

RAFAEL ANTUNES BAGGIO

AVALIANDO A PATERNIDADE EM *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763)

(OCYPODIDAE, DECAPODA) ATRAVÉS DE MARCADORES

MICROSSATÉLITES

CURITIBA
2009

RAFAEL ANTUNES BAGGIO

AVALIANDO A PATERNIDADE EM *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763)
(OCYPODIDAE, DECAPODA) ATRAVÉS DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES

Monografia apresentada ao departamento
de Zoologia da UFPR como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador Prof. Walter A. Boeger.

CURITIBA
2009

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador prof. Walter Boeger, pela oportunidade, confiança e orientação que possibilitaram a realização deste trabalho;

Ao prof. Marcio Pie, pelos incentivos, subsídios teóricos e práticos, conselhos e discussões sobre diversos assuntos, biológicos ou não;

Ao pessoal do LEMPE, que subsidiam o trabalho no laboratório com conhecimento, ajuda e incentivo, em especial à Lua, que me ajudou a realizar tal projeto; ao Zé pelo seu grande conhecimento compartilhado comigo; à Lu, que coordena o laboratório e sempre está disposta a ajudar a todos; e aos demais presentes (Rapha, Marcel, Flávio, Rachel, Marlus, Rê, Sandra, Sérgio, Carina, Mentira, Pablo, Nefer, Isabela) ou que seguiram sua vida (Rogério, Guilherme, Viviane, Letícia, Leslie, Escova), sem contar nas muitas risadas que a convivência com eles me traz;

À minha família, em especial aos meus pais Olindo e Tânia pelo intenso carinho, apoio e investimento depositados em mim, e que me ensinaram a ser a pessoa que sou;

À Dé, pelo grande carinho e incentivo, vibrando comigo em cada vitória e me dando força para continuar a superar os obstáculos;

Aos grande amigos criados na faculdade, que me faziam ter vontade de ir à faculdade 7:30 da manhã e sair apenas as 11 da noite: Endrio, Amanda, Cami V., Flavinho, Marcelo, Cidão, Ceará, Maira, Puf, Ju, Fer, Cami G., Mel, Bel, Jé, Tata, Risa, Carol, Julia, Li, Joãozinho, Berne, dentre tantos outros; que fizeram nossa turma diferente.

Ao curso de Biologia da UFPR, tanto aos funcionários que fazem o curso funcionar como aos professores, que sempre acrescentaram algo pessoal e profissionalmente;

Ao GIA-UFPR e SETI-UGF pelo financiamento do projeto;

À banca, pelas ricas considerações e contribuições ao trabalho;

Obrigado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
SUMÁRIO.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 REPRODUÇÃO DO CARANGUEJO-UÇÁ <i>Ucides cordatus</i>	4
2.2 POLIANDRIA.....	8
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 OBJETIVO GERAL.....	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
5. RESULTADOS.....	15
6. DISCUSSÃO.....	16
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécime adulta de <i>Ucides cordatus</i>	1
--	---

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores de PCR contendo fragmento microssatélite utilizados no estudo.....	14
Tabela 2 – Larvas extraídas e genotipadas por fêmea, para cada <i>locus</i>	15
Tabela 3 – Número de alelos provenientes de proenitores masculinos encontrados na prole de 10 fêmeas de <i>Ucides cordatus</i>	15

RESUMO

O caranguejo-uçá *Ucides cordatus* possui ampla distribuição ao longo de manguezais da costa ocidental do oceano Atlântico, estando presente do Sul da Flórida até Santa Catarina. Considerada uma das espécies chaves de tal ecossistema, possui também grande importância econômica e social para as comunidades que vivem ao redor dos manguezais. Fatores como sobre-pesca, perda de habitat e a DCL têm causado diminuição dos estoques naturais ou do tamanho dos indivíduos de tal espécie. Dessa forma, são necessários estudos que fundamentem estratégias de manejo e conservação para *U. cordatus*, bem como a produção de larvas em cativeiro. Nesse trabalho, foram utilizados marcadores de microssatélites para avaliar a múltipla paternidade em *U. cordatus*. Para tal, foram genotipadas 10 fêmeas, mantidas em caixas d'água em manguezal de Guaratuba-PR para projeto de repovoamento, e aproximadamente 10 de suas respectivas larvas, através de 6 conjuntos de marcadores moleculares microssatélites. Em 40% das fêmeas foi detectada múltipla paternidade. As prováveis justificativas para a presença de poliandria na espécie são cópulas forçadas por machos, ausência de proteção da fêmea após a cópula e manutenção de espermatozoides viáveis na espermateca das fêmeas entre períodos reprodutivos subsequentes. Dentre as vantagens genéticas que podem justificar a manutenção de poliandria em *Ucides cordatus* estão a minimização de riscos de incompatibilidades genéticas e o aumento da diversidade de prole.

1. INTRODUÇÃO

O caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), popularmente conhecido como “caranguejo-uçá”, “catanhão”, “caranguejo do mangue” ou “caranguejo-verdadeiro” (Figura 1) é classificado como um crustáceo decápode da família Ocypodidae (Rafinesque, 1815).



Figura 1 – Espécime adulta de *Ucides cordatus*.
Fonte: GIA/UFPR

Ucides cordatus apresenta uma ampla distribuição pela costa oeste do Oceano Atlântico, abrangendo manguezais do sul da Flórida (EUA) até o extremo sul de Santa Catarina. Esta espécie é uma das mais conspícuas nos ecossistemas de manguezais dessas regiões, constituindo cerca de 84% da biomassa da epifauna em algumas regiões (Koch, 1999).

Sua alimentação consiste basicamente de folhas senescentes, sendo responsável pelo processamento de até 67% dessas folhas no ambiente, segundo estudo de Schories *et al.* (2003) em manguezais de Bragança - SP. Os nutrientes são reciclados através das fezes do uçá, ricas em carbono, nitrogênio e biomassa bacteriana, que quando liberadas em suas galerias promovem a retenção de nutrientes e energia dentro do ecossistema (Nordhaus *et al.*, 2003).

O comportamento de escavar extensas galerias no solo lodoso dos manguezais proporciona a aeração e a drenagem de sedimentos (Blankensteyn *et al.*, 1997). As tocas servem como refúgio contra predadores, proteção durante a muda e para armazenamento do alimento (Sant’Anna, 2006). Durante a muda, os indivíduos, com a nova carapaça já em formação fecham suas galerias e permanecem inativos

por vários dias (Silva, 2002) até que a nova carapaça ganhe a consistência necessária para locomoção e proteção contra predadores.

Entre os predadores do caranguejo-uçá, além dos seres humanos, destacam-se algumas aves, tais como o Socó *Ardea cocoi* (Linnaeus, 1766) e a Saracura *Aramides mangle* (Spix, 1825), além do mamífero Mão-Pelada *Procyon cancrivorus* (Cuvier, 1798) a qual é especialista na captura de caranguejos (Fiscarelli & Pinheiro, 2002; Olmos & Silva, 2001).

Sua abundância, posição na cadeia trófica, envolvimento na regulação da ciclagem de nutrientes, do fluxo de energia e da aeração do sistema (Cardoso, 2004) denotam *U. cordatus* como uma espécie chave nos manguezais do oeste do Atlântico (Nordhaus *et al.*, 2006).

Devido à sua abundância e facilidade de captura, a exploração do caranguejo-uçá é uma das mais importantes atividades econômicas em estuários do Brasil, sendo de extrema relevância para a economia doméstica das comunidades residentes no entorno dos manguezais (Kjerfve & Lacerda, 1990; Vieira *et al.*, 2004). Segundo Glaser (2003), *U. cordatus* é coletado e comercializado por 42% das famílias, sendo a principal fonte de renda de 38%, em estudo com 21 comunidades localizadas ao redor do estuário do Rio Caeté (Pará, Brasil).

