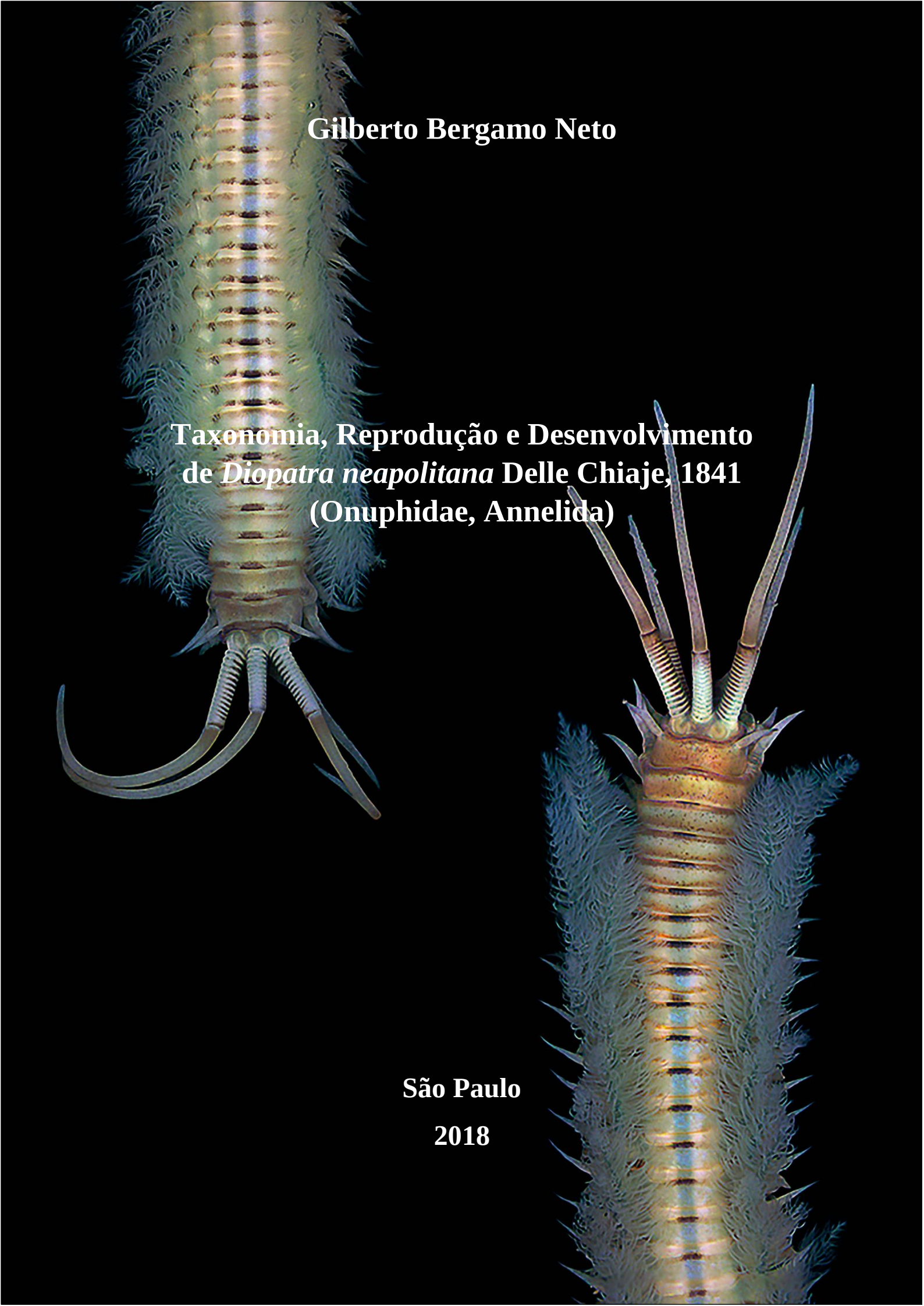

Gilberto Bergamo Neto

Taxonomia, Reprodução e Desenvolvimento de *Diopatra neapolitana* Delle Chiaje, 1841 (Onuphidae, Annelida)

São Paulo

2018

Gilberto Bergamo Neto

Taxonomia, Reprodução e Desenvolvimento de *Diopatra neapolitana* Delle Chiaje, 1841 (Onuphidae, Annelida)

Taxonomy, Reproduction and Development of *Diopatra neapolitana* Delle Chiaje, 1841 (Onuphidae, Annelida)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências, na Área de Zoologia

Orientador: Dr. João Miguel de Matos Nogueira

Coorientador: Dr. Orlemir Carrerette dos Santos

São Paulo

2018

Bergamo, Gilberto.

Taxonomia, reprodução e desenvolvimento de *Diopatra neapolitana* Delle Chiaje, 1841 (Onuphidae, Annelida).

135 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

1. Ciclo reprodutivo 2. Taxonomia 3. Desenvolvimento I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão julgadora:

_____

Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr(a).

_____

Prof. Dr. João Miguel de Matos Nogueira (orientador)

A todos os cientistas,

que as adversidades nunca superem nossa curiosidade.

“The world always seems brighter when you’ve just made something that wasn’t there before”.

Neil Gaiman

Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado, fundamental para a realização deste projeto.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização de recursos para material utilizado neste projeto, via Programa de Excelência Acadêmica (PROEX).

Agradeço ao Prof. Dr. João Miguel de Matos Nogueira, pela orientação, por todo o apoio, pelas oportunidades e ensinamentos que auxiliaram neste começo da minha jornada como cientista, além da amizade, das risadas e também pelos churrascos.

Agradeço ao Dr. Orlemir Carrerette dos Santos, pela coorientação, por acreditar em mim, mesmo quando eu mesmo duvidei, por me ensinar e me apoiar tanto e com muita boa vontade, demostrando sempre uma dedicação contagiante.

Agradeço a todos meus colegas de laboratório, Rafael Eiji, Marcelo Fukuda, Natalia Ranauro, Felipe de Chiara, Carlos Ananias, Plínio Van Deursen, William Matheus, Alan Henrique, Rafael Medeiros, pelo companheirismo, por todos os ensinamentos, pelas ajudas nos trabalhos e descontração quando preciso.

Agradeço a todos os professores do IB, em especial aos professores André Morandini, José Eduardo Marian, Eduardo Santos, Fernando Marques e Daniel Lahr, por todos conselhos e ensinamentos, pela disponibilidade e principalmente pela paciência.

Agradeço em especial ao professor Federico Brown, por toda a ajuda relacionada à biologia do desenvolvimento, pela atenção dispendida e por disponibilizar o laboratório para os testes iniciais de fertilizações *in vitro* e ao professor Alvaro Migotto, por

proporcionar todas as fotos e filmagens das fertilizações e pela disponibilidade e preocupação em ajudar.

Agradeço ao Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar), cujas instalações foram essenciais para parte dos experimentos presentes neste projeto.

Agradeço aos técnicos da histologia do Departamento de Zoologia, Ênio Matos e Phillip Lenktaitis, que auxiliaram na preparação e realização de muitos experimentos, além de operarem o microscópio eletrônico de varredura, essencial para boa parte das figuras do presente projeto; os dois são sempre muito prestativos e bem-humorados, tornando o trabalho muito melhor e mais fácil.

Agradeço ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB, que permitiu a utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Agradeço ao Vinicius Queiroz, por disponibilizar e auxiliar na utilização da citocentrífuga, muito importante para resultados obtidos neste projeto, bem como o Prof. Dr. Marcio Custódio, chefe do Laboratório de Biologia Celular de Invertebrados Marinhos, onde se encontra a citocentrífuga.

Agradeço ao time Ataliba's Handebol Mamute, pelo companheirismo e motivação que me acompanharam durante todo o mestrado, em especial um agradecimento ao capitão Gabriel Kayano, por todas as conversas e discussões sobre a pós graduação.

Agradeço a todos os meus amigos, do colégio, da faculdade e da vida, que seria impossível listar o nome de cada um, mas que proporcionaram, cada um de sua maneira, momentos muito especiais e importantes para mim.

Agradeço ao Victor Doering, que fez o mestrado ao mesmo tempo que eu e dividiu alegrias e frustrações comigo, sempre transformando o desespero em piada, tornando-o

muito mais sustentável. Espero ter ajudado no seu trabalho tanto quanto você ajudou neste.

Agradeço à Bianca Previatto dos Santos Ganso, que sempre esteve ao meu lado, me acompanhou nas coletas, tornando-as ainda mais divertidas, aguentou todo o estresse e sempre me incentivou, despertando sempre meu lado mais otimista.

Agradeço às minhas tias, Renata e Lilian e as minhas primas, Marina e Carolina, por todo o incentivo e momentos de alegria e descontração, e por emprestarem a casa da praia, que facilitou muito as coletas realizadas.

Agradeço à minha tia, Marina, pela companhia durante todos esses anos, pelas risadas e momentos felizes, agradeço também à Flavia, pela proximidade apesar da distância e pelas conversas sobre tubarões.

Agradeço ao meu irmão, Fernando, que sempre esteve ao meu lado e que, apesar de todas nossas diferenças, sempre soubemos nos entender e dividir nossas coisas, principalmente comida.

Agradeço muito aos meus pais, Ronaldo e Christina, que são o meu maior exemplo de dedicação, que apoiaram minhas escolhas, que conviveram e aguentaram meu lado mais crítico e estressado sobre o mundo e sempre estiveram dispostos a conhecer lugares e coisas novas, me levando nestas aventuras e despertando a curiosidade que sustenta meu lado cientista.

Resumo

Estudos taxonômicos foram conduzidos em onufídeos coletados na Baía do Araçá, em São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo, utilizando dados morfológicos e moleculares, e se confirmou que os espécimes coletados pertencem à espécie *Diopatra neapolitana*, originalmente descrita para o Golfo de Nápoles (Mar Mediterrâneo). Com a identidade específica dos animais confirmada, foi conduzido um estudo anual, com coletas mensais visando entender o ciclo reprodutivo a partir dos gametas femininos presentes no celoma, concluindo que, os indivíduos brasileiros possuem reprodução assíncrona, com o ciclo reprodutivo regido mais pelo tamanho de cada animal, do que pelos meses do ano.

O estudo anual focou também na espermatogênese destes animais, que é caracterizada pela presença do citóforo, comum a outras espécies de poliquetas. Observou-se, entretanto, que a espermiogênese possui dois caminhos possíveis: formação de mórulas espermáticas e maturação do espermatozoide na própria estrutura unida pelo citóforo. Foi estudado o hermafroditismo sequencial desta espécie, caracterizado pelas papilas espermoducais, que para os indivíduos da Baía do Araçá, apresentam diferentes estágios de maturação, podendo representar as passagens de um gênero sexual para outro.

Por fim foi estudado o desenvolvimento larval e dispersão de gametas, a partir de fertilizações *in vitro*, com registro de todos os estágios larvais para a espécie estudada, além da construção de protocolos importantes para a biologia do desenvolvimento.

Palavras chave: Poliquetas, ciclo de vida, gametas, fertilização, larvas.

Abstract

Taxonomic studies were conducted with onuphids collected at Araçá Bay, located in São Sebastião, in the northern coast of the state of São Paulo, using morphological and molecular data, and it is confirmed that these specimens belong to the species *Diopatra neapolitana*, which type locality is the Gulf of Napoli. After confirming the species identity, an annual study was conducted, with mensal collects of specimens, aiming to understand the reproductive cycle, based on feminine gametes present on each celom, and the conclusion is that for the Brazilian specimen, the reproduction is asynchronous, with the reproductive cycle guided rather by the size of each animal, than by the months.

The annual study also focused on the spermatogenesis, which is characterized by the presence of the cytophore, common on other polychaete species, however, the spermiogenesis can be accomplished by two paths: formation of spermatic morulae or maturation of spermatozoa linked in the cytophore structure. The sequential hermaphroditism, characterized by the presence of spermoducal papillae, was also studied, and, for the specimen of the Araçá Bay, there are different maturation stages for this feature, probably related to the transition from one gender to another.

Lastly, the larval development and gametes dispersion were studied, using *in vitro* fertilizations, registering all larval stages for the present species, as well as the origination of development biology protocols.

Keywords: Polychaetes, life cycle, gametes, fertilization, larvae.

Índice

Introdução Geral **14**

1. Introdução 14

2. Materiais e Métodos 18

2.1. Área de Estudo 18

2.2. Procedimentos de Campo 21

Capítulo 1 – Taxonomia **22**

1. Introdução 22

2. Materiais e Métodos 27

2.1. Preparações morfológicas 27

2.2. Análises Moleculares 27

3. Resultados 29

Material examinado 30

Descrição 30

Observações taxonômicas 41

Comparação dos dados moleculares 42

Capítulo 2 – Ciclo de vida **46**

1. Introdução 46

2. Materiais e Métodos 49

2.1. Morfometria 49

2.2. Gametas Femininos 50

2.3. Gametas Masculinos 52

2.4. Dimorfismo sexual 54

3. Resultados 56

3.1. Análise dos indivíduos incompletos 56

3.2. Ciclo reprodutivo anual 58

3.3. Espermatogênese 64

3.4. Dimorfismo sexual 70

4. Discussão e Conclusões 78

4.1. Fragmentação e regeneração 78

4.2. Análise do ciclo reprodutivo anual 80

4.3. Padrões da espermatogênese 83

4.4. Proporção macho : fêmea : hermafrodita 86

Capítulo 3 – Desenvolvimento 93

1. Introdução 93

2. Materiais e métodos 96

2.1. Cultivo dos adultos 96

2.2. Procedimentos da fertilização *in vitro* 97

2.3. Liberação de gametas 100

3. Resultados 101

3.1. Fertilização *in vitro* 101

3.2. Dados sobre a dispersão de gametas 108

4. Discussão e conclusões 108

4.1. Fertilização e desenvolvimento 108

4.2. Dispersão de gametas 111

5. Anexos 113

Conclusões gerais e perspectivas 118

Bibliografia 123

Introdução Geral

1. Introdução

Os anelídeos são vermes que possuem segmentação verdadeira e formam um grupo extremamente diverso, com aproximadamente 17.000 espécies descritas, distribuídas em mais de 80 famílias, ocupando o ambiente marinho em sua maioria, mas também os ambientes terrestre e dulcícola (Rouse e Pleijel, 2001; Weigert e Bleidorn, 2016). Exemplares deste grupo podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes marinhos, desde a zona entremarés até grandes profundidades. São animais principalmente bentônicos, compreendendo um dos grupos mais abundantes e frequentes no bentos marinho, apesar de também existirem espécies planctônicas. A variedade do grupo também é refletida nos hábitos alimentares, com indivíduos carnívoros, herbívoros, onívoros e comedores de deposito, seletivos ou não (Fauchald e Jumars, 1979).

