou não de morfotipos em diversas populações. A maioria dos estudos que relataram a ocorrência de morfotipos abordaram populações estuarinas (BENTES, 2011; FRÉDOU *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2012; FREIRE *et al.*, 2017.; FLEXA *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2006). Poucos são os estudos que relataram a ocorrência de populações com morfotipos de *M. amazonicum* situadas em rios localizados no interior do continente (VERGAMINI, 2009; PANTALEÃO *et al.*, 2014; PASCHOAL, 2017). A ocorrência de uma espécie com morfotipo em riachos no interior, como foi para *M. brasiliense*, é inédito. Esses ambientes possuem baixa disponibilidade de alimento quando comparado aos estuários, onde comumente se torna mais comum o encontro de morfotipos em espécies como *M. amazonicum*. (CHANTON e LEWIS, 2002; GONZÁLEZ-GORDILLO e RODRIGUEZ, 2003). O direcionamento energético pelos morfotipos para o desenvolvimento específico de apêndices pode ser de alto custo a esses animais. Portanto, isso explicaria a menor frequência de morfotipos em rios interiores devido a menor possibilidade de retorno energético que esses animais teriam no ambiente em que habitam.

Entre algumas das características dos morfotipos, o padrão de espinhação entre os grupos pode ser algo bastante variável, como visto em *M. amazonicum* (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO *et al.*, 2014). Segundo Moraes-Riudades & Valenti (2004), o conjunto de espinhos seria um dos artifícios que os machos podem utilizar durante comportamentos agonísticos, a fim de garantir o sucesso

reprodutivo ou disputas por habitats e alimento. No presente estudo, o padrão de espinhação de *M. brasiliense* apresentou um resultado similar ao de Moraes-Riodades & Valenti (2004), Pantaleão *et al.* (2014) para a espécie *M. amazonicum* e Rojas *et al.* (2012) para a espécie *C. caementarius*, sendo que o morfotipo dominante (BM) de *M. brasiliense* apresentou os maiores valores médios de altura e angulação dos espinhos quando comparando com o morfotipo submisso (MM). Estes resultados corroboram com o padrão dos morfotipos de *M. amazonicum* e *C. caementarius*, no qual GC2 e G2 (Grupo 2), respectivamente, obtiveram os maiores valores médio de angulação de espinhos observados.

Dentre os vários apêndices, os quelípodos são estruturas muito importantes para os camarões. Com eles os animais podem se alimentar, defender e ocupar territórios, cortejar e copular com fêmeas, preservar a estrutura social da população, dentre outros (ISMAEL e NEW, 2000; KARPLUS *et al.*, 1992; NAGAMINE e KNIGHT, 1980; VOLPATO e HOSHINO, 1984). No presente estudo, os três grupos mostraram diferentes constantes alométricas no desenvolvimento da maioria dos artículos dos quelípodos, sendo na maior parte das relações, alométrico positivo para BM, isométrico para MM e alométrico negativo para jovens. Portanto, cada grupo deve investir determinada quantidade de energia no desenvolvimento do mesmo apêndice ou artículo ao longo do ciclo de vida, correlacionando tal investimento às respectivas funções que essa estrutura apresenta nos distintos morfotipos. Segundo Moraes-Riodades (2004), cada morfotipo, possivelmente, executa uma função específica na população em que vive, adaptando-se a partir das características morfológicas de seu quelípodo, investindo mais energia em crescimento dessa estrutura do que no desenvolvimento da carapaça.

Com base nas comparações das relações morfométricas entre os morfotipos de *M. brasiliense*, diferenças significativas foram observadas entre quase todas as relações,

resultados que também foram observados em outras espécies de *Macrobrachium* e também de *Cryphiops* (Dana, 1852) (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; KURIS *et al.*, 1987; PANTALEÃO *et al.*, 2014; ROJAS *et al.*, 2012), reforçando mais uma vez a importância do quelípodo durante a vida adulta desses animais, o qual tem um papel fundamental na reprodução e modelagem social da população, pois, a presença de morfotipos influencia diretamente na abundância de indivíduos presentes nas maiores classes de tamanho, devido a alta agressividade que pode existir nos conflitos agonísticos entre indivíduos dominantes ou submissos (KARPLUS *et al.*, 1992; KARPLUS e BARKI, 2018).