A sobre-exploração desse caranguejo (Ministério do Meio Ambiente, 2004), juntamente com a perda de habitat por degradação de manguezais e a Doença do Caranguejo Letárgico (Boeger *et al.*, 2005), têm causado declínio das populações em estoques naturais e/ou expressiva redução de seu tamanho corporal (Amaral & Jablonski, 2005).

Assim, devido à sua grande importância sócio-econômica e ecológica (Glaser e Diele, 2004), é de suma importância o desenvolvimento de estudos a respeito da biologia do caranguejo *U. cordatus* que auxiliem o desenvolvimento de estratégias de manutenção e manejo dos estoques naturais.

Especificamente, a compreensão da biologia reprodutiva é considerada por Diele (2000) como fator crucial no estudo da dinâmica populacional de uma espécie. Para o caranguejo-uçá, os estudos reprodutivos estão restritos a trabalhos sobre fertilidade, fecundidade, embriologia e períodos de maturação (Castilho, 2006).

A múltipla paternidade é, particularmente, um importante fator que afeta a heterozigosidade e a habilidade de colonização das espécies (Zane *et al.*, 1999), a intensidade da seleção sexual (Evans & Magurran, 1999) e o tamanho efetivo da

população (Sugg & Chesser, 1994). Esse, portanto, é um fator que deve ser considerado no manejo e na conservação da espécie (Jensen *et al.*, 2006).

Técnicas moleculares são ferramentas extremamente úteis para a resolução de questões difíceis de se abordar experimentalmente, podendo ser utilizadas em diversas áreas da biologia, como ecologia, sistemática filogenética e etologia, incluindo a detecção de múltipla paternidade (Frankham *et al.*, 2004). Microssatélites são especialmente importantes nesses estudos e representam uma revolução na biologia da conservação, ecologia molecular e genética de populações (Luikart & England, 1999). Por possuir alta taxa de mutação, resultando em altos níveis de diversidade alélica, pela facilidade e segurança na amplificação e na diferenciação dos alelos e pela herança co-dominante (Luikart & England, 1999), microssatélites permitem a diferenciação de indivíduos, utilizando-se apenas alguns *loci*. Assim, a técnica é especialmente eficaz em relação a questões de paternidade (Selkoe & Toonen, 2006).

Dessa forma, nesse trabalho, foi avaliada a existência de poliandria em *U. cordatus*, utilizando, para isso, marcadores moleculares microssatélites.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 REPRODUÇÃO DO CARANGUEJO-UÇÁ *Ucides cordatus*

O caranguejo-uçá *Ucides cordatus* é uma espécie de *Brachyura* longeva, podendo viver mais de dez anos e alcançando a maturidade sexual em torno de 2,1 a 3,0 anos para fêmeas (Diele, 2000), quando atingem 43mm de largura de carapaça para fêmeas e 44mm para machos (Dalabona, 2001).

O período reprodutivo do *U. cordatus* ocorre de outubro a maio, e apresenta íntima relação com a estação de chuvas, como ocorre em outros caranguejos semi-terrestres (Diele, 2000; Pinheiro, 2001). Segundo Wunderlich (2008), a redução térmica e do fotoperíodo em julho parecem causar inibição da maturação gonadal, esta começando em agosto. Esse processo, segundo esse autor, é de extrema vantagem visto que sincroniza a reprodução com os meses de maior temperatura e maiores amplitudes de maré, o que minimiza o tempo de desenvolvimento embrionário e a predação na fase planctônica (Morgan, 1996; Morgan & Christy, 1996).

Já os machos com gônadas maduras são encontrados durante quase todo o ano, fato que se explica pela maior rapidez no ciclo espermiogênico em relação ao oogênico (Alves, 1975).

O comportamento reprodutivo do caranguejo-uçá é descrito por Góes *et al.* (2000) em quatro eventos principais: **macho espumando**, no qual os machos produzem uma espuma branca, exalando odor característico de caranguejo por todo o mangue; **andada para acasalamento**, no qual há grande movimentação de indivíduos e batalhas entre machos, machos e fêmeas e entre fêmeas; **acasalamento**; e **liberação larval**, quando as fêmeas abrem e fecham o abdome seguidamente para liberar ovos.

Nascimento (1993) observou uma única migração ao ano, quando os caranguejos saem de suas galerias e caminham em direção ao mar para cópula e liberação de larvas. Entretanto, Fiscarelli e Pinheiro (2002) realizaram um estudo etnobiológico que demonstrou a presença de dois tipos de andada em manguezal de Iguape - SP, sendo uma para acasalamento e outro para liberação larval. Da mesma forma, catadores de Santo Amaro - BA descrevem 3 andadas, sendo 2 para acasalamento e 1 para liberação larval, em estudo de Souto (2007).

Costa (1979) descreveu o período da andada em Fortaleza - CE, na qual indivíduos de ambos os sexos de *U. cordatus* apresentam extrema atividade, abandonando suas galerias por 2 a 3 dias e se deslocando desordenadamente,

quando se perseguem mutuamente. Nessa época, ocorre maior interação entre os machos pela posse das fêmeas (Fiscarelli & Pinheiro, 2002), sendo comum encontrar machos em combate ou perseguindo fêmeas, quando são facilmente capturados (Branco, 1993). Durante as batalhas entre machos e fêmeas presenciadas por Costa (1979), os indivíduos utilizam seus quelípodes, e, quando a fêmea já apresenta movimentos lentos, provavelmente cansada, deixava o machos carregá-la para o interior das galerias. Algumas fêmeas foram encontradas por Góes *et al.* (2000) agarradas em galhos e rizóforos acima do nível da maré, fugindo de machos. Ao final do período de andada, tal autor presenciou ainda fêmeas jovens tentando copular com machos pouco maiores, mas esses a expulsavam com golpes de seus quelípodos. Nessas épocas, a densidade sobre o sedimento chega a 1,8 ind./m² e mais de 0,4 lutas/m² (Sant'Anna, 2006).

Segundo Costa (1979), a andada ocorre durante as marés mais baixas do mês, fator já descrito por Diele (2000) e Góes *et al.* (2000) para *U. cordatus* e corroborado por Sant'Anna (2006), que encontrou correlações positivas entre aumento de luminosidade e maiores amplitudes de maré com o fenômeno da andada.

Próximo às galerias, os machos do caranguejo-uçá liberam espuma ao redor de seu corpo a fim de facilitar seu reconhecimento pelas fêmeas, o que remete à importância dos estímulos visuais na atração sexual em caranguejos braquiúros (Hartnoll, 1969). Segundo o mesmo autor, espécies de Grapsidae e Ocypodidae caracterizam-se por apresentar cortes curtas, com o simples propósito de um macho sexualmente maduro encontrar uma fêmea receptiva. Entretanto, estudos de competição entre caranguejos machos demonstram que o tamanho do indivíduo é o principal fator de sucesso reprodutivo, provavelmente por trazer vantagens tanto para segurar as fêmeas no acasalamento quanto na luta com outros machos (Brockerhoff & McLay, 2005).

O acasalamento ocorre com a entrada da fêmea em uma toca abandonada. Em seguida, um macho a puxa pelo quelípode até a superfície (Castilho-Westphal *et al.*, 2008), onde a fêmea adota decúbito dorsal e o macho a cobre, depositando o líquido seminal nas aberturas das bases do terceiro par de patas (Alves, 1975).

Após a cópula, as fêmeas dos braquiúros armazenam a secreção espermática em espermatecas, órgãos saculiformes compostos por uma cápsula de tecido conjuntivo e um epitélio colunar interno, responsável pela síntese de grande quantidade de secreção (Sant'Anna, 2006). Esses órgãos possuem a função de receber os espermatóforos e armazená-los até a fertilização dos ovócitos (López-

Greco *et al.*, 1999), o que ocorre na câmara de fecundação, em sua porção inferior (Beninger *et al.*, 1988).