Por muito tempo o filo Annelida foi dividido em duas Classes, Polychaeta, representado por anelídeos marinhos com parapódios e cerdas, e Clitellata, incluindo os Oligochaeta e Hirudinea, caracterizados pela presença do clitelo. O termo Clitellata foi cunhado por Michaelsen (1928-1932), mas a divisão dos anelídeos foi estabelecida anteriormente por Grube (1850), junto com a criação dos nomes Polychaeta e Oligochaeta. Durante quase todo o século 20 esta separação foi mantida, considerando principalmente a filosofia Lineana de hierarquia e classificações, mas nenhum estudo sistemático, relacionando uma filogenia do grupo, foi feito nessa época (Struck, 2012). Rouse e Fauchald (1997) verificaram a monofilia de Polychaeta e, portanto, grupo irmão

de Clitellata, baseado em caracteres morfológicos. Porém estudos moleculares baseados no genoma mitocondrial e análises de gene multivariadas apontaram para incongruências no parentesco conhecido de Polychaeta e Clitellata, sugerindo que clitelados são na verdade poliquetas altamente derivados (Struck, 2012). Portanto o grupo "Polychaeta" é, atualmente, considerado parafilético.

Quanto ao que era estabelecido como Polychaeta, de Quatrefages (1866) dividiu o grupo no que viria a ser chamado de Errantia e Sedentaria. Os nomes foram dados relacionando o modo de vida mais comum dos animais de cada grupo, sendo os errantes aqueles com movimentação mais ativa e os sedentários, os de vida mais séssil, embora tal divisão tenha sido baseada na morfologia de algumas partes do corpo. Esta classificação se manteve por muito tempo, com poucas alterações. Porém Rouse e Fauchald (1997) propuseram uma filogenia baseada em caracteres morfológicos, dividindo os poliquetas em Scolecida e Palpata, sendo este último por sua vez dividido em Canalipalpata, grupo que se assemelha muito ao antigo grupo Sedentaria, e Aciculata, que se manteve quase igual ao grupo dos Errantia. A filogenia mais recente, proposta por Weigert e Bleidorn (2016), baseada em caracteres morfológicos e moleculares, volta a utilizar os nomes Errantia e Sedentaria, pulverizando os antigos membros de Scolecida entre esses grupos.

A ordem Eunicida é uma das mais diversificadas dentro dos poliquetas errantes, cujos animais são caracterizados principalmente pela presença de um complexo aparelho bucal endurecido por mineralização ou esclerotização, formado por mandíbulas ventrais e maxilas dorsais (Paxton, 2006) É uma das ordens com registro fóssil mais extenso e melhor estudado, principalmente devido à possibilidade de fossilização do aparelho bucal endurecido dos indivíduos, formando microfósseis chamados de escolecodontes (Olive et al., 2005). Onuphidae é uma das principais famílias dessa ordem, compreendendo

anelídeos majoritariamente bentônicos, com maior representatividade nas zonas entremarés, que produzem o tubo onde habitam (Paxton, 1986). São animais com tamanho de corpo muito variado, desde poucos centímetros a mais de 3 metros de comprimento (Rouse e Pleijel, 2001). Apresentam uma grande diversidade de modos de vida, possivelmente relacionados à especialização da sua região anterior e variações nos formatos e composições dos tubos (Budaeva et al., 2016). A família Onuphidae é dividida nas subfamílias Hyalinoeciinae Paxton, 1986 e Onuphinae Kinberg, 1865, com monofilia sustentada por caracteres morfológicos (Paxton, 1986) e moleculares (Budaeva et al., 2016). Dentro da subfamília Onuphinae, o gênero *Diopatra* Audoin e Milne-Edwards, 1833 é um dos mais antigos e mais bem definidos, com indivíduos caracterizados pela presença de cirros peristomiais e brânquias com filamentos organizados em espiral (Day, 1960; Paxton e Arias, 2017).

Porém a delimitação de espécies no gênero *Diopatra* não é muito clara, principalmente pela similaridade morfológica entre estas espécies e a dificuldade histórica de estabelecer caracteres diagnósticos (Hartman, 1944; Day, 1960; Paxton, 1986). Os problemas relacionados à definição de características para diagnosticar as espécies de *Diopatra* refletem principalmente o diferente foco que diversos pesquisadores atribuíram a algumas estruturas morfológicas, ao longo do tempo. Esta abordagem histórica é tratada com detalhes no Capítulo 1 desta Dissertação. Diferente das características morfológicas, um aspecto que difere muito entre as espécies deste gênero são as estratégias reprodutivas (Cunha et al., 2005), como acontece em muitos grupos de anelídeos, possivelmente relacionado à simplicidade do sistema reprodutivo e à grande plasticidade e adaptabilidade a novos habitats por parte desses animais (Wilson, 1991). Estas variadas estratégias podem ser observadas em diferentes aspectos da biologia reprodutiva desses animais. Um exemplo é a estrutura dos ovócitos maduros, que variam

muito em tamanho, de 150 µm, em membros de *D. hanleyi* Paxton, 1993, a 1400 µm, em *D. gigova* Paxton, 1993, e também em quantidade, de 5 a milhares de gametas no celoma de cada indivíduo (Pires et al., 2012c). Os espermatozoides também variam muito em relação à estrutura morfológica e função, dependendo da espécie de *Diopatra* (Jamieson e Rouse, 1989). As características e funções dos gametas estão relacionadas, apesar de não dependentes, e também se refletem no tipo de larva presente em cada espécie, que podem ser lecitotróficas, planctônicas, com cuidado parental ou vivíparas (Paxton, 1986). Estes aspectos são discutidos nos Capítulos 2 e 3 deste trabalho, com foco em *D. neapolitana* Delle Chiaje, 1841.

Indivíduos de *D. neapolitana* apresentam distribuição cosmopolita, porém este padrão foi questionado por muitos autores, apontando para a possibilidade de identificação equivocada dos espécimes. Day (1967) sugeriu que a distribuição de *D. neapolitana* estaria restrita ao Mar Mediterrâneo e duvidou das identificações de membros desta espécie em outras localidades. Choe (1960) descreveu o desenvolvimento de *D. neapolitana* em indivíduos do Japão, mas Paxton (1993) sugeriu que aqueles indivíduos pertencessem, na verdade, a *D. sugokai* Izuka, 1907. Outro problema taxonômico apontado por Paxton (1993) envolvendo esta espécie é a similaridade morfológica com membros de *D. aciculata* Knox e Cameron, 1971, descrita para a Austrália; o Capítulo 1 desta Dissertação também aborda esta problemática.

Paxton (1993) apontou para a possibilidade de acrescentar os padrões reprodutivos às características morfológicas, para solucionar os problemas taxonômicos de *Diopatra*. Outra abordagem importante na resolução destes problemas taxonômicos é a utilização de dados moleculares, principalmente porque espécies com ampla distribuição e problemas na delimitação morfológica podem, na verdade, ser complexos de espécies crípticas (Nygren, 2014), se revelando como mais de uma espécie com grande

similaridade morfológica entre elas, e estes complexos estão sendo desvendados mais frequentemente com o auxílio dos dados moleculares (Bickford et al., 2007). Portanto, é necessária a elaboração de trabalhos completos, incluindo o maior número de dados possível, como estudos morfológicos, moleculares e de biologia reprodutiva das espécies de *Diopatra*, caracterizando a chamada Taxonomia Integrativa (Dayrat, 2005), para entender melhor as delimitações específicas, bem como a real distribuição dos indivíduos dessas espécies.

2. Materiais e Métodos

2.1. Área de Estudo

O presente estudo foi desenvolvido com indivíduos de *Diopatra neapolitana* de uma população da Baía do Araçá (23°48'55.4"S 45°24'24.8"W), situada no município de São Sebastião, no litoral norte do Estado de São Paulo (Figura 0.1, 0.2a).

A Baía do Araçá está situada na parte central da porção continental do Canal de São Sebastião. É uma região composta por quatro praias (Deodato, Pernambuco, Germano e Topo), duas ilhotas (Pernambuco e Pedroso) e três machas de vegetação de mangue (Amaral et al., 2010; Lopez, 1993). Estas características, somadas à própria estrutura de enseada do local, previnem a ação hidrodinâmica direta, resultando em uma planície com pouco declive, sem ondas de alta amplitude e, consequentemente, com uma região entre marés muito extensa, chegando até 300 m. A baía é delimitada por bandas rochosas, o sedimento é composto por areia fina e compactada, apresentando aspecto

lamacento, com cascalhos e conchas entremeados, presentes em maior quantidade nas bordas das praias e ilhas. O local representa um dos últimos remanescentes de manguezal do litoral de São Sebastião (Amaral et al., 2010).

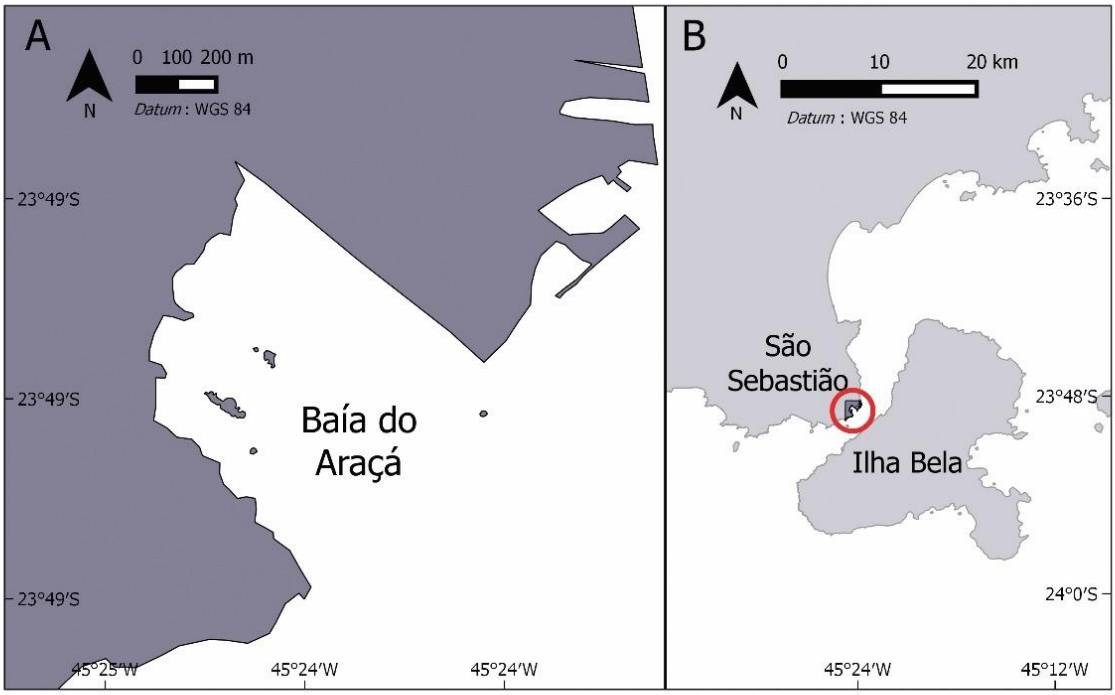

Figura 0.1 A Mapa Baía do Araçá; **B** Canal de São Sebastião, mostrando localização da baía.

A Baía do Araçá foi escolhida como área de estudo pela presença e abundância de animais da espécie aqui estudada, pela facilidade de acesso, pela ampla área descoberta durante marés baixas de sizígia e pelo conhecimento prévio da região, facilitando as coletas. Além disso, a proximidade com o Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar / USP) possibilitou a realização de experimentos após as coletas.