A morfologia do sistema reprodutor de *M. brasiliense* não diferiu em formato em ambos os morfotipos, o par de testículos se conecta aos vasos deferentes pela região medial. O mesmo padrão de arranjo do sistema reprodutor foi observado por Chow *et al.* (1982) para a espécie *M. rosenbergii*. O autor citado denominou o sistema de *M. rosenbergii* como sendo em formato de V. No presente estudo, houve uma variação no tamanho das glândulas androgênicas, sendo essas maiores no morfotipo BM. Nesse morfotipo a GA alcança a parte da região da MVD, enquanto no morfotipo MM, a GA se restringia apenas a região DVD. Paschoal (2017) observou o mesmo padrão entre os morfotipos de *M. amazonicum*, evidenciando que os morfotipos dominantes como GC1 e GC2 possuem uma GA bem desenvolvida do que os morfotipos subordinados como CC e TC. Esses resultados contribuem para melhor compreensão da ocorrência de morfotipos em algumas espécies pelo fato que a GA está ligeiramente associada ao desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (VENTURA *et al.*, 2011). Portanto, morfotipos dominantes teriam essa glândula mais desenvolvida devido à necessidade de manutenção desses caracteres.

No presente estudo não foram observadas diferenças entre o padrão de produção de espermatozoides entre os morfotipos, provavelmente pelo fato de mecanismos reprodutivos serem altamente conservativos se comparado a outros aspectos biológicos como morfologia ou comportamento (JAMIESON, 1991; POLJAROEN *et al.*, 2010). Nos trabalhos de Paschoal (2017), Sagi *et al.* (1988) e Okumura & Hara (2004) sobre análises histológicas entre morfotipos de *M. amazonicum* e *M. rosenbergii*, foram observados padrões diferentes nos túbulos seminíferos apenas nos morfotipos intermediários, morfotipo CC de *M. amazonicum* e morfotipo OC de *M. rosenbergii* havendo muito mais espermatócitos do que espermatídes e espermatozoides quando comparado aos demais morfotipos de *M. amazonicum* e *M. rosenbergii*. Esse padrão diferencial não foi verificado no presente estudo possivelmente por *M. brasiliense* possuir apenas dois morfotipos, sendo ausente um morfotipo intermediário que poderia apresentar esse padrão de “diapausa reprodutiva”, como proposto por Paschoal (2017).

Quanto à histoquímica das regiões dos vasos deferentes, foi possível verificar diferenças entre as regiões, porém não entre os morfotipos. Por todo o vaso, a massa espermática está em uma matriz basófila, envolta por uma secreção tipo II eosinófila. Enquanto a secreção pode estar relacionada diretamente ao processo de maturação dos espermatozoides, a secreção tipo II está ligeiramente relacionada à proteção dessa matriz primária, principalmente em ambiente externo (POLJAROEN *et al.*, 2010). Na região distal, ocorre a produção uma secreção do tipo III a qual possui características basófilas. Essa secreção se mistura com as demais, contribuindo assim na formação do pacote espermático que será aderido ao esterno da fêmea (CHOW *et al.*, 1982). Paschoal (2017) relatou a presença de três tipos de secreções ao longo do vaso deferente de *M. amazonicum*, duas secreções basófilas e uma eosinófila, o esperma estaria distribuído na secreção I que possui caráter basófilo, enquanto uma secreção basófila

tipo II estaria envolta a esse conjunto da secreção I, e a secreção III, por último, que também compõem a massa espermática estando envolta a secreção tipo II.

Segundo Chow *et al.*, (1982), e Poljaoren *et al.*, (2010), as diferentes secreções possuem papéis diferentes que vão desde a maturação até o momento da cópula, sendo a secreção I relacionada a maturação, a secreção II tendo uma função de permeabilidade da massa espermática no ambiente externo e, por último, a secreção III possuindo a função de manter o espermatóforo aderido ao esterno da fêmea. As características das secreções I, II e III de *M. brasiliense* são similares ao encontrado para *M. rosenbergii* e *M. amazonicum*, portanto, evidenciando mais uma vez o caráter altamente conservativo que a produção de espermatozóides e secreções pode ter entre animais filogeneticamente relacionados, podendo ser uma característica para o gênero *Macrobrachium*.