Em *U. cordatus*, a espermateca possui conexão ventral com o oviduto e com a vagina, padrão descrito para Calappidae, Geryonidae, Leucosiidae, Crystidae, Majidae, Grapsidae e Ocypodidae (Fransozo *et al.*, 2006). Segundo Van der Brink & McLay (2008), esse tipo de espermateca faz com que o esperma do último macho a copular fertilize os óvulos primeiro, ao contrário das espermatecas com conexão dorsal. Devido a isso, algumas espécies de caranguejos cuidam da fêmea após o acasalamento para evitar que machos copulem posteriormente e tenham preferência na fecundação (e.g. Urbani *et al.*, 1998; Brockerhoff & McLay, 2005).

O fluido presente nas espermatecas consiste em uma mistura de esperma e fluido seminal. As secreções femininas são importantes pois possuem polissacarídeos e glicoproteínas utilizados na abertura dos espermatóforos e na estocagem e manutenção de espermatozóides viáveis ao longo do ano (Sant'Anna, 2006; Castilho, 2006). Assim, são encontradas quantidades consideráveis de espermatóforos em espermatecas de *U. cordatus* durante todo o ano, apesar da sazonalidade reprodutiva da espécie. Dessa forma, a fêmea carregaria seu estoque espermático até a época reprodutiva e, caso não haja cópula, utilizaria tais espermatozóides para a época de desova. Em *Uca lactea*, os espermatozóides permanecem viáveis nas espermatecas por 10 meses (Yamaguchi, 1998) e em *Callinectes sapidus* por até dois anos, podendo fertilizar múltiplas massas de ovos (Hines *et al.*, 2003).

Castilho (2006) ainda considera que, devido à presença de fêmeas com ovários maduros a partir de outubro e com o início do aparecimento de fêmeas ovígeras em novembro, os espermatozóides utilizados na fecundação sejam provenientes das cópulas anteriores ao período de outubro, período esse que não coincide com a época de andada, de dezembro a maio. Assim sendo, as cópulas realizadas na andada não seriam responsáveis pela produção de larvas no mesmo período reprodutivo, mas sim pela reposição de espermatozóides para o próximo evento reprodutivo ou para uma segunda desova no mesmo período. Entretanto, Dalabona & Silva (2005) e Dalabona (2001) sugeriram ausência de desovas múltiplas para a espécie, devido à inexistência de ovócitos em maturação em fêmeas desovadas. Além disso, os autores encontraram fêmeas com ovário maturo em abril na Baía de Laranjeiras - PR. Da mesma forma, Sant'Anna (2006) em Iguape - SP encontrou fêmeas maduras entre outubro e março, com dois picos de fêmeas com ovários maduros, em outubro e fevereiro. Por conseguinte, a andada pode ser importante tanto para a reprodução de algumas

fêmeas na mesma época reprodutiva quanto para a reposição de esperma para o próximo evento reprodutivo em outras.

Nas espermatecas, os espermátóforos podem estar estocados em pacotes espermáticos delimitados e definidos, contendo espermátóforo, espermatozóides e secreções seminais; ou livres e misturados às excreções masculinas e femininas (Diesel, 1888). Sant'Anna (2006) demonstrou a ausência de pacotes espermáticos em *U. cordatus* com o esperma de diferentes cópulas ficando misturados na espermateca. Segundo o autor, aparentemente, o primeiro macho a copular com a fêmea tem chances iguais de ser o genitor. Já em espécies que armazenam os espermátóforos em pacotes espermáticos, há estratificação do esperma dos machos de forma que o esperma do último macho tem maior probabilidade de fecundar a maior porção dos óvulos (e.g. Urbani *et al.*, 1998).

A fecundação é interna e ocorre durante a oviposição (Castilho, 2006). Hattori & Pinheiro (2003) e Pinheiro *et al.* (2003) encontraram fertilidade de 71200 a 220800 larvas em condições laboratoriais. Também foi encontrada reduzida fertilidade relativa de fêmeas de maior porte, provavelmente devido à insuficiência de espermatozóides na espermateca (Hattori & Pinheiro, 2003). Tal afirmação seria explicada pela maior dificuldade dos machos em manipulá-las e copular com fêmeas de tamanho similar ao seu. Como mecanismo compensatório, os autores encontraram que fêmeas de maior porte (LC > 70mm) tem fertilidade 87,8% superior às de menor porte.

A eclosão das larvas ocorre de forma sincronizada (Castilho, 2006; Castilho-Westphal *et al.*, 2008). Durante a desova, os espermátóforos se dissolvem na espermateca e ficam em suspensão na câmara de fecundação, onde encontram os ovócitos e ocorre a fecundação (Diesel, 1989). As desovas das fêmeas de *U. cordatus* ocorrem entre o crepúsculo e o amanhecer, (Freire, 1998; Góes *et al.*, 2000; Hattori e Pinheiro, 2003). Dessa forma, apesar de não haver registros de atividade noturna durante a andada, as fêmeas ovígeras provavelmente saem de suas galerias em direção às margens do manguezal no período noturno (Sant'Anna, 2006). A liberação larval pode ocorrer, entretanto, dentro das tocas inundadas, o que justifica a menor quantidade de andada com tal objetivo (Góes *et al.*, 2000).

As desovas ocorrem em manguezais inundados, com picos de desova um dia antes da lua nova (Castilho, 2006). As densidades iniciais de zoea I durante essa época podem chegar a 23 mil larvas/m³ (Castilho, 2006; Castilho-Westphal *et al.*, 2008).

Os estágios seguintes de zoea podem, dependendo das condições ambientais, permanecer em regiões estuarina por três ou quatro semanas (Diele, 2000), ou serem exportadas para a costa (Freire, 1998).

Baixas salinidades são letais para os estágios mais avançados de zoea (Diele & Simith, 2006), sendo a salinidade 30 a com maior taxa de sobrevivência (72%) (Simith & Diele, 2008). Dessa forma, há a necessidade de exportação de sua fase larval para áreas distantes de águas costeiras mais salinas, propiciando maior sobrevivência larval e manutenção da viabilidade populacional. Essa estratégia reprodutiva é aparentemente responsável pela ausência de estruturação genética das populações ao longo da costa brasileira (Oliveira-Neto *et al.*, 2007a, Oliveira-Neto *et al.*, 2007b).

O recrutamento das megalopas de *U. cordatus* é influenciado por odores intra-específicos e inter-específicos, que indicam as condições favoráveis para colonização (Diele & Simith, 2007).

2.2 POLIANDRIA

Há mais de 150 anos, Charles Darwin, pioneiramente discorreu sobre as hipóteses de seleção sexual. Ele utilizava essa explicação para justificar a presença de caracteres exagerados, que poderiam resultar na diminuição na sobrevivência dos machos. Conforme sua interpretação, esses caracteres seriam fixados na espécie (selecionados) através da competição que poderia ocorrer diretamente por luta entre machos ou por escolha da fêmea.

O conflito sexual presente nas competições intra-sexual e inter-sexual está relacionado às diferentes táticas que as espécies utilizam durante a reprodução. Enquanto as fêmeas produzem óvulos grandes e que demandam grande quantidade de energia, tendo sua produção restrita em número, os machos produzem gametas pequenos e móveis, pouco custosos, podendo priorizar sua produção em quantidade.

Dessa forma, na escolha dos parceiros para a reprodução, os machos buscam grande quantidade de acasalamentos, dispersando ao máximo seu esperma, enquanto as fêmeas priorizam a qualidade do acasalamento, através da escolha do melhor macho, já que o aumento no número de cópulas não trará aumento na quantidade de prole produzida.