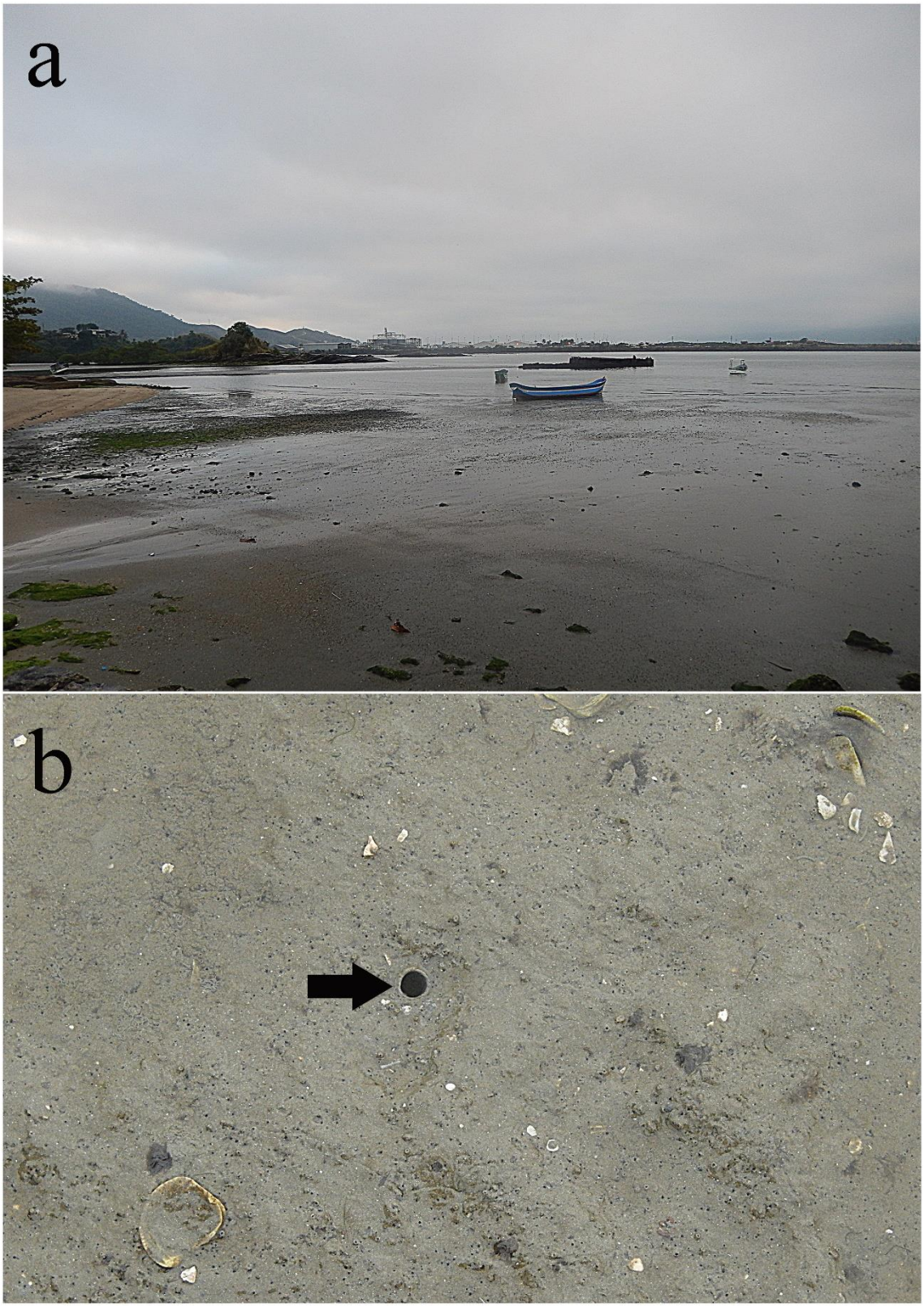

Figura 0.2 Baía do Araçá **a** foto da baía; **b** extremidade do tubo de *Diopatra neapolitana*, apontada por seta.

2.2. Procedimentos de Campo

Foram realizadas coletas mensais, durante as marés baixas de sizígia, entre Novembro de 2016 e Outubro de 2017, fechando 1 ano de amostragem, e uma coleta isolada em Novembro de 2017, visando experimentos com animais vivos, no CEBIMar. Os animais foram coletados ativamente, a partir da localização das extremidades dos tubos no sedimento (Figura 0.2b) e extração dos mesmos com auxílio de uma pá de lâmina comprida (45 cm), visando retirar os tubos inteiros, sem danificar os poliquetas; apesar disto, alguns indivíduos foram partidos ou danificados durante a captura, devido à agilidade dos animais. Nenhuma predileção foi assumida durante as coletas. Muitos tubos foram coletados vazios, por não possuírem um animal vivendo dentro ou pela fuga durante a extração, portanto a padronização do número de indivíduos coletados por mês não foi garantida.

Foram coletados 179 espécimes no total. Os animais foram anestesiados em cloreto de magnésio a 7,5 %, isotônico à água do mar, ainda dentro dos respectivos tubos, e depois retirados; esse procedimento garante que o animal não realize autotomia de alguma parte do corpo e nem seja danificado durante a remoção do tubo. Enquanto anestesiados, informações sobre os indivíduos vivos, incluindo coloração e dados morfométricos, foram anotadas; também foi removido e fixado em álcool 100% o segundo parapódio direito de cada animal, para análises moleculares, além da extração e fixação em formol 4% do líquido celômico, para futuras análises. Posteriormente, todos os animais foram fixados em formol 4% e preservados em álcool 70%, após lavagem em água destilada. Cada indivíduo foi armazenado separadamente em tubos falcon de 15 ml, para melhor identificação.

Capítulo 1 – Taxonomia

1. Introdução

Desde a sua descrição, o gênero *Diopatra* Audoin e Milne-Edwards, 1833 foi reconhecido como um dos grupos mais bem definidos da família Onuphidae, com representantes caracterizados por brânquias com filamentos organizados em espiral e presença de cirros peristomiais (Day, 1960; Paxton e Arias, 2017). Essa delimitação genérica perdeu força com as descrições dos gêneros *Paradiopatra* Ehlers, 1887 e *Epidiopatra* Augener, 1918, e, principalmente, com o descobrimento de mais espécies destes gêneros, cujos membros compartilhavam muitas características com os indivíduos de *Diopatra*. Budaeva e Fauchald (2011) propuseram a sinonímia de *Epidiopatra* e *Diopatra*, e estabeleceram as sinapomorfias de *Paradiopatra*, tornando os dois gêneros irmãos e com diagnoses bem definidas. Apesar de *Diopatra* ser atualmente considerado válido e bem definido, as delimitações taxonômicas a nível específico não são muito claras (Paxton, 1986).

Diopatra cuprea (Bosc, 1802) foi a primeira espécie descrita para o gênero, mas incluída na família Nereididae, na época, sob o nome de *Nereis cuprea*; a descrição desta espécie é vaga, assim como os seus caracteres diagnósticos. Audoin e Milne-Edwards (1833) descreveram *D. amboinenses*, acrescentando uma nota que apontava para a possibilidade de *Nereis cuprea* pertencer ao gênero, porém não houve designação da espécie-tipo e nem uma descrição formal do gênero naquele trabalho (Paxton, 1986). Milne-Edwards (1838) forneceu uma descrição breve para o gênero e listou apenas *D.*

amboinenses como pertencente a este grupo; o gênero foi oficialmente estabelecido por Malmgreen (1867 apud Paxton, 1986), com a designação da espécie-tipo.

A dificuldade em estabelecer caracteres diagnósticos e, consequentemente, em delimitar as espécies do gênero é demonstrada nas divergências entre autores ao longo dos anos. Um dos primeiros caracteres utilizados para tentar diferenciar as espécies foi a morfologia das cerdas pectinadas. Augener (1918) dividiu o gênero em 2 grandes grupos baseado nessa característica: membros de espécies do primeiro grupo apresentam cerdas pectinadas com dentes muito finos e numerosos, enquanto os do outro grupo têm cerdas pectinadas com menos dentes e mais robustos. Este agrupamento perdeu força após Monro (1930) diferenciar espécies do gênero que tinham sido consideradas idênticas por Augener (Hartman, 1944). Utilizando ainda a estrutura das cerdas pectinadas, Fauvel (1933) tentou delimitar as várias espécies de *Diopatra*, identificando primeiramente 2 grandes grupos e distribuindo as espécies conhecidas a partir de descrições e registros: um grupo compreendia as espécies com indivíduos apresentando 6 a 12 dentes nas pectinadas e o outro, com espécimes com mais de 14 dentes naquelas cerdas. Esta separação demonstrou alguns problemas, sendo um exemplo relacionado a *D. neapolitana*, que poderia ser incluída em qualquer dos grupos, dependendo da localidade de coleta dos animais e da descrição utilizada. Este problema poderia estar relacionado à identificação errada da espécie em localidades diferentes, a variações intraespecíficas e até a variações estruturais nas pectinadas de um mesmo indivíduo. Muito foco havia sido dado a uma única estrutura, negligenciando os demais caracteres morfológicos (Hartman, 1944).

Hartman (1944) apontou para a necessidade de analisar vários caracteres em conjunto, para uma melhor delimitação específica. Entre os principais caracteres mencionados pela autora estão: características dos parapódios anteriores (modificados),

disposição e formato das papilas sensoriais (chamadas na época de estruturas glandulares) dos palpos e antenas, estrutura das cerdas e tipo de tubo construído pelo animal. Hartman (1944) também sugeriu que algumas características são conspícuas e não devem ser utilizadas para diferenciar espécies, como: morfologia das brânquias e ganchos subaciculares, e coloração, pois são características muito uniformes entre as espécies e que se perdem com a fixação, ou que variam ao longo da ontogenia, além de estruturas da região posterior do corpo, que devem ser evitadas, pois a maioria dos indivíduos é coletada incompleta. Day (1960) questionou a validade das descrições e caracteres apresentados para o gênero, exemplificando com 30 amostras do Museu Britânico de várias partes do mundo, identificadas como *D. neapolitana*, mas que claramente se referiam a espécies diferentes. Day (1960) discorreu detalhadamente sobre os caracteres que considerou importantes, sendo estes: padrões constantes da pigmentação, número de anéis e projeções dos ceratóforos, papilas sensoriais dos ceratóstilos, morfologia das peças maxilares, formato e posição dos lobos pré e pós setais, tamanho e formato dos cirros dorsais e ventrais, e características das cerdas e ganchos subaciculares, incluindo localização no corpo, formato, tipo de capuz e número de dentes.

Fauchald (1968) deu suporte às análises anteriores, incluindo uma gama maior de caracteres, acrescentando a importância de analisar a posição, número e ocorrência dos ganchos subaciculares e dos filamentos branquiais, além de ressaltar as variações no número de anéis dos ceratóforos, dependendo da idade de cada indivíduo, e as modificações em estruturas moles (como os parapódios e lobos), decorrentes das fixações. Paxton (1986, 1993) continuou o trabalho de apresentar características importantes para diferenciar as espécies, descrevendo e revisando as espécies de *Diopatra* da Austrália, mas afirmou que as expectativas não eram boas e que o agrupamento em

complexos específicos seria necessário, antes da delimitação de cada espécie em particular.

Outros grupos de poliquetas próximos tiveram problemas parecidos solucionados listando-se todos os caracteres válidos possíveis, visando descrições mais completas e padronizadas, como é o caso do gênero *Eunice* (Fauchald, 1992). A revisão mais completa até o momento dos caracteres do gênero *Diopatra* foi realizada por Budaeva e Fauchald (2011), mas ainda há problemas relacionados a descrições antigas e comumente vagas, ou perda de holótipos.

Diopatra neapolitana é uma das espécies mais problemáticas do gênero, como aqui constatado, principalmente por ser uma das mais antigas do grupo, descrita de forma vaga e com caracteres mais genéricos que específicos, e sem localidade tipo claramente definida (citada apenas como Reino de Nápoles), além do holótipo ter sido perdido. Arias et al. (2016) resolveram parcialmente este problema, estabelecendo um neótipo e paraneótipos, provenientes da Baía de Pozzuoli em Nápoles, com dados completos da taxonomia morfológica e dados moleculares (disponíveis no GenBank). As descrições antigas precisam ser revistas e comparadas com esta nova, para estabelecer a real ocorrência e distribuição da espécie, além das possíveis variações intraespecíficas. O trabalho de Arias et al. (2016) abrangeu também características da biologia reprodutiva de membros de *D. neapolitana*, indicando a presença de hermafroditismo sequencial, caracterizado pela presença de papilas espermoducais na região dorsal dos indivíduos hermafroditas e, portanto, proporcionando informações ainda mais completas para esta espécie.

Os indivíduos da Baía do Araçá foram identificados em trabalhos anteriores como pertencentes a *D. aciculata* Knox e Cameron, 1971 (Steiner, 2005; Amaral et al., 2013), uma espécie originalmente da Austrália. Membros de *D. aciculata* e *D. neapolitana* são

morfologicamente semelhantes e comumente comparados e discutidos na literatura (Paxton, 1993; Dagli et al., 2005), mas considerados como de espécies diferentes. Os caracteres utilizados para diferenciar essas espécies por Paxton (1993) e Dagli et al. (2005) são: formato dos órgãos nucais (redondos em membros de *D. aciculata* e subtriangulares em *D. neapolitana*), tamanho dos cirros peristomiais (com o triplo do tamanho do peristômio em exemplares de *D. aciculata* e do mesmo tamanho do peristômio em *D. neapolitana*), posição dos lobos ventrais (do setígero 5 ao 20, em *D. aciculata*, 6-25 em *D. neapolitana*), maxila I (fina em *D. aciculata* e estendida medialmente em *D. neapolitana*) e maxilas II e III (com ápice truncado em *D. aciculata*, ápice triangular e pontiagudo em *D. neapolitana*). São caracteres que se sobrepõem, como os lobos ventrais, que podem ser modificados com a fixação, como os órgãos nucais, ou que são passíveis de variações intraespecíficas, como as maxilas. Os cirros peristomiais, em muitas descrições de ambas as espécies (Dagli et al., 2005; Steiner, 2006; Arias et al., 2016; presente), são 1,5-2 vezes maiores do que o peristômio, um intervalo intermediário, entre os valores descritos. Porém, na descrição original de *D. aciculata* (Knox e Cameron, 1971) existem outras diferenças, se comparadas ao neótipo de Arias et al. (2016), como: cirros peristomiais tentaculares e finos, cirros dorsais mais longos do que as brânquias em todos os setígeros e tubo pergaminoso, sem substrato de qualquer natureza aderido.

Fica claro o cuidado necessário ao estudar os indivíduos de *Diopatra*, focando em minimizar os erros taxonômicos e visando a melhor delimitação das espécies.