A contagem da produção espermática final diferiu significativamente entre os morfotipos analisados, sendo o morfotipo BM o que mais produziu espermatozoides, a diferença de produção espermática entre os morfotipos pode ser consequência da ligeira diferença de tamanho entre esses animais. Paschoal e Zara (2019) contabilizou a produção espermática para cada morfotipo de *M. amazonicum* e verificou diferenças significativas apenas na quantidade da produção espermática do morfotipo CC, sendo esse o que apresentou os menores valores de concentração espermática (33×10^3 spz/ μ l). Esse valor pode ser um reflexo da organização histológica no VD desses animais, como já mencionado anteriormente. Nos demais morfotipos de *M. amazonicum* não foi constatado diferenças significativas na concentração final de espermatozoides.

A partir dos resultados morfológicos, morfométricos e morfofisiológicos obtidos, confirmou-se a existência de diferentes morfotipos de machos na espécie de camarão dulcícola *M. brasiliense*, sendo esses, os morfotipos “*Minor male*” e “*Bigger*

male”. As principais evidências de diferenciação foram o desenvolvimento dos quelípodos entre os grupos, ornamentos morfológicos diferenciais e maiores níveis de produção espermática. Com tais caracteres, foi possível a separação desses grupos, que além do que exposto aqui, podem ter outras diferenciações, como comportamentais por exemplo, igualmente ao que se sabe quanto aos morfotipos dentro do gênero *Macrobrachium* (KARPLUS e BARKI, 2018). Tal contribuição sobre a biologia da espécie *M. brasiliense* pode contribuir para o entendimento de estudos já feitos sobre estrutura populacional, ou futuros estudos de tal temática, devido ao grande fator modulador que a presença de morfotipos pode causar em uma população. Além do mais, o presente estudo fornece como base, informações essenciais para a identificação desses morfotipos em outras populações, podendo assim, contribuir com futuras pesquisas que utilizem essa espécie como modelo de estudo.

REFERÊNCIAS

- BARROS-ALVES SDP, ALMEIDA AC, FRANSOZO V, ALVES DFR, SILVA JCD & COBO VJ. 2012. Population biology of shrimp *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1778) (Decapoda, Palaemonoidea) at the Grande River at northwest of the state of Minas Gerais, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 24(3): 266-275.
- BAUER RT. 2004. Remarkable shrimps. Adaptations and Natural History of the Carideans, 1st ed. Oklahoma: University of Oklahoma Press, 282 p.
- BENTES BS. 2011. Ecologia, pesca e dinâmica populacional do camarão-da-Amazônia *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae)—capturado na região das ilhas de Belém-Pará-Brasil.
- BUENO SLS & RODRIGUES SA. 1995. Abbreviated larval development of the freshwater prawn, *Macrobrachium iheringi* (Ortmann, 1897) (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. *Crustaceana*, 665-686.

CHANTON J & LEWIS FG. 2002. Examination of coupling between primary and secondary production in a river-dominated estuary: Apalachicola Bay, Florida, U.S.A. *Limnology and Oceanography*, 47:683–697.

CHOW S, OGASAWARA Y & TAKI Y. 1982. Male reproductive system and fertilization of the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Bulletin of the Japanese Society and Science Fishery*, 48: 177-183.

COELHO PA & RAMOS-PORTO M. 1984. Camarões de água doce do Brasil: distribuição geográfica. *Revista Brasileira de Zoologia*, 2(6): 405-410.

FLEXA CE, SILVA KCA & CINTRA IHA. 2005. Morfometria do camarão-canela, *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862), no município de Cametá-Pará. *Boletim Técnico-Científico do Cepnor*, 5(1): 41-54.

FREIRE JL, MARQUES CB & SILVA BB. 2012. Estrutura populacional e biologia reprodutiva do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) em um estuário da região nordeste do Pará, Brasil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 16(2): 65-76.

FREIRE JL, BENTES B, FONTES VB & SILVA EM. 2017. Morphometric discrimination among three stocks of *Macrobrachium amazonicum* in the Brazilian Amazon. *Limnologica*, 64, 1-10.