Além disso, há os altos riscos e custos que a cópula gera, tais como o aumento do risco de predação na procura por parceiros (Koga *et al.*, 1998), de adquirir doenças,

de sofrer lesões e de morrer em consequência da cópula em si, além dos gastos energéticos que a cópula demanda (Jennions & Petrie, 2000),

Contudo, apesar dos argumentos anteriores inferirem vantagem da monogamia para fêmeas, o advento de novas técnicas moleculares tem demonstrado altos níveis de múltipla paternidade em um grande leque de grupos animais (Birkhead & Moller, 1998).

Observações comportamentais cuidadosas e conhecimento a respeito da história natural dos grupos revelam que a múltipla paternidade pode decorrer da solicitação ativa das fêmeas por cópulas, de cópulas forçadas ou da fertilização por machos satélites (Jennions & Petrie, 2000). Os dois últimos casos podem explicar cópulas múltiplas em alguns grupos, enquanto a justificativa da primeira hipótese segue obscura.

Há duas correntes que procuram explicar as vantagens associadas à poliandria para as fêmeas. Benefícios materiais, como o aumento do cuidado parental (Nakamura, 1998), suplemento de esperma adequado (Drnevich *et al.*, 2001), defesas químicas (González *et al.*, 1999), transferência de nutrientes (Arnqvist & Andrés, 2008) e estimulantes (Wagner *et al.*, 2001), ou diminuição do risco de obter cópulas apenas com machos estéreis, somam-se aos benefícios genéticos, como evitar incompatibilidades genéticas e endocruzamentos, “*bet-hedging*” (Fox & Rauter, 2003) ou ganhar bons genes e aumentar a diversidade genética da prole (Moore & Ball, 2002). A primeira corrente é criticada pela incapacidade de gerar evolução por ganhos apenas materiais, enquanto a última é criticada pela dúvida a respeito da capacidade das características sexuais serem herdáveis.

A despeito da baixa herdabilidade de diversos caracteres não sexuais, fruto da alta variância ambiental, Pomiankowski e Moller (1995) encontraram maior herdabilidade em caracteres sexuais do que somáticos. Radwan (1998) quantificou a herdabilidade do sucesso reprodutivo de macho e sua prole em 0,28 para o ácaro *Rhizoglyphus robini*. Wedell & Tregenza (1998), estudando o grilo *Gryllus bimaculatus*, também encontraram caracteres de atração sexual herdáveis.

Muitas vezes, os caracteres sexuais podem estar ligados a caracteres não sexuais. Moller (1997) descreve uma correlação positiva entre a coloração das penas de pássaros com tamanho do baço. Dessa forma, esses machos mais coloridos, que possuem melhor sistema imune, podem ser preferidos durante a seleção sexual pré-copulatória. Nesse caso, indivíduos com melhor capacidade imune têm menor quantidade de parasitos que diminuem a coloração das penas.

Em alguns casos, fêmeas de machos atrativos têm maior cuidado parental e menor quantidade de cópulas extras (e.g. Gabor & Holliday, 1997). Machos atrativos também podem ter maior cuidado parental. Entretanto, muitas vezes, a escolha pré-copulatória pode não existir se o macho não liberar sinais ou se a fêmea não conseguir detectá-los. Investir em traços sexuais selecionáveis é muito custoso, reduzindo a sobrevivência do indivíduo (Grafen, 1990).

Uma nova forma de escolha sexual, descoberta recentemente, descreve a chamada seleção pós-copulatória, na qual os machos possuem estratégias para monopolizar o acesso aos óvulos, enquanto a fêmea resiste à manipulação do macho e seu controle da reprodução (Zeh & Zeh, 2003). Dessa forma, machos superiores, ou com melhor qualidade de esperma, têm maior chance de fertilizar os óvulos. A seleção pós-copulatória pode ocorrer tanto através da competição espermática quanto por escolha críptica da fêmea.

A competição espermática refere-se à competição que os espermatozoides dos machos realizam entre si, o que torna importante no sucesso reprodutivo a morfologia da genitália, o tamanho, a morfologia e a quantidade de espermatozoides, as cortes pré e pós-copulatória, a liberação de substâncias afrodisíacas e a transferência de nutrientes. Essas estratégias são favoráveis pois podem aumentar a receptividade da fêmea à fecundação ou o investimento da fêmea na prole, além de retirar o esperma de outros machos ou reduzir a probabilidade de novos acasalamentos pela fêmea. Por exemplo, machos com sistema imune superior podem aumentar a liberação de andrógenos, que são imunossupressores. Dessa forma, são capazes de aumentar a produção de espermatozoides sem ter uma queda vertiginosa no sistema imune (e.g. Yan & Stevens, 1995).

Assim como caracteres sexuais, traços sexuais competitivos provenientes da competição espermática também tendem a ser custosos (Jennions & Petrie, 2000).

A escolha críptica da fêmea sugere que ela não é apenas receptora passiva de esperma, mas que determina diretamente a paternidade (Jennions & Petrie, 2000). Dessa forma, a fêmea é capaz de selecionar o esperma de qual macho fecundará seus óvulos, por escolhas durante e/ou após a cópula. Os mecanismos nos quais tal evento ocorre são variados: não ovular, não maturar o zigoto ou abortá-los, remover ou manter tampões genitais, descartar ou não descartar o esperma, ou terminar a cópula antes da transferência total de esperma. Há ainda mecanismos específicos, como fagocitose de espermatozoides de alguns machos através linfócitos (Vacquier, 1998), poliespermia com fusão do núcleo de um espermatozoide escolhido pelo ovo

(Eberhard, 1996) ou alocação diferencial dos nutrientes para os zigotos (Moller & Thornhill, 1998).

Diferentemente dos traços sexuais competitivos, a escolha críptica da fêmea parece ter baixo custo (Eberhard, 1996) por selecionar caracteres arbitrários e não dependentes das condições ambientais (Grafen, 1990).

A poliandria, dessas formas, traz oportunidade para escolhas pós-copulatórias que aumenta os benefícios genéticos para sua prole (Zeh & Zeh, 1997; Jennions & Petrie, 2000).

Além disso, a poliandria diminui a probabilidade de ocorrência de incompatibilidades genéticas, pelo simples aumento da diversidade genética dos espermatozoides ou por detecção de tais fenômenos pela fêmea (Zeh & Zeh, 1996; Jennions & Petrie, 2000). Entre essas, estão:

a) depressão por endogamia: reduz a heterose, aumenta a probabilidade de expressão de alelos deletérios ou de interações epistáticas;

b) conflitos intragenômicos: distorção de segregação, letalidade maternal, impressão genômica, endossimbiose, transposons e determinação sexual complementar;

c) heterose;

d) antagonismo genético;

e) imunocompatibilidade.

Evitar incompatibilidades e manter a heterozigose é tão importante quanto adquirir bons genes (Zeh & Zeh, 1996), e não pode ser selecionada pela seleção pré-copulatória da fêmea.

Outra vantagem da poliandria é o “*bet-hedging*” (Fox & Rauter, 2003). Nela, a fêmea faz múltiplas cópulas com machos diferentes, fator que aumenta a média geométrica de aptidão, para evitar má escolha do macho pela fêmea, por incertezas ambientais ou para ter pelo menos alguns indivíduos de sua prole com bons genes.