Este capítulo tem como objetivos identificar os indivíduos coletados na Baía do Araçá, utilizando dados morfológicos e moleculares, comparando com os dados presentes na literatura.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparações morfológicas

A descrição dos indivíduos brasileiros de *D. neapolitana* foi elaborada utilizando dados de todos os espécimes coletados no presente trabalho, provenientes da Baía do Araçá, em São Sebastião, no litoral norte do Estado de São Paulo, apresentando as variações morfológicas observadas na própria descrição. Dados da coloração foram obtidos dos indivíduos vivos. Todos os outros dados morfológicos são provenientes dos animais fixados em formol 4%, lavados em água destilada e armazenados em álcool 70%. Fotos dos indivíduos e as respectivas estruturas foram tiradas sob microscópio estereoscópio. Para microscopia eletrônica de varredura, indivíduos inteiros e parapódios destacados foram selecionados, desidratados em baterias progressivamente mais concentradas de álcool, depois em ponto crítico, montados em stubs, cobertos com fina camada de ouro e analisados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB-USP. Os parapódios também foram observados em microscopia ótica, para isso foram dissecados, hidratados em baterias progressivamente menos concentradas de álcool, até água destilada e montados em lâmina semipermanentes de Aquatex®; as fotos foram tiradas sob microscópio ótico. Após o término do presente trabalho, todos os indivíduos, stubs e lâminas serão depositados no Museu de Zoologia da USP (MZUSP).

2.2. Análises Moleculares

O segundo parapódio modificado do lado direito foi removido de cada animal e fixado em álcool 100%, para extração de material genético. Foram selecionados, aleatoriamente, parapódios de pelo menos 1 indivíduo de cada mês e o DNA para as análises genéticas foi então extraído utilizando as especificações do fabricante QIAGEN DNeasy Blood and Tisue Kit. A concentração e qualidade do material obtido foi verificada por meio do Espectrômetro NanoDrop 2000. A reação de polimerase em cadeia (PCR, do inglês "Polymerase Chain Reaction") utilizou a taq-polimerase GoTaq G2 Hot Start MasterMix (PROMEGA) e foi montada de acordo com as especificações do fabricante. Os iniciadores utilizados para a obtenção do gene COI foram LCO1490 e HCO2198, descritos por Folmer et al. (1994).

As rotinas de termociclador foram baseadas nas apresentadas nos trabalhos de descrição dos iniciadores. Para COI o perfil no termociclador consistiu em um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min., seguido de 35 ou 40 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 s, anelamento a 50° C, por 1 min, e extensão a 72° C ,por 1 min, seguido de uma extensão final a 72° C, por 7 min.

A amplificação da região do COI foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,2%. Os produtos de PCR com boas amplificações foram enviados para sequenciamento, seguindo o método de Sanger. O sequenciamento foi realizado pela empresa Myleus – DNA Facility. As sequências "forward" e "reverse" foram inspecionadas e editadas para remover iniciadores e suas regiões finais de baixa qualidade. As sequências foram editadas por alinhamento no Geneious 11.0.2 (Kearse et al., 2012) para obtenção da sequência consenso entre "forward" e "reverse". Todas as sequências obtidas foram consultadas por alinhamento local (BLASTn) (Altschul et al., 1990), no site do NCBI (National Center for Biotecnology Information, EUA), para localizar similaridades e confirmar a identidade do organismo alvo. As sequências

editadas foram agrupadas e alinhadas através do MAFFT, utilizando o método G-INS-i. Os alinhamentos resultantes tiveram as pontas aparadas, para padronização de tamanho, a fim de serem utilizadas na reconstrução filogenética.

A escolha do modelo para a reconstrução foi feita por meio do software jModelTest (Posada, 2008), o qual permite selecionar estatisticamente o melhor modelo de substituição de nucleotídeos. De acordo com o Critério de Informação de Akaike (AIC) (Akaike, 1973), o modelo mais adequado para as análises de COI foi o Generalised time-reversible ou GTR (Tavaré, 1986) com taxa de variação entre sítios (gamma - G) e proporção de sítios invariantes (I). Este modelo foi utilizado na reconstrução filogenética através da máxima verossimilhança, pelo programa RAxML (Stamatakis, 2014), com 5000 "bootstraps", e geração da árvore consenso a partir das 10 melhores árvores. Além disso, a reconstrução filogenética também foi feita pela inferência bayesiana posterior, utilizando o plug-in Mr.Bayes (Huelsenbeck e Ronquist, 2001; Ronquist e Huelsenbeck, 2003), com 1.000.000 gerações, subamostragens a cada 500 gerações, "burn-in" de 10.000 gerações e 2 cadeias independentes. Ambas reconstruções foram feitas no software Geneious 11.0.2.

Os grupos externos escolhidos reuniram as espécies de poliquetas, da família *Eunicidae*, *Eunice norvegica* e *Marphysa sanguinea*, sendo a raiz estabelecida para a primeira. A escolha foi baseada na literatura (Budaeva et al., 2016; Arias et al., 2016).

3. Resultados

Família Onuphidae Kinberg, 1865

Gênero *Diopatra* Audouin e Milne-Edwards, 1833

Espécie-tipo *Diopatra amboinensis* Andouin e Milne-Edwards, 1833

***Diopatra neapolitana* Delle Chiaje, 1841**

(Figs 1.1-7)

Material examinado

3 espécimes coletados 12 Nov 2016, 6 espécimes coletados 29 Nov 2016, 2 espécimes coletados 28 Dez 2016, 3 espécimes coletados 29 Dez 2016, 14 espécimes coletados 10 Jan 2017, 14 espécimes coletados 10 Fev 2017, 8 espécimes coletados 13 Mar 2017, 14 espécimes coletados 11 Abr 2017, 15 espécimes coletados 09 Mai 2017, 6 espécimes coletados 08 Jun 2017, 9 espécimes coletados 09 Jun 2017, 14 espécimes coletados 10 Jul 2017, 7 espécimes coletados 21 Ago 2017, 7 espécimes coletados 22 Ago 2017, 13 espécimes coletados 18 Set 2017, 16 espécimes coletados 18 Out 2017, 12 espécimes coletados 18 Nov 2017, 8 espécimes coletados 19 Nov 2017. Todos coletados na Baía do Araçá, 23º48’46.7’’S 45º24’31.3’’W, São Sebastião, Estado de São Paulo, zona entre marés arenosa.

Descrição

Comprimento total do corpo em indivíduos completos entre 7.8 e 16.7 cm, comprimento até o setígero 40 entre 2.7 e 5.8 cm, largura no setígero 10 entre 0.15 e 0.5 cm. Número total de setígeros em indivíduos completos entre 130 e 222. Animais com manchas retangulares de coloração marrom ou preta na região dorsal, na margem de cada

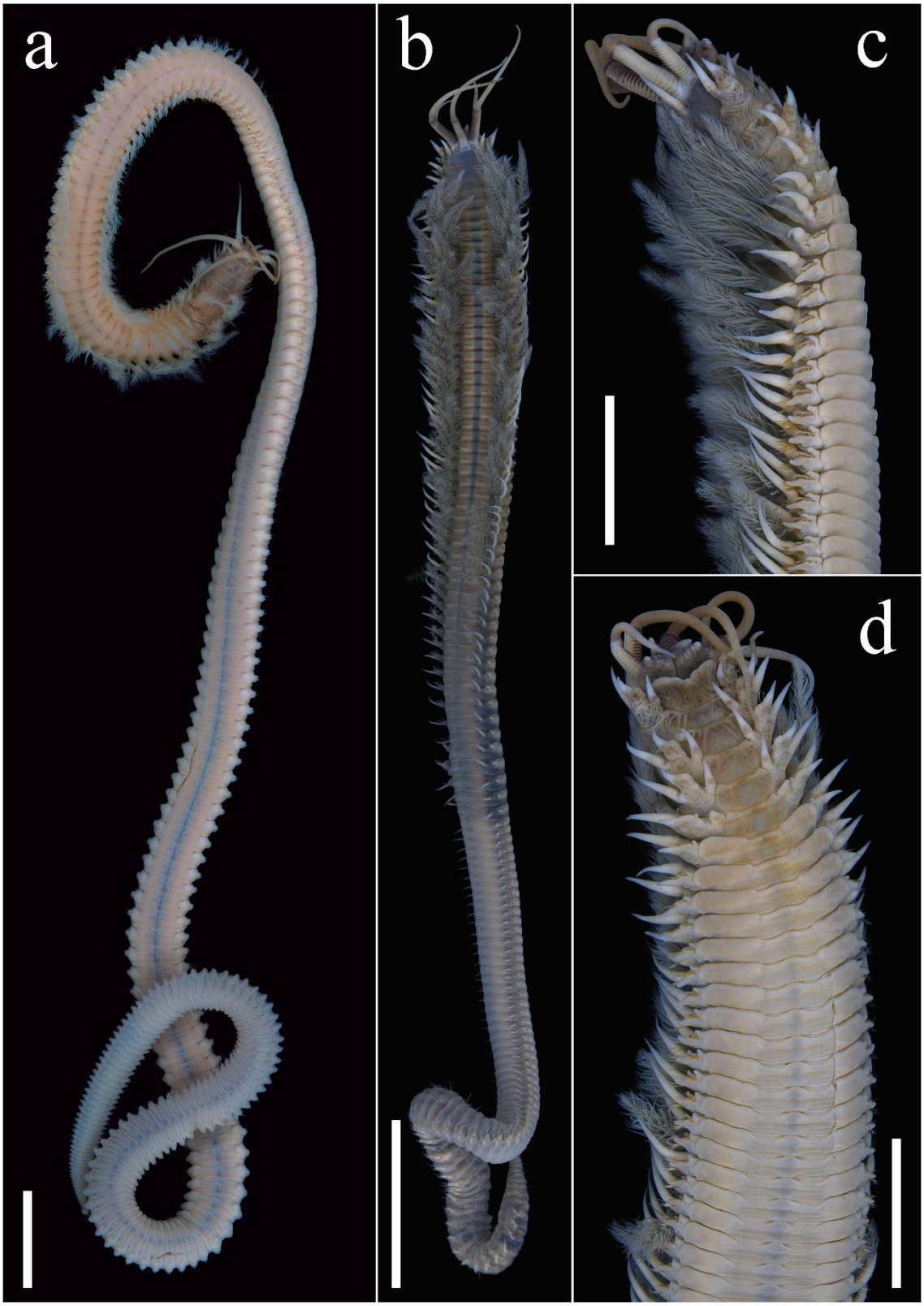

Figura 1.1 *Diopatra neapolitana*, indivíduos fixados, em microscópio estereoscópico **a-b** animal inteiro; **c** região anterior, vista lateral; **d** região anterior, vista ventral. **Escalas a, c-d** 0,5 cm; **b** 1 cm.

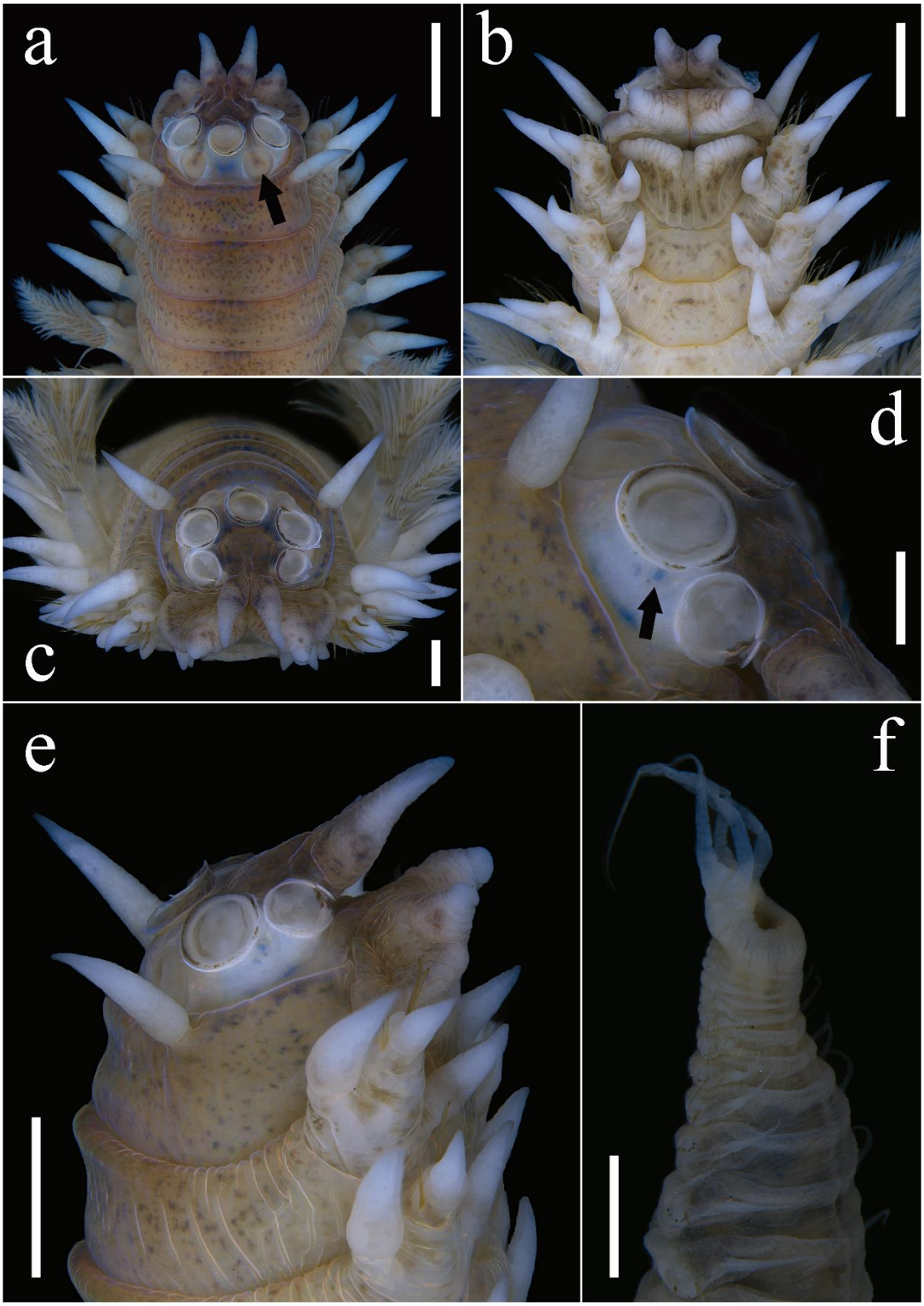

Figura 1.2 *Diopatra neapolitana*, indivíduo fixado, em microscópio estereoscópico **a-e** região anterior, indivíduo com antenas e palpos dissecados **a** vista dorsal, seta aponta para órgão nucal; **b** vista ventral; **c** vista frontal; **d** vista lateral, seta apontando para o olho; **e** vista lateral; **f** pigídio. **Escalas a-b, e-f** 0,2 cm; **c-d** 0,1 cm.

setígero. Resto do corpo em um gradiente de bege a marrom escuro, variando entre os indivíduos; cutícula comumente iridescente, na região dorsal (Figura 1.1a-b). Alguns espécimes com pequenos pontos esbranquiçados, dispostos aleatoriamente ao longo do corpo, incluindo nas antenas e palpos.