GARCÍA-DAVÍLLA CR, ALCANTARA FB, VASQUEZ ER & CHUJANDAMA MS. 2000. Biologia reprodutiva do camarão *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) (CRUSTACEA: DECAPODA: PALAEMONIDAE) em igarapés da terra firme da Amazônia Peruana. *Acta Amazônica*, 4(30): 653- 664.

GARCÍA-DAVÍLLA CR & MAGALHÃES C. 2003. Revisão taxonômica dos camarões de água doce (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae, Sergestidae) da Amazônia Peruana. *Acta Amazonica*, 33(4): 663-686.

GONZÁLEZ-GORDILLO JI & RODRIGUEZ A. 2003. Comparative seasonal and spatial distribution of decapod larvae assemblages in three coastal zones off the southwestern Iberian Peninsula. *Acta Oecologica* 24(1): 219-233.

HARTNOLL RG. 1974. Variation in growth pattern between some secondary sexual characters in crabs (Decapoda Brachyura). *Crustaceana*, 131-136.

HARTNOLL RG. 1978. The determination of relative growth in Crustacea. *Crustaceana*, 281-293.

HAWKINS DM. 1980. Identification of outliers. London: Chapman and Hall.

HAWKINS SJ & HARTNOLL RG. 1982. The influence of barnacle cover on the numbers, growth and behaviour of *Patella vulgata* on a vertical pier. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 62(4): 855-867.

HIROSE GL, FRANSOZO V, TROPEA C, LÓPEZ-GRECO LS & NEGREIROS-FRANSOZO ML. 2013. Comparison of body size, relative growth and size at onset sexual maturity of *Uca uruguayensis* (Crustacea: Decapoda: Ocypodidae) from different latitudes in the south-western Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93(3): 781-788.

HOLTHUIS LBA. 1952. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemanidae.

ISMAEL D & NEW MB. 2000. Biology. In: NEW MB; VALENTI WC. (Eds.), *Freshwater Prawn Culture: the Farming of *Macrobrachium rosenbergii**. Blackwell, Oxford, pp. 18 – 40.

JAMIESON BGM. 1991. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press, 333 p.

JENNERJAHN TC & ITTEKKOT V. 2002. Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins. *Naturwissenschaften*, 89(1): 23-30.

JUNQUEIRA LCU & JUNQUEIRA LMMS. 1983. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. 1ed. São Paulo: Ed. Santos, 123 p.

KARPLUS I, HULATA G, OVADIA D & JAFFIA R. 1992. Social control of growth in *Macrobrachium rosenbergii*: IV. The role of claws in bull – runt interactions. *Aquaculture* 105, 281 – 296.

KARPLUS I & BARKI A. 2018. Male morphotypes and alternative mating tactics in freshwater prawns of the genus *Macrobrachium*: a review. *Reviews in Aquaculture*.

KENSLEY BF & WALKER I. 1982 Palaemonid shrimps from the Amazon Basin, Brazil (Crustacea: Decapoda: Natantia). Smithsonian Institution Press, 1982.

KNOX EM & NG RT. 1998. Algorithms for mining distance based outliers in large datasets. In Proceedings of the international conference on very large data bases (pp. 392-403). Citeseer.

KURIS AM, RA'ANAN Z, SAGI A & COHEN D. 1987. Morphotypic differentiation of male Malaysian giant prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Crustacean Biology*, 7(2), 219-237.

LIMA JDF, SILVA LMAD, SILVA TCD, GARCIA JDS, PEREIRA IDS & AMARAL KDS. 2014. Reproductive aspects of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) in the state of Amapá, Amazon River mouth. *Acta Amazonica*, 44(2): 245-254.

LOBÃO VL, VALENTI WC & MELLO JTC. 1986. Crescimento relativo de *Macrobrachium carcinus* (L.) (DECAPODA, PALAEMONIDAE). Boletim do Instituto de Pesca, 13(1): 105-109.

LUCENA-FREDOU F, ROSA-FILHO JS, SILVA MC & AZEVEDO EF. 2010. Population dynamics of the river prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) on Combu island (Amazon estuary). Crustaceana, 83(3): 277.

MACIEL CR & VALENTI WC. 2009. Biology, fisheries, and aquaculture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. Nauplius, 17(2): 61-79.

MANTELATTO FLM & BARBOSA LR. 2005. Population structure and relative growth of freshwater prawn *Macrobrachium brasiliense* (Decapoda, Palaemonidae) from São Paulo State, Brazil. Acta Limnologica Brasiliensia, 17(3): 245-255.