Alguns estudos sobre paternidade foram realizados em espécies da Ordem Decapoda. Toonen (2004) encontrou múltipla paternidade em 92,5% das fêmeas do caranguejo porcelânico *Petrolisthes cinctipes* na Baía de Bodega – Califórnia. *Uca paradumieri* (veja Murai *et al.*, 2002), *Chionoecetes opilio* (veja Sainte-Marie *et al.*, 2008), *Halicarcinus cookii* (veja van der Brink & McLay, 2009) também demonstram ser poliândricas, enquanto *Uca vocans hesperiae* (veja Dyson, 2008) e *Cancer pagurus* (veja Mckeown & Shaw, 2008) demonstram ser monogâmicas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar quantos machos contribuem para a prole produzida por uma fêmea de caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*, através de marcadores moleculares microssatélites.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar as fêmeas e suas respectivas larvas através de marcadores moleculares microssatélites;
- Comparar os alelos encontrados nas fêmeas com os alelos encontrados na sua prole, identificando os alelos provenientes do progenitor macho.
- Encontrar justificativas que expliquem o padrão encontrado para *U. cordatus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Dez fêmeas de caranguejo-uçá *Ucides cordatus*, utilizadas em um projeto de repovoamento dos manguezais paranaenses, foram coletadas com suas respectivas larvas ainda em seu abdome. As fêmeas foram mantidas em aquários isolados até a eclosão de suas larvas. Amostras de tecido muscular da fêmea e suas larvas foram preservados em solução salina de DMSO (Seutin *et al.*, 1991) em freezer a -20°C .

O DNA total das fêmeas foi extraído do tecido muscular de um de seus pereiópodos utilizando-se, para isso, do kit ChargeSwitch (Invitrogen[®]). Entre 22 e 32 de suas respectivas larvas em estágio de zoéa tiveram o DNA extraído pelo método DNeasy (Qiagen[®]).

A concentração e a pureza dos extratos foram medidos através do espectrofotômetro GeneQuant Pro (Amersham Bioscience[®]).

Os extratos de todas as fêmeas e de suas respectivas larvas tiveram seus fragmentos de interesse amplificados pelo método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase do DNA) com os conjuntos de iniciadores marcados A5, A11, A120, B3, B124 e C109 (Tabela 1), cada qual flanqueando uma região de microssatélite. Todas as reações de PCR foram realizadas em 10 μl com concentração final de: 0,6 μM de iniciador senso fluorescente, 0,6 μM de iniciador anti-senso, 0,25mM de dNTP, 0,025U Taq Platinum, 1x Buffer, 1,5mM MgCl and aproximadamente 0,5ng/ μL de extrato. O programa de PCR para os iniciadores A5, A11 e C109 contém 3 minutos de denaturação inicial (94°C), seguido por 35 ciclos de 30 segundos de denaturação a 95°C , 60 segundos à temperatura de anelamento (Tabela 1) e extensão de 60 segundos a 70°C ; e 1 hora de extensão final a 72°C . Para os iniciadores A120, B3 e B124, o PCR foi realizado com 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e 72°C por 40 minutos para extensão final. 2,5 μl do produto de PCR foram misturados a 0,3 μl de GeneScan[™] 500 – Rox[™] Size Standart (Applied Biosystems) e a 9,7 μl de formamida, para genotipagem em sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

As análises foram realizadas no programa GenMapper 3.7v (Applied Biosystems) e as análises de paternidade foram realizadas segundo o critério da exclusão (Jones & Ardrens, 2003). O critério da exclusão se baseia nas leis de herança Mendeliana, sendo contado o número de alelos de uma determinada prole, subtraindo os alelos das fêmeas. Dessa forma, obtemos a quantidade de alelos paternos que nos demonstram o número mínimo de pais que a prole pode possuir.

Esse critério é eficiente quando a prole possui baixa quantidade de pais e quando os marcadores são altamente polimórficos (Jones & Ardrens, 2003), como o caso dos microssatélites.

Tabela 1: Iniciadores de microssatélites desenvolvidos para *Ucides cordatus*, com suas respectivas sequências (5' – 3'), composição e quantidade de repetições do sitio, tamanho do fragmento amplificado, temperatura de anelamento, número de alelos encontrados e heterozigidades observada e esperada em estudo de Oliveira-Neto (2009) e Baggio *et al.* (dados não publicados).

Locus	Sequence	Repeat	Size (bp)	T (°C)	Number of Alleles	H _o	H _E
A5	F: TTG-CTC-GTT-CGT-ATC-CAG-TAG R: ACG-CCT-TAG-AAA-AGA-AGA-AAC-C	(CGAG) ₅ (CA) ₁₄	270	58	14	0.8684	0.8862
A11	F: TGG-TGA-ATG-AGT-CAA-ACT-GAG R: TGC-TTC-CTT-GCA-TAC-ATA-CTG	(CA) ₁₄	182	52	14	0.5781	0.6529
A120	F: AAC-TCC-CGC-TAC-CTC-TCA-CTC R: TGG-TCT-TTG-CAC-ACA-TGA-TTC	(CA) ₁₆	181	55	17	0.5516	0.5577
B3	F: CGA-GGC-ATC-GTC-TTT-AGA-G R: CAA-TCC-GCT-TCC-TAT-TCA-C	(GT) ₁₇ (GA) ₁₉	175	55	61	0.9167	0.9722
B124	F: TTT-CCT-CGA-ATG-TAT-AAA-CAG-G R: TCC-ACA-AAG-CGA-CTC-TCT-AG	(GT) ₁₁	122	55	28	0.8051	0.8360
C109	F: GCC-ATC-ATC-ACC-ATC-ACC R: TCC-CCT-TCT-TCC-TAT-TGT-CC	(CAT) ₆	285	62	10	0.4583	0.5113

5. RESULTADOS

As dez fêmeas e 8 a 16 de suas respectivas larvas foram genotipadas para cada fragmento microsatélite (Tabela 2).

Foram encontrados mais do que 2 alelos paternos para pelo menos um *loci* em 4 das 10 fêmeas (40%) (Tabela 3). Dessa forma, em 60% das fêmeas não foi detectado mais do que 1 progenitor masculino fecundando a sua prole, enquanto nas demais foram encontrados pelo menos 2 progenitores masculinos.

Tabela 2: Quantidade de larvas extraídas e genotipadas para cada fêmea de *Ucides cordatus*, para cada *locus*.

Fêmeas	Larvas Extraídas	Larvas Genotipadas					
		A5	A11	A120	B3	B124	C109
Fêmea 1	32	9	15	10	10	12	13
Fêmea 2	32	8	10	11	10	10	10
Fêmea 3	29	10	13	11	15	11	10
Fêmea 4	29	11	12	14	16	12	12
Fêmea 5	29	14	13	10	14	12	11
Fêmea 6	24	11	13	11	12	12	10
Fêmea 7	31	10	12	12	10	8	11
Fêmea 8	38	11	10	11	11	10	10
Fêmea 9	28	11	12	11	11	15	10
Fêmea 10	22	10	13	12	10	10	10

Tabela 3: Número de alelos provenientes de progenitores masculinos encontrados na prole de 10 fêmeas de *Ucides cordatus*. Em negrito fêmeas cujos óvulos foram fecundados por mais de um macho, detectadas pela presença de mais de 2 alelos paternos na prole para algum *locus*.

Fêmea	B3	A120	C109	A11	B124	A5
Fêmea 1	2	2	2	2	2	2
Fêmea 2	1	2	2	2	2	2
Fêmea 3	2	2	2	2	2	3
Fêmea 4	4	2	2	2	3	3
Fêmea 5	2	2	2	1	2	1
Fêmea 6	2	1	2	2	2	2
Fêmea 7	2	2	2	2	2	2
Fêmea 8	2	3	2	2	3	2
Fêmea 9	2	2	2	2	2	2
Fêmea 10	3	1	2	2	2	2

6. DISCUSSÃO

Foi detectada poliandria em 40% das fêmeas de *Ucides cordatus*. Entretanto, é provável que haja maior quantidade de progenitores masculinos, assim como de fêmeas poliândricas, uma vez que o método resulta no número mínimo de pais que fecundaram uma determinada fêmea, a partir de sua prole. Dessa forma, não é possível detectar múltipla paternidade se os machos tiverem o mesmo genótipo ou forem homocigotos para os *loci* genotipados, ou ainda se os filhos de apenas um determinado macho forem amostrados (Neff *et al.*, 2002). Tais fatores explicam o motivo de ser detectada a poliandria em uma fêmea em alguns *loci*, enquanto em outros *loci* houve apenas 2 alelos paternos.