Prostômio afunilado, mais largo do que comprido (Figura 1.2a, c), com um par apical de lábios frontais subulados separados por uma pequena fenda, de comprimento semelhante ao do prostômio (Figura 1.2a-c). Órgãos nucais pareados, com formato variando entre indivíduos, sendo a forma de 'U' mais comum e com pigmentação mais escura no centro (Figuras 1.1b; 1.2a); variações abrangem de semicirculares a círculos quase fechados e subtriangulares, relacionadas ao tamanho dos exemplares e fixação. Prostômio com 3 antenas e 2 palpos semelhantes em forma e largura (Figura 1.1a-c), dispostos em semicírculo, com espaçamento entre a base das antenas laterais e dos palpos menor do que entre a antena mediana e as laterais (Figura 1.2a, c-e); ceratóforos e palpóforos com 6-16 anéis proximais e anel distal mais longo; ceratóstilos e palpóstilos afilados, com ponta arredondada; alguns indivíduos com pontas inchadas, provavelmente em regeneração; antenas de mesmo comprimento, alcançado o setígero entre 7-12, quando rebatidas sobre o corpo; palpos mais curtos, chegando ao setígero 2-4; ceratóstilos e palpóstilos com fileiras longitudinais de papilas sensoriais elípticas bem delimitadas (Figura 1.6a-b); manchas ocelares presentes abaixo da base das antenas laterais, pequenas e cobertas por cutícula (Figura 1.2d).

Peristômio de 2 a 3 vezes mais largo do que comprido, com 2/3 a 1/2 do comprimento do prostômio, formado por apenas 1 anel (Figura 1.2a-b). Um par de cirros peristomiais subulados, afilando distalmente, inseridos subdistalmente, alinhados lateralmente à base das antenas laterais, 1.5-2 vezes o tamanho do peristômio (Figura 1.2a, c, e). Lábios do peristômio inseridos ventralmente; lábios superiores arredondados,

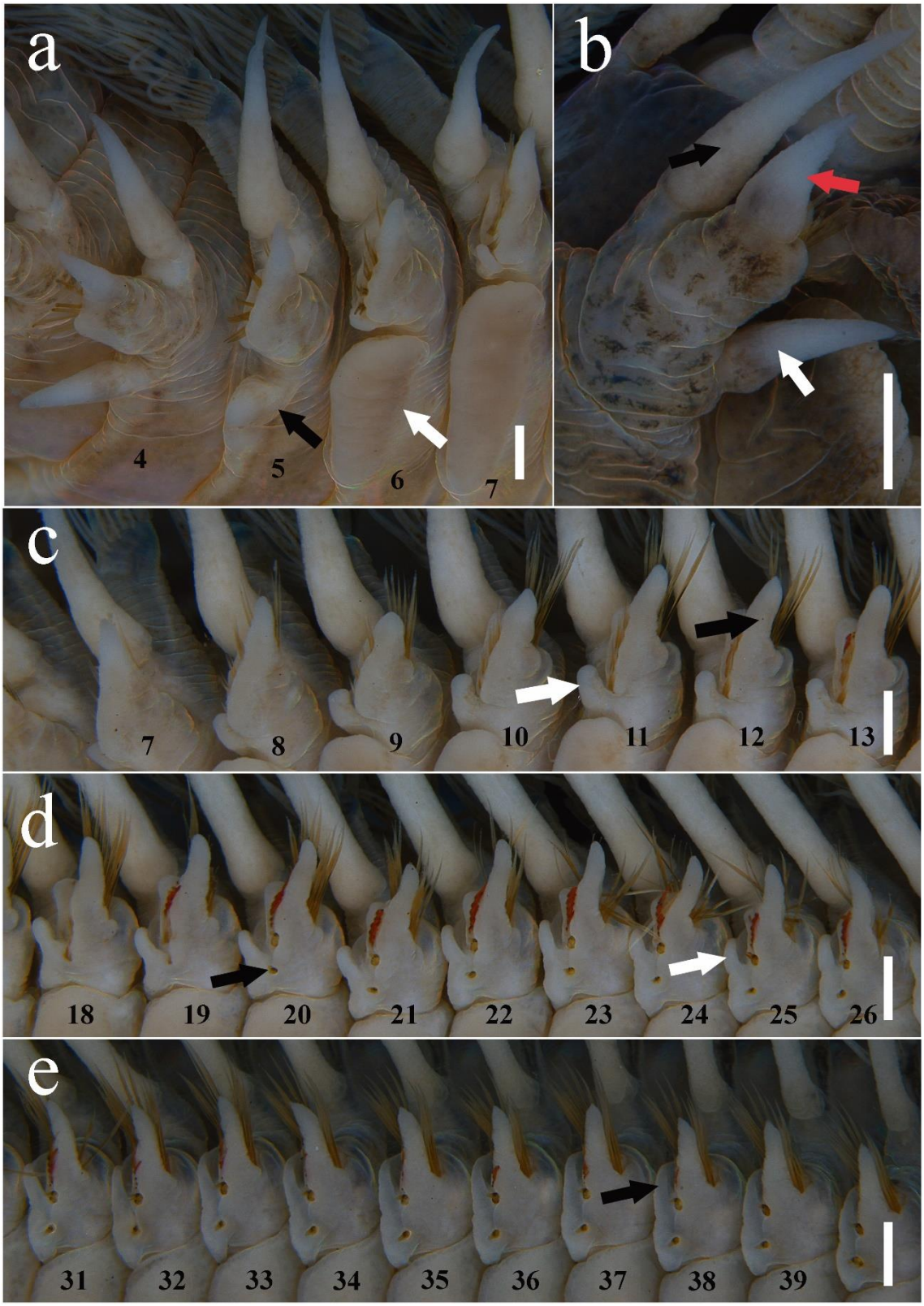

Figura 1.3 Parapódios de *Diopatra neapolitana*, indivíduos fixados, em microscópio estereoscópico **a** parapódios 4-7, seta preta aponta para cirro ventral de transição e seta branca para almofada ventral; **b** parapódio modificado 1, seta preta aponta para o cirro dorsal, vermelha para o lobo pós setal e branca para o cirro ventral; **c** parapódios 7-13, seta branca aponta para o lobo ventral e preta para o lobo pós setal; **d** parapódios 18-26, seta preta aponta para o começo dos ganchos subaciculares e branca para lobo ventral fundindo com o parapódio, formando novo lobo pré setal; **e** parapódios 31-40, seta aponta para novo lobo pré setal totalmente formado. **Escala: a-e** 0,5 mm.

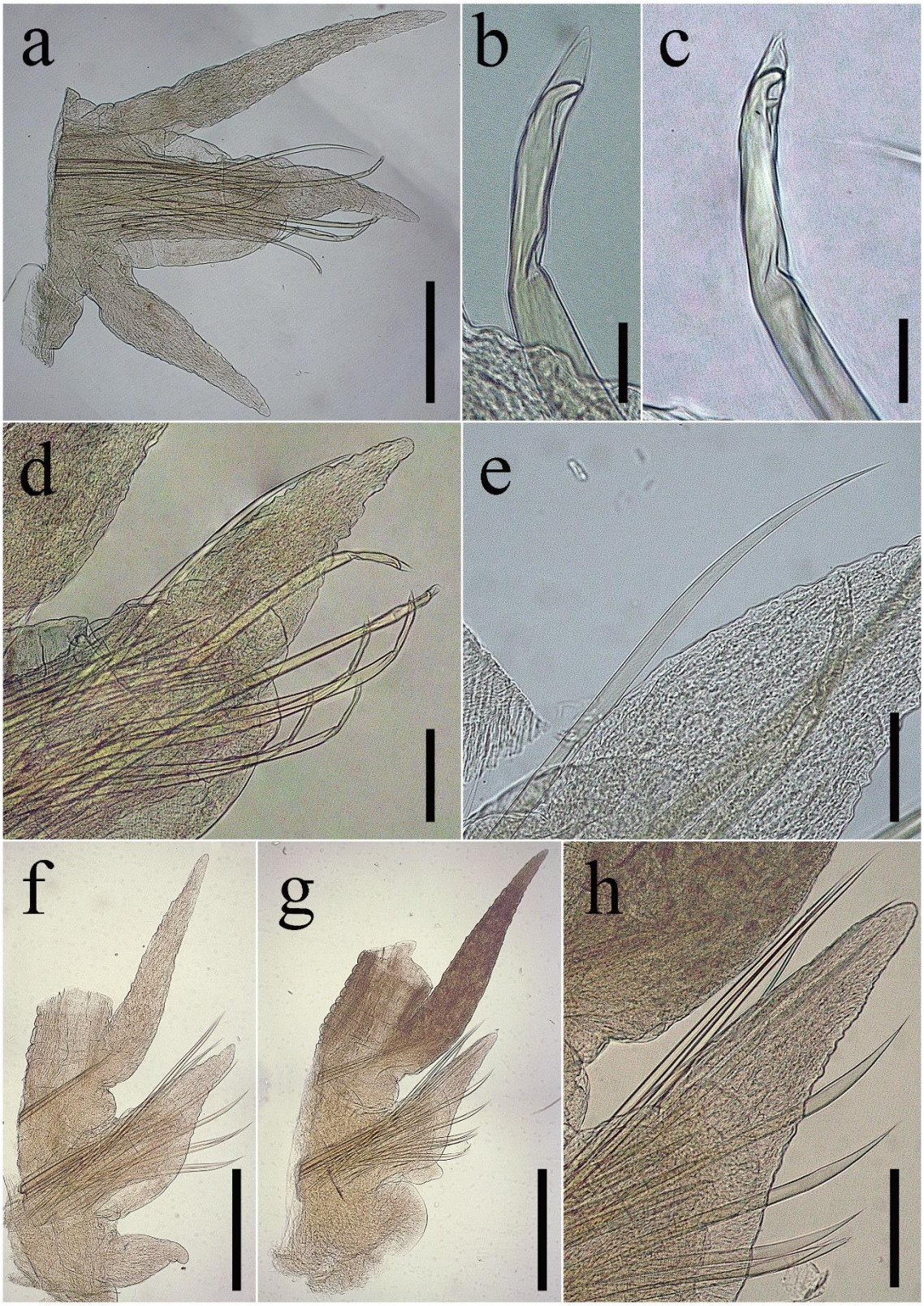

Figura 1.4 Parapódios dissecados de *Diopatra neapolitana*, em microscópio óptico **a** parapódio modificado 2; **b** cerda falcígera pseudocomposta monodentada; **c** cerda falcígera pseudocomposta bidentada; **d** parapódio modificado 3; **e** cerda limbada do parapódio modificado 1; **f** parapódio 4, não modificado; **g-h** parapódio 5, não modificado. **Escalas a, f-g** 500 µm; **b-c** 50 µm; **d** 200 µm; **e** 100 µm.

com artículos distais ovais, divididos por fenda medial, inseridos na margem anterior do peristômio; lábio inferior como uma peça única com fenda medial equivalente a ~1/5 do comprimento total (Figuras 1.1d; 1.2b).

Maxilas e mandíbulas muito calcificadas e duras, coloração marrom em indivíduos menores, mais escuras e esclerotizadas em indivíduos maiores. Mandíbulas com hastes compridas, subuladas e coloração escura; placas cortantes presentes distalmente, com 3 a 5 pequenos dentes e coloração esbranquiçada (Figura 1.6d). Fórmula maxilar mais comum: Mx I 1+1; Mx II 9+8; Mx III 7+0; Mx IV 6+8; Mx V 1+1; variação intraespecífica: Mx II 7+7, 8+8, 9+7, 9+9; Mx III 8+0; Mx IV 6+7, 8+8, 8+9; Mx V 2+1 (Figura 1.6c).

Primeiros 3 ou 4 setígeros com parapódios modificados, mais compridos do que os parapódios seguintes e levemente direcionados ventralmente (Figuras 1.1c-d; 1.2b; 1.3a). Parapódios modificados com cirros dorsais com o dobro do comprimento dos ventrais, ambos subulados (Figuras 1.3b; 1.4a); lobos pré setais arredondados (Figura 1.6f), algumas vezes com pequena fenda mediana apical, quase bilobados; longos lobos pós setais subulados, quase o mesmo tamanho dos cirros ventrais (Figuras 1.3b; 1.4a; 1.6g), lobos ventrais ausentes nesses parapódios. Cirros dorsais ligeiramente maiores nos parapódios não modificados (a partir do parapódio 4 ou 5), mais curtos e finos a partir dos parapódios 20-25, muito finos na metade posterior do corpo (Figura 1.1 b); cirros ventrais do primeiro par de parapódios não modificados (parapódios 4 ou 5) de transição, com metade do tamanho daqueles dos parapódios modificados (Figura 1.3a; 1.4f), cirros dos setígeros subsequentes substituídos por almofadas glandulares ventrais (Figuras 1.3a; 1.4g), progressivamente menores na metade posterior do corpo, sempre presentes; lobos pré setais gradativamente menores (Figura 1.3d), desaparecendo no setígero 15-22 (Figura 1.3d-e); lobos pós setais gradativamente menores, digitiformes e de mesmo

tamanho na metade posterior do corpo; lobos ventrais a partir do parapódio 5 ou 6 (Figura 1.3c), fundidos às paredes dos parapódios, como novo lobo pré setal, a partir do setígero 18-30 (Figura 1.3e).