MANTELATTO FL, PILEGGI LG, MAGALHÃES C, CARVALHO FL, ROCHA SS, MOSSOLIN EC & BUENO SL. 2014. Avaliação dos Camarões Palemonídeos (Decapoda: Palaemonidae). Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação, 252-267.

MELO GAS. 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. Edições Loyola.

MELO MS & NAKAGAKI JM. 2013. Evaluation of the feeding habits of *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) in the Curral de Arame stream (Dourados/Mato Grosso Do Sul, Brazil). Nauplius, 21(1): 25-33.

MELLO MLS & VIDAL BC. 1980. Práticas de biologia celular. Edgard Blucher; Fundação de desenvolvimento da Unicamp.

MORAES-RIODADES PMC & VALENTI WC. 2004. Morphotypes in male Amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. Aquaculture, 236(1): 297-307.

NAGAMINE CM & KNIGHT AW. 1980. Development, maturation, and function of some sexually dimorphic structures of malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapoda, Palaemonidae). Crustaceana. 39: 141 – 152.

NEW MB & SINGHOLKA S. 1982. Freshwater prawn farming – A manual of the culture of *Macrobrachium rosenbergii*. FAO Fisheries Technical Papers, 225: 1-116.

NOGUEIRA CS, COSTA TM & ALMEIDA AC. 2018. Habitat choice behavior in *Macrobrachium brasiliense* (HELLER, 1862) (DECAPODA, PALAEMONIDAE) under laboratory conditions. Oecologia Australis, 22(1): 55-62.

OLIVEIRA LJF, SANT'ANNA BS & HATTORI GY. 2017. Reproductive potential of four freshwater prawn species in the Amazon region. Invertebrate Reproduction & Development, 61(4): 290-296.

PANTALEÃO JAF, GREGATI RA, TADDEI FG & COSTA RCD. 2011. Morphology of the first larval stage of *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1868) (Caridea: Palaemonidae). Nauplius, 19(1): 79-85.

PANTALEÃO JAF, HIROSE GL & COSTA RC. 2012. Relative growth, morphological sexual maturity, and size of *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. Invertebrate Reproduction & Development, 56: 80-190.

PANTALEÃO JAF, HIROSE GL & COSTA RC. 2014. Occurrence of male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. Brazilian Journal of Biology, 74(3): S223-S232.

PAPA LP, VICENTINI IBF, RIBEIRO K, VICENTINI CA & PEZZATO LE. 2004. Diferenciação morfológica de machos do camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum* a partir da análise do hepatopâncreas e do sistema reprodutor. Acta Scientiarum. Animal Sciences, 26(4): 463-467.

PASCHOAL LRP. 2017. História natural de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) e sua importância em reservatórios neotropicais do sudeste brasileiro.

PASCHOAL LRP & ZARA FJ. 2018. Sperm count of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) populations with distinct life histories, with introduction of a simple counting method. Aquaculture, 491: 368-374.

PASCHOAL LRP & ZARA FJ. 2019. The androgenic gland in male morphotypes of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). General and comparative endocrinology.

PEARSE AGE. 1960. Histochemistry: Theoretical and Applied. London: J&A Churchill, 998 p.

PEARSON K. 1901. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 2(11): 559-572.

PEREIRA MGC & CHACUR MM. 2009. Estrutura populacional de *Macrobrachium brasiliense* (Crustacea, Palaemonidae) do Córrego Escondido, Batayporã, Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista de Biologia Neotropical, 6(1): 75-82.

PEREIRA SGA & GARCIA D. 1995. Larval development of *Macrobrachium reyesi* Pereira (Decapoda: Palaemonidae), with a discussion on the origin of abbreviated development in palaemonids. Journal of Crustacean Biology, 15(1): 117-133

PILEGGI LG & MANTELATTO FL. 2012. Taxonomic revision of doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). Iheringia, Série Zoologia, 102: 426-437.

PILEGGI LG, MAGALHÃES C, BOND-BUCKUP G & MANTELATTO FL. 2013. New records and extension of the known distribution of some freshwater shrimps in Brazil. Revista Mexicana de Biodiversidad, 84(2): 563-574.