A presença de poliandria de *Ucides cordatus* é algo que pode ser explicado pelos aspectos comportamentais da espécie. Os padrões de andada descritos por Góes *et al.* (2000), com comportamento de grande movimentação e batalhas inter-sexual e intra-sexual (atingindo cerca de 0,4 lutas/m² conforme Sant'Anna, 2006), indicam não haver forte escolha pré-copulatória para a espécie. Segundo Hartnoll (1969), espécies de Grapsidae e Ocypodidae caracterizam-se por cortes curtas, com o simples objetivo de um macho sexualmente maduro encontrar uma fêmea receptiva, utilizando, para isso, estímulos principalmente visuais e auditivos.

Costa (1979) presenciou lutas entre fêmeas e machos com a utilização dos quelípodes. Góes *et al.* (2000) encontrou fêmeas agarradas em galhos e rizóforos acima do nível da maré, fugindo de machos. Ao final do período de andada, tal autor presenciou fêmeas jovens tentando copular com machos pouco maiores, mas esses as expulsavam com golpes de seus quelípodes de suas tocas.

Tais padrões de batalhas indicam que a ocorrência de cópulas forçadas é um dos fatores que explicam a múltipla paternidade em *U. cordatus*. Em caranguejos, o tamanho do macho é o principal fator de sucesso reprodutivo, pois traz vantagens para segurar as fêmeas na cópula ou para a luta com outros machos (Brockhoff & McLay, 2005). Em contrapartida, fêmeas de maior porte possuem taxa de eclosão menor em relação às de menor porte (Hattori e Pinheiro, 2003), possivelmente explicado pela insuficiência de espermatozoides na espermateca em fêmeas maiores. Os machos encontrariam, nesse caso, dificuldades em manipular e copular com fêmeas com tamanho similar ao seu. Dessa forma, fêmeas pouco menores teriam maior possibilidade de desenvolver poliandria do que fêmeas maiores, exceto jovens.

Apesar de ambos os sexos possuírem mesmo tamanho de carapaça quando atingem a idade reprodutiva (Dalabona, 2001), os machos crescem em uma taxa maior, atingindo maiores tamanho de carapaça do que fêmeas (Branco, 1993), o que é vantajoso em tal cenário.

A ausência de proteção das fêmeas pelo macho após a cópula é outro fator que justifica a poliandria para *U. cordatus*. Quando os machos protegem as fêmeas após a cópula, a ocorrência de cópulas extras diminui. O padrão de proteção ocorre em espécies nas quais a fêmea realiza muda após a cópula. Esse evento, entretanto, não ocorre para o caranguejo-uçá.

Por outro lado, a poliandria detectada pode ser produto de cópulas em períodos reprodutivos anteriores. Castilho (2006) encontrou espermatozoides viáveis em espermatecas durante todos os meses do ano, corroborando com tal fato. Dessa forma, alguns indivíduos seriam filhos de machos que copularam no período reprodutivo presente, enquanto outros seriam provenientes de cópulas no ano anterior.

A poliandria pode também trazer benefícios genéticos em *U. cordatus*, o que poderia explicar a origem e a manutenção da poliandria na espécie.

A maior taxa de eclosão encontrada por Hattori e Pinheiro (2003) nas fêmeas de menor porte também pode ser consequência da poliandria, uma vez que diminui a frequência de incompatibilidades genéticas e aumenta a probabilidade de sobrevivência dos zigotos por “*bet-hedging*”. A escolha pós-copulatória, por sua vez, diminui a ocorrência de incompatibilidades genéticas na prole (Zeh & Zeh, 1997; Jennions & Petrie, 2000), fator vantajoso para as fêmeas poliandricas, uma vez que fêmeas monogâmicas não possuem possibilidade de realizar tais escolhas.

O aumento da diversidade da prole, produto de múltiplas cópulas, é outro fator vantajoso para as espécies que realizam poliandria. A maior diversidade genética entre os espermatozoides provenientes de vários machos gera aumento da diversidade da prole e heterozigosidade da população (Zane *et al.*, 1999). Dessa forma, sua prole teria maior capacidade de colonização, possibilitando, por exportação larval, a colonização de manguezais ao longo da costa americana. Além disso, a poliandria possibilita à fêmea a ter pelo menos alguns indivíduos da prole com “bons” genes, gerando, da mesma forma, uma grande capacidade de colonização e sobrevivência de pelo menos uma parte de sua prole em uma ampla distribuição de latitudes. Tais fatores justificariam, então, a ausência de estruturação genética para *U. cordatus*, encontrada em trabalhos de Oliveira-Neto *et al.* (2007a; 2007b), produto do intenso fluxo gênico entre as populações.

Dessa forma, cópulas forçadas, ausência de proteção pelos machos e os benefícios genéticos da poliandria, como evitar incompatibilidades, aumentar a diversidade genética da prole e ganhar “bons genes”, explicam a presença da poliandria no caranguejo-uçá *U. cordatus*. Esses fatores devem ser considerados para a produção de larvas em cativeiro para utilização em repovoamento.

A inexistência de espermátóforos inclusos em pacotes espermáticos para a espécie (Sant’Anna, 2006) impede a estratificação do esperma de diferentes macho, fator que privilegiaria o último macho a copular (van der Brink & McLay, 2008), devido à presença de conexão ventral da espermateca com o oviduto e a vagina em *U. cordatus* (Fransozo *et al.*, 2006). Entretanto, devido ao tamanho diminuto das larvas e à possível presença de inibidores, como a rodopsina presente em seu olho, houve certa dificuldade na amplificação dos fragmentos de interesse, impossibilitando a genotipagem de todos os *loci* para todas as larvas. Assim, não foi possível fazer a reconstituição do genótipo dos progenitores masculinos e, por conseguinte, observar a contribuição de cada pai para a prole.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, M. I. (1975) Sobre a reprodução do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus), em mangues do Estado do Ceará (Brasil). *Arquivos de Ciências do Mar* **15**(2), 85-91.
- Amaral, A. C. Z.; & Jablonski, S. (2005) Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. *Megadiversidade* **1**, 43–51.
- Arnqvist, G. & Andrés, J. A. (2008) The effects of experimentally induced polyandry on female reproduction in a monandrous mating system. *Ethology* **112**, 748-756.
- Baggio, R. A.; Pil, M. W. B O.; Pie, M. R., Boeger, W. A.; Patella, L. A. & Ostrensky, A. Genetic evidence of multiple paternity in the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). Dados não publicados.
- Beninger, P. G.; Elnor, R. W.; Foyle, T. P. & Odense, P. H. (1988) Functional Anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *Journal of Crustacean Biology* **8**(3), 322-332.
- Birkhead, T. R. & Moller, A. P. (1998) *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press, New York.
- Blankensteyn, A.; Cunha Filho, D. & Freire, A. S. (1997) Distribuição, estoques pesqueiros e conteúdo protéico do caranguejo do mangue *Ucides cordatus* (L. 1763) (Brachyura: Ocypodidae) nos manguezais da Baía das Laranjeiras e adjacências, Paraná, Brasil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* **40**(2), 331-349.
- Boeger, W. A.; Pie, M. R.; Ostrensky, A. & Patella, L. (2005) Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **100**(2), 161-167.
- Branco, J. O. (1993) Aspectos bioecológicos do caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda) do manguezal do Itacorubi, Santa Catarina, Brasil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* **36**(1), 133-148.
- Brockhoff, A. M. & McLay, C. L. (2005) Mating behaviour, female receptivity and male–male competition in the intertidal crab *Hemigrapsus sexdentatus* (Brachyura: Grapsidae). *Marine Ecology Progress Series* **290**, 179-191.
- Cardoso, M. O. (2004) Métodos para quantificação da biomassa microbiana do solo. *Agropecuária Técnica* **25**(1).
- Castilho, G. G. (2006) Aspectos reprodutivos do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), na Baía de Antonina, Paraná, Brasil. Dissertação - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 119p.
- Castilho-Westphal, G. G.; Ostrensky, A.; Pie, M. R. & Boeger, W. A. (2008) Estado da arte das pesquisas com o caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*. *Archives of Veterinary Science* **13**(2), p.151-166.