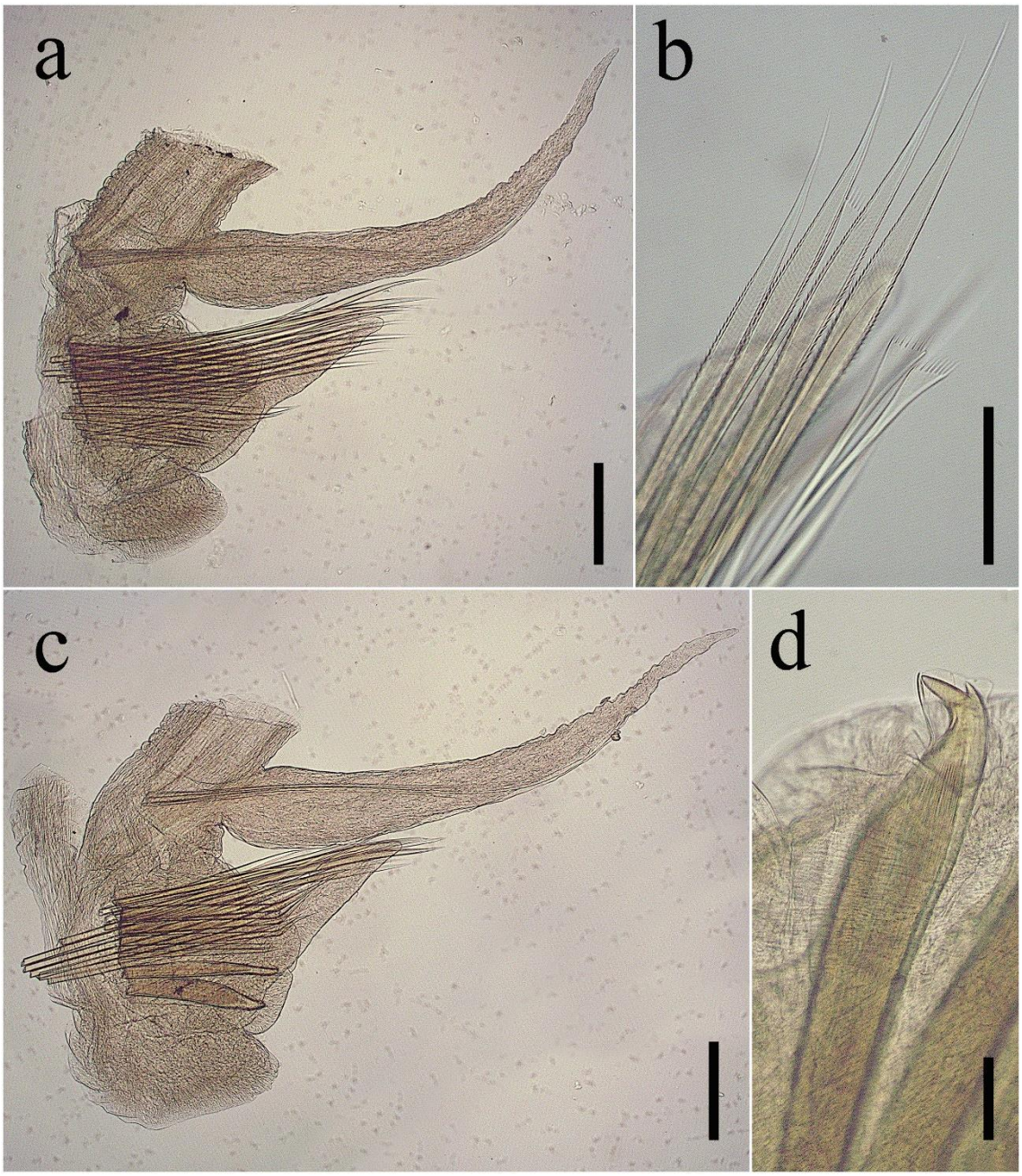

Figura 1.5 Parapódios dissecados de *Diopatra neapolitana*, em microscópio óptico **a** parapódio 12; **b** cerdas simples limbadas e serrilhadas, à esquerda, e cerdas pectinadas, à direita; **c** parapódio 28; **d** gancho subacicular bidentado. **Escalas a, c** 500 µm; **b, d** 75 µm.

Brânquias espiraladas, com até 19 voltas, a partir do parapódio 4-5 (Figuras 1.1c; 1.2a), coincidindo com o começo dos parapódios não modificados. Tamanho das

brânquias e número de voltas diminuindo progressivamente a partir do setígero 25, ausentes a partir do setígero 45-60 (Figura 1.1b). Brânquias maiores do que os cirros dorsais (Figura 1.1c), exceto nos últimos setígeros branquiais, onde estas estruturas já estão muito reduzidas.

Parapódios modificados (parapódios 1-3 ou 4) com 1-2 cerdas simples limbadas dorsais (Figuras 1.4d-e; 1.7c) e número variável de falcígeras pseudocompostas (Figura 1.6e) monodetadas (Figuras 1.4b; 1.7a) ou bidentadas (Figuras 1.4c; 1.7b), com o dente distal arredondado e capuz pontiagudo. Falcígeras progressivamente mais finas ao longo do eixo dorsoventral do feixe (Figuras 1.4a, d; 1.6f-g); algumas falcígeras em formação internas.

Parapódios não modificados (a partir do parapódio 4-5) com até 6 (nos parapódios 35-42) cerdas pectinadas homodontes com 5-10 dentes (Figuras 1.5b; 1.7f), base e ápice paralelos horizontalmente ou levemente oblíquos. Cerdas simples limbadas de 2 tipos: curtas, levemente curvadas e restritas à região mediana dos parapódios (Figura 1.5c); e compridas progressivamente mais serrilhadas a partir dos setígeros 25-45 (Figuras 1.5b; 1.7g), principalmente nas regiões dorsal e ventral do parapódio. Ganchos subaciculares bidentados (Figuras 1.5d; 1.7e), a partir do setígero 14-20 (Figura 1.3d), 2 ganchos por parapódio (Figuras 1.3d-e; 1.5c; 1.7d), algumas vezes com terceiro gancho interno em formação, para reposição; dentes dos ganchos muito quebradiços.

Dois tipos de acículas presentes, 3-5 neuroacículas separadas por parapódio, com extremidade chegando à base do lobo pré setal (Figura 1.4d, h), e um feixe de notoacículas no cirro dorsal, mais finas e com extremidades chegando a aproximadamente 1/5 da extensão do cirro, nos parapódios modificados (Figura 1.4a) e até 1/2 nos demais parapódios (Figuras 1.5a, c).

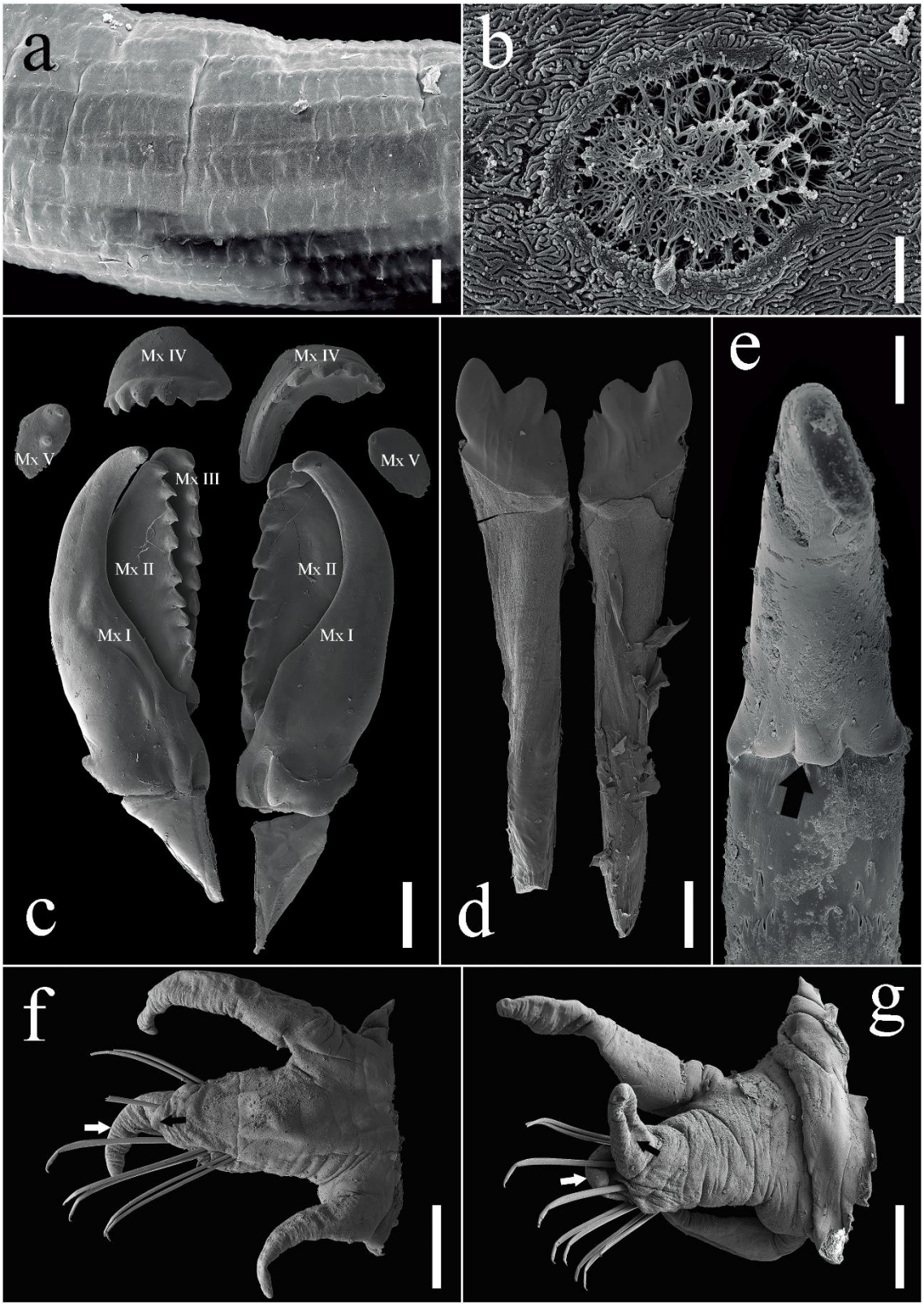

Figura 1.6 *Diopatra neapolitana*, em microscópio eletrônico de varredura **a** parte medial da antena mediana; **b** detalhe da papila da antena; **c** maxilas, cada peça maxilar identificada; **d** mandíbulas; **e** cerda falcígera, com seta apontando para articulação pseudocomposta; **f** parapódio modificado 1, seta branca aponta para lobo pós setal e preta para lobo pré setal; **g** parapódio modificado 1, seta branca aponta para lobo pré setal e preta para lobo pós setal. **Escalas a** 50 µm; **b** 2 µm; **c-d, f-g** 400 µm; **e** 10 µm.