POLJAROEN J, VANICHYIRIYAKIT R, TINIKUL Y, PHOUNGPETCHARA I, LINTHONG V, WEERACHATYANUKUL W & SOBHON P. 2010. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology, 249(2): 81-94.

ROCHA SS & BARBOSA RJ. 2017. Population biology of *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Decapoda, Palaemonidae) from an artificial pond in Bahia, Brazil. Nauplius, 25 (e2017023):1-13.

ROJAS R, MORALES MC, RIVADENEIRA MM & THIEL M. 2012. Male morphotypes in the Andean river shrimp *Cryphiops caementarius* (Decapoda: Caridea): morphology, coloration and injuries. Journal of Zoology, 288(1): 21-32.

SAGI A, MILNER Y, & COHEN D. 1988. Spermatogenesis and sperm storage in the testes of the behaviorally distinctive male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae). The Biological Bulletin, 174(3): 330-336.

SAGI A & RA'ANAN Z. 1988. Morphotypic differentiation of males of the fresh-water prawn *Macrobrachium rosenbergii*: changes in the midgut glands and the reproductive system. Journal of Crustacean Biology, 8(1), 43-47.

SAMPEDRO MP, GONZÁLEZ-GURRIARÁN E, FREIRE J & MUIÑO R. (1999). Morphometry and sexual maturity in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in Galicia, Spain. *Journal of Crustacean Biology*, 19(3): 578-592.

SANTOS JA, SAMPAIO CM & SOARES-FILHO AA. 2006. Male population structure of the Amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum*) in a natural environment. *Nauplius*, 14(2): 55-63.

SANTOS MAL, CASTRO PM & MAGALHÃES C. 2018. Freshwater shrimps (Crustacea, Decapoda, Caridea, Dendrobranchiata) from Roraima, Brazil: species composition, distribution, and new records. *Check List*, 14: 21.

SOKAL RR, ROHLF FJ, & LAHOZ-LEÓN M. 1979. *Biometría: principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*.

SOUNDARAPANDIAN P, DINAKARAN GK & VARADHARANJAN D. 2013. Alternative Mating Strategies in Male Morphotypes of the Prawn *Macrobrachium idella idella* (Hilgendorf, 1898). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5(204): 2.

TADDEI FG, HERRERA DR, DAVANSO TM, SILVA TED, COSTA RC & FRANSOZO A. 2017. Length/weight relationship and condition factor of *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) and *M. brasiliense* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) in two locations in the state of São Paulo. *Nauplius*, 25.

THIEL M, CHAK STC & DUMONT CP. 2010. Male morphotypes and mating behavior of the dancing shrimp *Rhynchocinetes brucei* (Decapoda: Caridea). *Journal of Crustacean Biology*, 30(4): 580-588.

VALENTI WC, LOBÃO VL & MELLO JT. 1989. Crescimento relativo de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (CRUSTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6(1): 1-8.

VALENTI WC, MELLO JDTC & CASTAGNOLLI N. 1993. Efeito da densidade populacional sobre as curvas de crescimento de *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) em cultivo semi-intensivo (Crustacea, Palaemonidae). Revista brasileira de Zoologia: 427-438.

VENTURA T, AFLAFO ED, WEIL S, KASHKUSH K & SAGI A. 2011. Isolation and characterization of a female-specific DNA marker in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Heredity, 107(5): 456.

VERGAMINI FG. 2009. Analise comparativa entre populações costeiras e continentais do camarão *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Palaemonidae) por meio de dados morfológicos e moleculares. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. p. 91.

VOLPATO GL & HOSHINO K. 1984. Adaptative process derived from the agonistic behavior in the freshwater prawn *Macrobrachium iheringi* (Ortmann, 1897). Boletim de Fisiologia Animal, 8: 157 – 163.

WORTHAM JL & MAURIK LN. 2012. Morphology and morphotypes of the Hawaiian river shrimp, *Macrobrachium grandimanus*. Journal of Crustacean Biology, 32(4): 545-556.

ZAR JH. 2010. Biostatistical analysis fifth edition. Pearson Education Upper Saddle River, New Jersey, USA.

ZARA FJ, TOYAMA MH, CAETANO FH & LÓPEZ-GRECO LS. 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). Journal of Crustacean Biology, 32(2): 249-262.