- Costa, R. S. (1979) Bioecologia do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) – Crustáceo, Decápode – no nordeste brasileiro. *Boletim Cearense de Agronomia* **(20)**, 1-74.
- Dalabona, G. (2001) Reprodução e análise biométrica do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* nas Ilhas do Pavoçá e das Peças, Paraná, Brasil. Dissertação - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 36p.
- Dalabona, G. & Silva, J. L. (2005) Período reprodutivo de *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Brachyura, Ocypodidae) na Baía das Iaranjeiras, sul do Brasil. *Acta Biologica Paraense*, **34**(1,2,3,4),115-126.
- Diele, K. (2000) Life history and population structure of the exploited mangrove crab *U. cordatus* (L.) (Decapoda: Brachyura) in the Caeté estuary, North Brazil. Tese - Universität Bremen. Bremen, 103p.
- Diele, K. & Simith, D. J. B. (2006) Salinity tolerance of northern Brazilian mangrove crab larvae, *Ucides cordatus* (Ocypodidae): Necessity for larval export? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **68**, 600-608.
- Diele, K. & Simith, D. J. B. (2007) Effects of substrata and conspecific odour on the metamorphosis of mangrove crab megalopae, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **348**, 174-182.
- Diesel, R. (1988) Discrete storage of multiple-mating sperm in the spider crab *Inachus phalangium*. *Naturwissenschaften*, **75**,148-149.
- Diesel, R. (1989) Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage and spawning. *Journal of Crustacean Biology* **9**(2), 266-277.
- Drnevich, J. M.; Papke, R. S.; Rauser, C. L. & Rutowski, R. L. (2001) Material benefits from multiple mating in female mealworm beetles (*Tenebrio molitor* L.). *Journal of Insect Behavior* **14**, 215–230.
- Dyson, M. L. (2008) Factors Affecting Mating Tactics in the Fiddler Crab, *Uca vocans hesperiae*. *Ethology* **114**, 75-84.
- Eberhard, W. G. (1996) *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Femal Choice*. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press.
- Evans, J. P. & Magurran, A. E. (1999) Male mating behaviour and sperm production characteristics under varying sperm competition risk in guppies. *Animal Behaviour* **58**, 1001–1006.
- Fiscarelli, A. G. & Pinheiro, M. A. A. (2002) Perfil sócio-econômico e conhecimento etnobiológico dos catadores de Iguape (SP), sobre o caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763). *Actualidades Biológicas*, **24**(77), 129-142.
- Fox, C. W. & Rauter, C. M. (2003) Bet-hedging and the evolution of multiple mating. *Evolutionary Ecology Research* **5**, 273-286.

Fransozo, V.; López-Greco, L. S. & Santos, D. C. (2006) Macroscopia e histologia da espermateca de *Ucides cordatus* L. (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). Livro de Resumos do IV Congresso Brasileiro sobre Crustáceos. Guarapari – SP: Sociedade Brasileira de Carcinologia.

Frankham, R.; Ballou, J. D. & Briscoe, D. A. (2004) A Primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press. 220 p.

Freire, A. S. (1998) Dispersão larval do Caranguejo do mangue *Ucides cordatus* (L.1763) em manguezais da Baía de Paranaguá, Paraná. Tese - Universidade de São Paulo. São Paulo, 71p.

Gabor, C.R. & Halliday, T. R. (1997) Sequential mate choice by multiply mating smooth newts: females become more choosy. *Behavioral Ecology* **8**, 162-166.

Glaser, M. (2003) Interrelations between mangrove ecosystem, local economy and social sustainability in Caeté Estuary, North Brazil. *Wetlands Ecology and Management* **11**, 265–272.

Glaser, M. & Diele, K. (2004) Asymmetric outcomes: assessing central aspects of the biological, economic and social sustainability of a mangrove crab fishery, *Ucides cordatus* (Ocypodidae), in North Brazil. *Ecological Economics* **49**, 361-373.

Grafen, A. (1990) Biological signals as handicaps. *Journal of Theoretical Biology* **144**, 517-546.

Góes, P.; Sampaio, F. D. F.; Carmo, T. M. S.; Toso, G. C. & Leal, M. S. (2000) Comportamento e período reprodutivo do caranguejo do mangue *Ucides cordatus*. *Anais do V Simpósio de Ecossistemas Brasileiros: Conservação*, Universidade Federal do Espírito Santo **2**, p. 335-345.

González, A.; Rossini, C.; Eisner, M. & Eisner, T. (1999) Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **96**, 5570-5574.

Hartnoll, R.G. (1969) Mating in the Brachyura. *Crustaceana* **16**,161-181.

Hattori, G. Y. & Pinheiro, M. (2003) Fertilidade do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), em Iguape (São Paulo, Brasil). *Revista Brasileira de Zoologia* **20**(2), 309-313.

Hines, A. H.; Jivoff, P. R.; Bushmann, J. P.; van Montfrans, J.; Reed, S. A.; Wolcott, D. L. & Wolcott, T. G. (2003) Evidence for sperm limitation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bulletin of Marine Science* **72**, 287-310.

Jayasankar, V. & Subramonian, T. (1999) Antibacterial activity of seminal plasma of the mud *Scylla serrata* (Forsk.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **236**(2),253-259.

Jivoff, P. (1997) The relative roles of predation and sperm competition on the duration of the post-copulatory association between the sexes in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **40**(3),175-185.

Jennions, M. D. & Petrie, M. (2000) Why do females mate multiply? A review of genetic benefits. *Biological Reviews* **75**, 21-64.

Jensen, M. P.; Abreu-Grobois, F. A.; Frydenberg, J. & Loeschcke, V. (2006) Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non arribada olive ridley sea turtle rookeries. *Molecular Ecology* **15**, 2567-2575.

Johnson, P.T. (1980) Histology of the blue crab *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda. Praeger, New York. 440p.

Jones, A. G. & Ardren, W. R. (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* **12**, 2511-2523.

Kjerfve, B. & Lacerda, L. D. (1990) Mangroves of Brazil. *Marine Biology*, p. 245-272.

Koch, V. (1999) Epibenthic production and energy flow in the Caeté mangrove estuary, North Brazil. PhD thesis, University of Bremen (Saint-Paul). ZMT Contribution 6. 97 p.

Koga, T., Backwell, P. R. Y., Jennions, M.D. & Christy, J. H. (1998) The effect of predation risk on mating behavior in the fiddler crab *Uca beebei*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **265**, 1385-1390.

López-Greco, L. S.; López, G. C. e Rodríguez, E. M. (1999) Morphology of spermathecae in the estuarine crab *Chasmagnatus granulata* Dana 1851 (Grapsidae, Sesarinae). *Journal of Zoology* **249**, 490-493.

Luikart, G. & England, P. R. (1999) Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 253–256.

McKeown, N. J. & Shaw, P. W. (2008) Single paternity within broods of the brown crab *Cancer pagurus*: a highly fecund species with long-term sperm storage. *Marine Ecology* **368**, 209-215.

Ministério do Meio Ambiente (2004) Lista Nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração. *Instrução Normativa Nº 5 de 21 de Maio de 2004*.

Moller, A. P. (1997) Immune defense, extra-pair paternity, and sexual selection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **264**, 561-566.