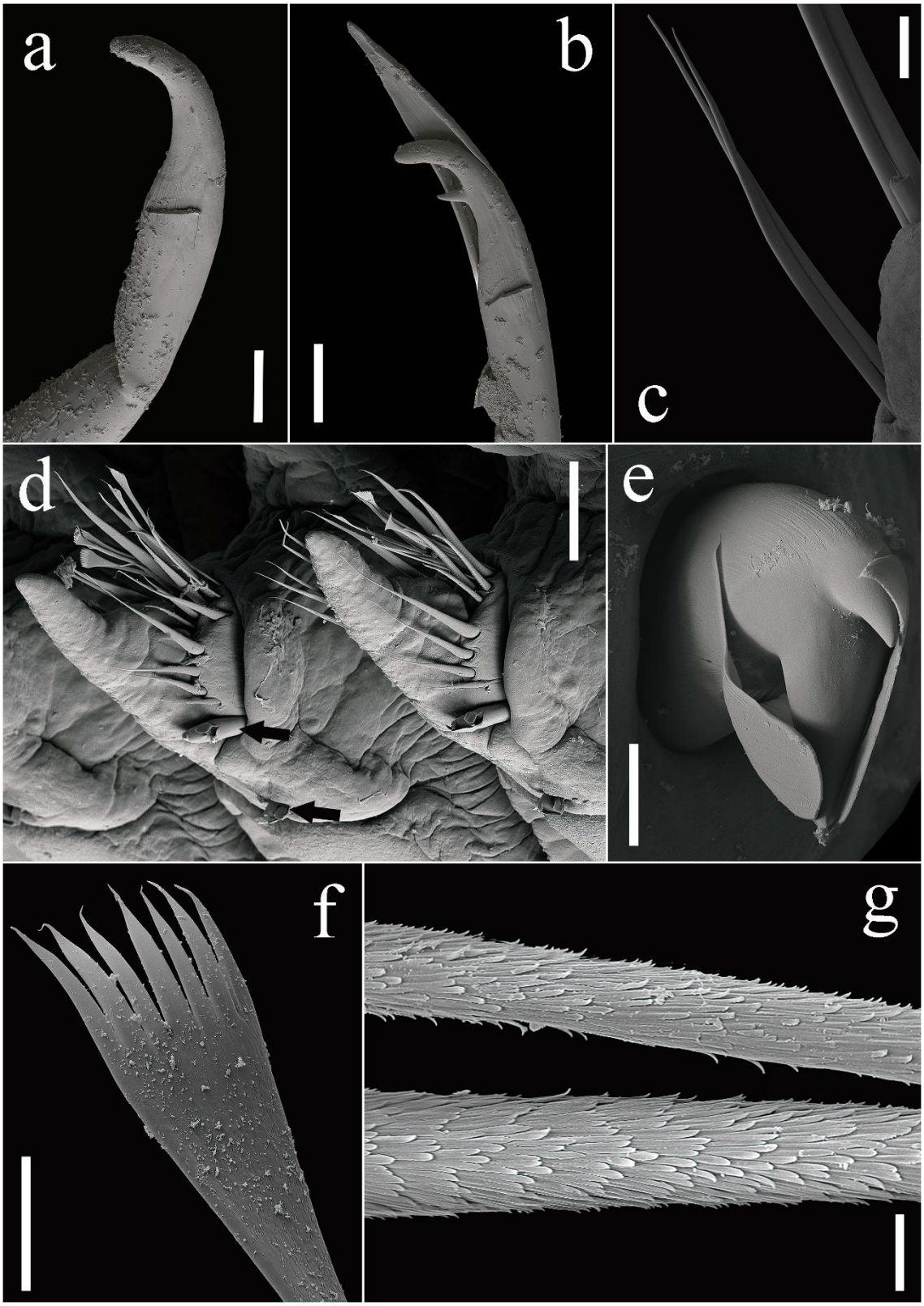

Figura 1.7 *Diopatra neapolitana*, em microscópio eletrônico de varredura **a** cerda falcígera pseudocomposta monodentada; **b** cerda falcígera pseudocomposta bidentada; **c** cerdas limbadas e lisas do parapódio modificado 2; **d** parapódios 24-25; seta aponta para os ganchos subaciculares do parapódio 24; **e** gancho subacicular bidentado; **f** cerda pectinada; **g** cerdas limbadas e serrilhadas do parapódio 29. **Escalas a-b, e-f** 20 µm; **c** 100 m; **d** 200 µm; **g** 4 µm.

Dois pares de cirros pigidiais, o primeiro par do tamanho dos últimos 8 segmentos, o segundo, com metade do comprimento daquele (Figura 1.2f).

Tubo formado por uma matriz interna secretada pelo animal e a porção externa aglutinando substrato não específico, como areia, conchas e folhas, definido pelos elementos disponíveis no substrato no local onde o indivíduo se estabelece. É comum a presença de um objeto maior, como uma concha ou folha, na abertura do tubo.

Observações taxonômicas

Indivíduos do gênero *Diopatra* da Baía do Araçá foram, anteriormente, identificados como pertencentes a *D. aciculata* (Steiner, 2005). Aquela espécie e *D. neapolitana* apresentam muitas características em comum e, consequentemente, a delimitação entre elas não é muito clara, como discutido acima (Paxton, 1993; Dagli et al., 2005). A descrição original de *D. aciculata* (Knox e Cameron, 1971) apresenta algumas características divergentes dos espécimes do presente trabalho, como: tubos lisos, sem nenhum sedimento aglutinado, cirros peristomiais afilados e cirros dorsais maiores do que as brânquias. Aquela descrição inclui poucos caracteres e não apresenta variação intraespecífica.

Os espécimes aqui estudados se assemelham mais à descrição do neótipo de *D. neapolitana* de Arias et al. (2016), que utilizaram o holótipo de *D. aciculata* como material comparativo e incluíram a variação intraespecífica. Uma característica importante para esta identificação é a presença das papilas espermoducais na região dorsal de alguns indivíduos, descritas por Arias et al. (2016) como indicadoras do hermafroditismo sequencial protândrico nos animais desta espécie e únicas no gênero

Diopatra. Portanto, os espécimes da Baía do Araçá são aqui identificados como pertencentes a *D. neapolitana*.

Comparação dos dados moleculares

De todas as sequências obtidas, considerando ao menos um indivíduo de cada mês, foram selecionadas três sequências parciais de COI, com 596 pares de base cada, pois todas eram idênticas. Os dados moleculares foram comparados com 2 espécies de Eunicidae e 6 espécies de *Diopatra* (Onuphidae), além de indivíduos de *Diopatra neapolitana* de localidades diferentes, obtidas a partir do GenBank (Tabela 1.1). As distâncias moleculares entre os indivíduos de *D. neapolita* coletados na Baía do Araçá e os outros espécimes da ordem Eunicida, medidas pelo modelo "Kimura-2-parameter", estão representadas na Tabela 1.2. As distâncias intraespecíficas, entre animais da espécie no Brasil e de todas as outras localidades, são nulas, sendo uma exceção dois indivíduos de Portugal, que apresentam distância molecular de 0,2% em relação aos outros indivíduos de *D. neapolitana*, explicado por Rodrigues et al. (2009) como reflexo da presença de dois haplótipos para a espécie, devido a uma alteração de bases; as comparações interespecíficas demonstram distâncias de 0.9%, tanto comparando *D. aciculata*, quanto *D. dentata*, com os indivíduos de *D. neapolitana*, porém estas distâncias variam entre 19-27% comparando a espécie em questão com as outras do gênero *Diopatra* (Tabela 1.2). Nas árvores obtidas, tanto considerando máxima verossimilhança, quanto bayesiana, todos os indivíduos de *D. neapolitana*, independentemente da localidade, estão no mesmo clado, bem como as espécies *D. aciculata* e *D. dentata*, que aparecem como um táxon irmão, sendo o grupo externo, mais próximo deste táxon formado pela espécie *D. micrura* (Figura 1.8); a topologia foi igual nas duas árvores, portanto, os valores na

Figura 1.8 incluem as duas análises, mas o cladograma utilizado como base foi o da bayesiana.

Tabela 1.1 Sequências de COI, retiradas do GenBank; localidade retirada dos artigos de referência, também listados na tabela.

Espécies	Localidade	COI	Referência
Grupos externos			
Eunice norvegica (Linnaeus, 1767)	Trondheim, Noruega	GQ497541.1	Zanol et al., 2010
Marphysa sanguinea (Montagu, 1815)	Roscoff, França	GQ497547.1	Zanol et al., 2010
Espécies de Diopatra			
D. cuprea (Bosc, 1802)	Golfo do México	FJ428894.1	Berke et al., 2010
D. marocensis Paxton et al., 1995	Guia, Portugal	GQ456165.1	Rodrigues et al., 2009
D. marocensis Paxton et al., 1995	Ria de Avero, Portugal	FJ646632.1	Rodrigues et al., 2009
D. marocensis Paxton et al., 1995	Óbidos, Portugal	FJ428925.1	Berke et al., 2010
D. micrura Pires et al., 2010	Guia, Portugal	GQ456162.1	Pires et al., 2010
D. dentata Kinberg, 1865	Adelaide, Austrália	GQ497522.1	Zanol et al., 2010
D. aciculata Knoxe Cameron, 1971	Sem localidade	AY838867.1	Struck et al., 2006
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Ria de Avero, Portugal	EU878539.1	Rodrigues et al., 2009
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	San Simón, Espanha	KT992101.1	Arias et al., 2016
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	San Simón, Espanha	KT992101	Arias et al., 2016
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	San Simón, Espanha	KT992099.1	Arias et al., 2016
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	El Puntal, Espanha	KT992098.1	Arias et al., 2016
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428951.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428948.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428931.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428913.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428908.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428903.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428888.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428882.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428880.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428862.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428857.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428877.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428863.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Arcachon, França	JQ950321.1	Pires et al., 2012
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Portugal	GQ456164.1	Rodrigues et al., 2009
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428856.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428940.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428932.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428904.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	Península Ibérica / França	FJ428833.1	Berke et al., 2010
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	São Sebastião, Brasil	BR1	Este trabalho
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	São Sebastião, Brasil	BR2	Este trabalho
D. neapolitana Delle Chiaje, 1841	São Sebastião, Brasil	BR3	Este trabalho

Tabela 1.2 Distância molecular baseada na sequência de COI de 7 espécies de *Diopatra* e 2 táxons como grupo externo (*Eunice norvegica* e *Marphysa sanguinea*). A espécie *Diopatra neapolitana* inclui indivíduos de localidades diferentes.

D. neapolitana EU878539.1		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana KT992101.1	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana KT992101	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana KT992099.1	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana KT992098.1	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428951.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428948.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428931.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428913.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428908.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428903.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428888.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428882.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428880.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428862.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428857.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428877.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,020	0,020	0,020	0,022	0,027	0,026
D. neapolitana FJ428863.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,010	0,010	0,022	0,021	0,021	0,020	0,022	0,027	0,027
D. neapolitana JQ950321.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR1_09	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR2 11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR3 13	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR4 17	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR5 23	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR6_44	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR7_46	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR8 65	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR9 75	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR10 80	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR11_83	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR12_107	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR13_102	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR14 109	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR15 119	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR16 124	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana BR17_137	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,026	0,026
D. neapolitana GQ456164.1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002		0,000	0,002	0,003	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,027	0,026
D. neapolitana FJ428856.1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000		0,002	0,003	0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,027	0,026
D. neapolitana FJ428940.1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004		0,003	0,003	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,022	0,027	0,026
D. neapolitana FJ428932.1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004		0,002	0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,020	0,022	0,027	0,027
D. neapolitana FJ428904.1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,004		0,003	0,009	0,009	0,021	0,021	0,021	0,019	0,021	0,026	0,026
D. neapolitana FJ428833.1	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006		0,009	0,009	0,021	0,020	0,020	0,020	0,021	0,026	0,026
D. aciculata AY838867.1	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,044	0,046	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,044	0,044	0,040	0,044	0,044	0,046		0,003	0,021	0,021	0,021	0,021	0,023	0,025	0,025
D. dentata GQ497522.1	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,044	0,046	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,044	0,044	0,040	0,044	0,040	0,046	0,006		0,021	0,021	0,021	0,021	0,022	0,025	0,025
D. marocensis GQ456165.1	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,203	0,211	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,212	0,212	0,209	0,207	0,222	0,220		0,002	0,002	0,020	0,021	0,023	0,026
D. marocensis FJ646632.1	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,201	0,208	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,209	0,209	0,207	0,204	0,220	0,217	0,002		0,000	0,020	0,021	0,023	0,026
D. marocensis FJ428925.1	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,201	0,208	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,209	0,209	0,207	0,204	0,220	0,217	0,002	0,000		0,020	0,021	0,023	0,026
D. micrura GQ456162.1	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,179	0,183	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,180	0,178	0,183	0,178	0,180	0,202	0,197	0,186	0,188	0,188		0,021	0,026	0,026
D. cuprea FJ428894.1	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,219	0,219	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,219	0,219	0,224	0,224	0,219	0,219	0,234	0,226	0,215	0,212	0,212	0,209		0,023	0,024
Marphysa sanguinea GQ497547.1	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,292	0,296	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,293	0,296	0,296	0,296	0,296	0,290	0,290	0,282	0,282	0,247	0,245	0,245	0,289	0,246		0,025
Eunice norvegica GQ497541.1	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,292	0,297	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294	0,297	0,297	0,297	0,297	0,291	0,294	0,279	0,274	0,292	0,294	0,294	0,301	0,272	0,262	

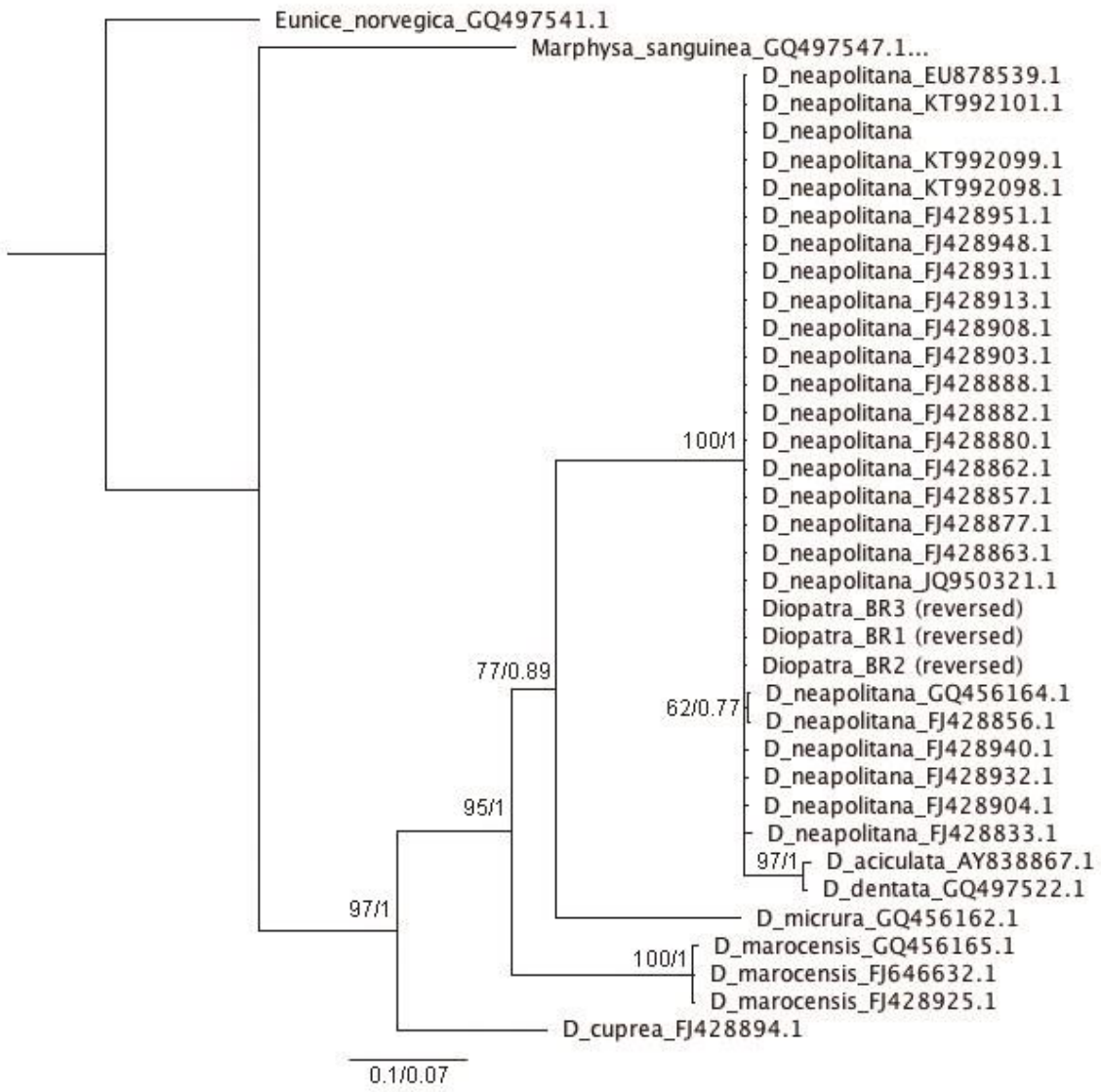

Figura 1.8 Arvore filogenética, com valores de máxima verossimilhança a esquerda da barra e de bayesiana a direita, comparando sequências de COI.