Moller, A. P. & Thornhill, R. (1998) Male parental care, differential investment by females and sexual selection. *Animal Behaviour* **55**, 1507-1515.

Moore, M. K. & Ball Jr., R. M. (2002) Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **11**, 281–288.

Morgan, S.G. (1996) Influence of tidal variation on reproductive timing. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* **206**, 237-251.

Morgan, S. G. & Christy, J. H. (1996) Adaptive significance of the timing of larval release by crabs. *American Naturalist* **145**, 457-479.

- Murai, M.; Koga, T. & Yong, H. (2002) The assessment of female reproductive state during courtship and scramble competition in the fiddler crab, *Uca paradussumieri*. *Behavior Ecology Sociobiology* **52**, 137-142.
- Nakamura, M. (1998) Multiple mating and cooperative breeding in polygynandrous alpine accentors. II. Male mating tactics. *Animal Behaviour* **55**, 277-289.
- Nascimento, S.A. (1993) Biologia do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*). Administração Estadual do Meio Ambiente (ADEMA), Sergipe, 45p.
- Neff, B. D; Pitcher, T. E. & Repka, J. (2002) A Bayesian Model for Assessing the Frequency of Multiple Mating in Nature. *The American Genetic Association* **93**, 406–414.
- Nordhaus, I. (2003) Feeding ecology of the semi-terrestrial crab *U. cordatus* Decapoda: Brachyura) in a mangrove forest in northern Brazil. Tese - Universität Bremen. Bremen, 217p.
- Nordhaus, I.; Wolff, M. & Diele, K. (2006) Litter processing and population food intake of the mangrove crab *Ucides cordatus* in a high intertidal forest in northern Brazil. *Estuarine Coastal Shelf Science* **67**, 239–250.
- Oliveira-Neto, J. F. (2009). Filogeografia e demografia evolutiva de *Ucides cordatus* (Linnaeus 1763) (Decapoda, Brachyura) e *Cardisoma guanhumi* Latrille, 1825 (Decapoda, Brachyura) na costa do Brasil. Tese – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 101p.
- Oliveira-Neto, J. F.; Boeger, W. A.; Pie, M. R.; Ostrensky, A. & Hungria, D. B. (2007a) Genetic structure of populations of the mangrove crab *Ucides cordatus* Decapoda: Ocypodidae) at local and regional scales. *Hydrobiology* **583**, 69– 76.
- Oliveira-Neto, J. F.; Pie, M. R. ; Boeger, W. A.; Ostrensky, A. & Baggio, R. A. (2007b) Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). *Marine Ecology* **28**(4), 460-469.
- Olmos, F. & Silva, R. S. (2001) Guar Vermelho: Ambiente, Flora e Fauna dos Manguezais de Santos-Cubatão. Editora Empresa das Artes, São Paulo, 216p.
- Pinheiro, M. A. A. (2001) Biologia do Caranguejo Uç, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Brachyura), no Litoral Sul do Estado de São Paulo. In: Pinheiro, M. A. A. & Fiscarelli, A. G. (2001) Manual de apoio  fiscalização do caranguejo-uç (*Ucides cordatus*). Santa Catarina: CEPSUL.
- Pinheiro, M. A. A.; Veloni, M. A. & Terceiro, O. S. L. (2003) Fecundity of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae). *Invertebrate Reproduction and Development*, **43**(1), 19-26.
- Pomiankowski, A. & Moller, A. P. (1995) A resolution of the lek paradox. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **260**, 21-29.
- Radwan, J. (1998) Heritability of sperm competition success in the bulb mite, *Rhizoglyphus robini*. *Journal of Evolutionary Biology* **11**, 321-327.

Sainte-Marie, G. & Sainte-Marie, B. (1999) Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). II. Multiple types of sperm cells and of spermatophores in the Spermathecae of mated females. *Canadian Journal of Zoology* **77**, 451-462.

Sainte-Marie, B.; Gosselin, T.; Sevigne, J. & Urbani, N. (2008) The snow crab mating system: Opportunity for natural and unnatural selection in a changing environment. *Bulletin of Marine Science* **83**(1), 131-161.

Sant'Anna, B. S. (2006) Biologia reprodutiva do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) em Iguape, SP, Brasil. Dissertação – Instituto da Pesca, São Paulo, 64p.

Schories, D.; Barletta-Bergan, A.; Barletta, M.; Krumme, U.; Mehlig, U. & Rademaker, V. (2003) The keystone role of leaf-removing crabs in mangrove forests of North Brazil. *Wetlands Ecology and Management* **11**, 243–255.

Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**, 615-629.

Seutin, G.; White, B. N. & BOAG, P. T. (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* **69**, 82-90.

Silva, U. A. S. (2002) Cultivos experimentais do Caranguejo Uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) Dissertação - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 89p.

Simith, D. J. B. & Diele, K. (2008) O efeito da salinidade no desenvolvimento larval do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Ocypodidae) no Norte do Brasil. *Acta Amazônica* **38**(2), 345-350.

Souto, F. J. B. (2007) Uma abordagem etnoecológica da pesca do caranguejo, *Ucides cordatus*, Linnaeus, 1763 (Decapoda: Brachyura), no manguezal do Distrito de Acupe (Santo Amaro-BA). *Biotemas* **20**(1), 69-80.

Sugg, D. W. & Chesser, R. K. (1994) Effective population sizes with multiple paternity. *Genetics* **137**, 1147–1155.

Toonen, R. J. (2004) Genetic evidence of multiple paternity of broods in the intertidal crab *Petrolisthes cinctipes*. *Marine Ecology* **270**, 259-263.

Urbani, N.; Sainte-Marie, B.; Sevigny, J. M. ; Zadworny, D. & Kuhnlein, U. (1998) Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura : Majidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**(5), 1104-1113.

Vacquier, V. D. (1998) Evolution of gamete recognition proteins. *Science* **281**, 1995-1998.

van der Brink, A. M. & McLay, C. L. (2009) Use of the sterile male technique to investigate sperm competition, storage, and use in a pill box crab, *Halicarcinus cookie* (Brachyura: Hymenosomatidae). *Journal of Crustacean Biology* **29**(1), 62-69.

Vieira, R. H. S. F.; Lima, E. A.; Sousa, D. B. R.; Reis, E. F.; Costa, R. G. & Rodrigues, D. P. (2004) *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crab

Ucides cordatus. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **46**(4), 179-182.

Yamaguchi, T. (1998) Longevity of sperm of the fiddler crab *Uca lactea* (De Haan, 1835) (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Crustaceana* **71**(6), 712-713.

Yan, G. & Stevens, L. (1995) Selection by parasites on components of fitness in *Tribolium* beetles : the effect of intraspecific competition. *American Naturalist* **146**, 795-813.

Wagner, W. E.; Kelley, R. J.; Tucker, K. R. & Harper, C. J. (2001) Females receive a life-span benefit from male ejaculates in a field cricket. *Evolution* **55**, 994-1001.

Wedell, N. & Tregenza, T. (1999) Successful fathers sire successful sons. *Evolution* **53**, 620-625.

Wunderlich, A. C.; Pinheiro, M. A. A. & Rodrigues, A. M. T. (2008) Biologia do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura), na Baía de Babilonga, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **25**(2), 188-198.

Zane, L.; Nelson, W. S.; Jones, A. G. & Avise, J. C. (1999) Microsatellite assessment of multiple paternity in natural populations of a live-bearing fish, *Gambusia holbrooki*. *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 61-69.

Zeh, J. A. & Zeh, D. W. (1996) The evolution of polyandry I: intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **263**, 1711-1717.

Zeh, J. A. & Zeh, D. W. (1997) The evolution of polyandry 2. Post-copulatory defences against genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **264**, 69-75.

Zeh, J. A. & Zeh, D. W. (2003) Towards a new sexual selection paradigm: polyandry, conflict and incompatibility. *Ethology* **109**, 929-950.