Concluindo, os resultados moleculares suportam os resultados morfológicos e, portanto, os indivíduos coletados na Baía do Araçá pertencem a espécie *Diopatra neapolitana*. Os resultados demonstram, também, que o clado formado pelas espécies *Diopatra aciculata* e *Diopatra dentata* está dentro daquele formado por *Diopatra neapolitana*, porém mais estudos são necessários para sugerir uma sinonímia.

Capítulo 2 – Ciclo de vida

1. Introdução

O comércio de poliquetas como iscas para peixes é muito comum e praticado há muitos anos, tendo levado à introdução de espécies exóticas em alguns locais (Çinar, 2013). Delle Chiaje (1841) mencionou a coleta e venda de animais da espécie *D. neapolitana* como iscas para peixes em Nápoles, Itália, na descrição original da espécie. A comercialização destes animais se expandiu muito, levados por navios, principalmente no Mediterrâneo (Pires et al., 2012a), de maneira que os mesmos passaram a ser observados em novas localidades, como na Baía de Izmir, Turquia (Dagli et al., 2005), e praias de Portugal, como Aveiro, Olhão e Setúbal, dentre outras (Sá et al., 2017). Possivelmente relacionado ao amplo comércio e estabelecimento em novas áreas, *D. neapolitana* apresenta amplo registro de distribuição, incluindo localidades no Índico (Fauvel, 1953), Mar Vermelho (Wehe e Fiege, 2002), Atlântico Norte (Fauvel, 1923; Lourido et al., 2008) e Sul, no presente trabalho, além, como já dito, do próprio Mediterrâneo. Day (1967) sugeriu que os registros fora do Mediterrâneo podem estar equivocados, porém Dagli et al. (2005) apontaram para a possibilidade de invasão por indivíduos desta espécie, enfatizando que a real da distribuição destes animais ainda é desconhecida e que todos os registros apresentados devem ser reavaliados. Apesar de todas as dúvidas existentes, é perfeitamente lógico supor que o comércio de exemplares de *D. neapolitana* deve ter influenciado na distribuição e abundância destes animais observadas em nossos dias.

Cunha et al. (2005) estimaram que um total de aproximadamente 4.364.620 indivíduos (com intervalo de confiança entre 3.413.878 e 5.369.160 indivíduos) de *D. neapolitana* são coletados anualmente no Canal de Mira, em Ria de Aveiro, Portugal, e um estudo sobre o impacto destas coletas demonstrou que virtualmente todos os tubos visíveis eram coletados em poucos dias, gerando hipóteses sobre a sobrevivência desta população. Somando-se os problemas taxonômicos desta espécie às dúvidas sobre a introdução da mesma em novos ambientes e ao impacto das colheitas nas populações, fica clara a necessidade de mais estudos sobre os padrões reprodutivos de indivíduos de *D. neapolitana*, principalmente comparando diferentes localidades.

Diferentes estudos com um ano de duração obtiveram diferentes resultados. Dagli et al. (2005) observaram um pico reprodutivo entre Abril e Agosto, numa população da Baía de Izmir, mas com presença de indivíduos férteis (contendo gametas) durante quase todos os meses do ano, exceto em Janeiro, bem como uma proporção macho:fêmea de 3:4. Pires et al. (2012b) estudaram uma população de Ria de Aveiro e notaram um pico reprodutivo entre Maio e Agosto, com indivíduos férteis presentes em todos os meses e uma proporção macho:fêmea de 1:1. Arias et al. (2016) estudaram uma população do estuário de Villaviciosa, na Espanha, com pico reprodutivo também entre Maio e Agosto, sem observar indivíduos com gametas femininos entre Agosto e Setembro, considerado um período de descanso ("resting period"), em que novos gametas estão sendo produzidos no celoma após a desova, e uma proporção macho:fêmea de 3:1. Os três trabalhos apresentam pontos em comum e diferem em outros, demonstrando que o ciclo reprodutivo e, consequentemente, a biologia reprodutiva destes animais, não são fixos, apresentando variações entre diferentes locais e populações.

Arias et al. (2016) também propuseram que *D. neapolitana* é uma espécie com hermafroditismo sequencial protândrico, caracterizado pela presença de papilas

espermoducais na região dorsal anterior dos indivíduos hermafroditas, limitadas à região branquial. Estas estruturas estariam relacionadas à produção e liberação dos espermatozoides, enquanto na porção posterior do corpo são produzidos e liberados os óvulos. Esta descoberta recente modifica todo o panorama de estudo da biologia reprodutiva destes animais, pois indivíduos hermafroditas nunca antes haviam sido observados, o que não desqualifica os trabalhos anteriores supracitados.

O ciclo reprodutivo de uma espécie engloba vários eventos, desde a gametogênese até a liberação de gametas. Fatores específicos e ambientais exercem importantes papéis nesse processo, porém estudos detalhados da biologia reprodutiva de poliquetas existem para apenas 5% das espécies (Giangrande, 1997). Além disso, existem padrões de métodos reprodutivos diferentes para as regiões tropical, temperada e polar, ainda que animais de diversas espécies se desviem desses padrões (Giese, 1959). A falta de trabalhos reprodutivos em poliquetas é evidente, principalmente aqueles comparativos entre populações de indivíduos de uma mesma espécie, em diferentes regiões.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo estudar o ciclo reprodutivo dos indivíduos de *D. neapolitana* presentes na Baía do Araçá, no litoral norte do Estado de São Paulo, ao longo de um ano. Os diferentes aspectos reprodutivos foram investigados separadamente, buscando semelhanças e diferenças nos padrões da população estudada e nas de outras localidades, de acordo com a bibliografia disponível. São feitas comparações morfométricas e estudados a gametogênese, o ciclo reprodutivo, a partir dos gametas femininos, e o dimorfismo sexual.

2. Materiais e Métodos

2.1. Morfometria

Com o objetivo de estudar a biologia reprodutiva de *D. neapolitana*, principalmente a partir do estudo dos gametas e do ciclo reprodutivo anual, foram coletados mensalmente indivíduos de uma mesma população da Baía do Araçá, totalizando 151 espécimes.

Os animais foram analisados vivos, foram tomadas medidas morfométricas e os indivíduos foram, então, numerados sequencialmente. Todos os tubos foram verificados internamente, para investigar a presença de gametas, ovos ou larvas.

Medidas morfométricas foram tomadas com os animais anestesiados em cloreto de magnésio a 7,5 %, visando a padronização dos dados, com o relaxamento das musculaturas circular e longitudinal dos exemplares. Foram tomadas as seguintes medidas: número total de setígeros; largura do corpo na altura do setígero 10 (**L10**); comprimento do corpo do início do prostômio até o setígero 40 (**C40**); comprimento total do corpo. As medidas de largura foram tomadas excluindo os parapódios e as de comprimento, desconsiderando antenas e palpos, a partir da extremidade anterior do prostômio. Os dados foram analisados estatisticamente, o que permitiu separar os indivíduos em classes.

Fragmentos sem cabeça de indivíduos partidos foram armazenados junto à porção anterior dos mesmos, mas as medidas morfométricas não consideraram esses fragmentos, apenas a porção anterior do corpo de cada animal. Visando avaliar a existência de locais

do corpo mais suscetíveis a ruptura, os animais foram divididos em classes, quanto ao número de setígeros dos indivíduos incompletos, com intervalos de 10 segmentos. Os resultados foram reunidos num gráfico, com a porcentagem de espécimes em cada classe.

2.2. Gametas Femininos

Dos 151 indivíduos *D. neapolitana* coletados ao longo do ano de estudo, 48 apresentavam gametas femininos no celoma. Esses animais foram fixados com os gametas no interior do corpo, visando padronização. Nenhum gameta feminino foi encontrado na região anterior dos animais, estes aparecendo, no mínimo, a partir do setígero 45, coincidindo com o fim da região branquial. Como muitos indivíduos estavam incompletos, os gametas foram retirados entre os setígeros 50–70, sempre que possível, pois, na maioria dos espécimes com gametas femininos, esta região estava intacta.

A coleta dos gametas foi feita através de cortes ventrais, próximos ao começo dos parapódios, em qualquer dos lados, expondo o interior do celoma e removendo os gametas com uma pipeta. O fluido extraído foi então colocado em uma câmara de contagem, com volume de 1000 ml^3 e divisões quadradas de 1 ml^2. A câmara foi analisada em microscópio ótico e a medida do maior diâmetro de cada gameta foi tirada com uma ocular graduada acoplada. As medidas foram tomadas somente em gametas maiores do que 100 µm e sem células acessórias (“nurse cells”), pois apenas estes são considerados maduros (ovócitos); foram medidos 40 ovócitos de cada indivíduo, aleatoriamente dispostos na câmara de contagem. Ovócitos com estrutura morfológica danificada pela fixação foram descartados. Para indivíduos com poucos ovócitos no corpo, estes gametas foram armazenados após a contagem e medição.

Foi calculada, também, a porcentagem de gametas femininos imaturos de cada espécime, estes menores do que 100 µm ou com células acessórias. Para isso, foram contados 200 gametas aleatoriamente, também na câmara de contagem e sob microscópio ótico, quantificando os números de gametas maduros e imaturos, de acordo com a definição apresentada acima, dentre os 200 analisados. Assim como nas medições, gametas com a estrutura morfológica muito danificada, que gerassem dúvidas quanto ao estágio de maturação, foram descartados da contagem; foram também descartadas da contagem as células acessórias soltas, sem gametas associados.

Também foram analisadas diferentes regiões do corpo dos indivíduos, para verificar se havia diferenças na maturação dos gametas femininos ao longo dos animais. Estas análises consideraram o diâmetro dos ovócitos maduros e a proporção dos gametas maduros e imaturos. Os procedimentos seguiram os padrões descritos acima, em regiões distintas do corpo, extraindo gametas de 5 setígeros consecutivos em cada região, do setígero 50 até o fim do corpo, com diferença de 15 setígeros entre o término de uma região e o início da seguinte.

Foram feitos gráficos a partir dos dados gerados, correlacionando os dados de tamanho dos ovócitos e a porcentagem de ovócitos maduros e imaturos por classe de tamanho dos animais, meses em que ocorreram as coletas e regiões do corpo de cada indivíduo cujos gametas foram analisados.

Gametas femininos de todos os tamanhos e estágios de maturação foram fotografados. Os gametas foram fotografados sob microscopia ótica, em lâminas montadas em álcool a 70 %, e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a MEV, gametas isolados, ou partes do corpo contendo gametas, foram desidratados em baterias de concentrações crescentes de álcool (70-100 %), posteriormente em hexametildisilazane ou no equipamento de ponto crítico, quando possível, montados em

stubs, cobertos com fina camada de ouro e observados e fotografados sob o feixe de elétrons.

2.3. Gametas Masculinos

Os gametas masculinos de *D. neapolitana* foram analisados sobre microscopia ótica e MEV, a partir do líquido celômico retirado dos animais vivos e os compostos dentro do celoma dos animais fixados. O líquido celômico foi coletado de animais anestesiados em cloreto de magnésio a 7,5 %, isotônico à água do mar, com um corte feito na região ventral e o fluido removido com uma pipeta, tentando incluir o mínimo possível de água do ambiente. O líquido celômico contendo gametas masculinos caracteriza-se pela coloração esbranquiçada e alta viscosidade. O material extraído de cada animal foi depositado em um frasco catalogado com o número do espécime e fixado em algumas gotas de formol 4%. Os cortes foram feitos entre os setígeros 50–80 dos animais, sempre evitando danificar o intestino ou algum vaso sanguíneo, para que não houvesse contaminações de qualquer natureza.

Para microscopia ótica foram montadas lâminas semipermanentes, usando Aquatex®. Os cortes dos animais fixados, contendo espermatozoides na parede interna, foram hidratados em baterias de álcool em concentrações gradativamente menores (70-0 %), a última apenas com água destilada. No caso do líquido celômico, foi removido material depositado no fundo dos frascos, onde se concentram os gametas.

Para a MEV, o líquido fixado foi montado em lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro, a partir de citocentrifugação (Figura 2.1a), realizada no Laboratório de Biologia Celular de Invertebrados Marinhos, no Departamento de Fisiologia, IB–USP. O processo

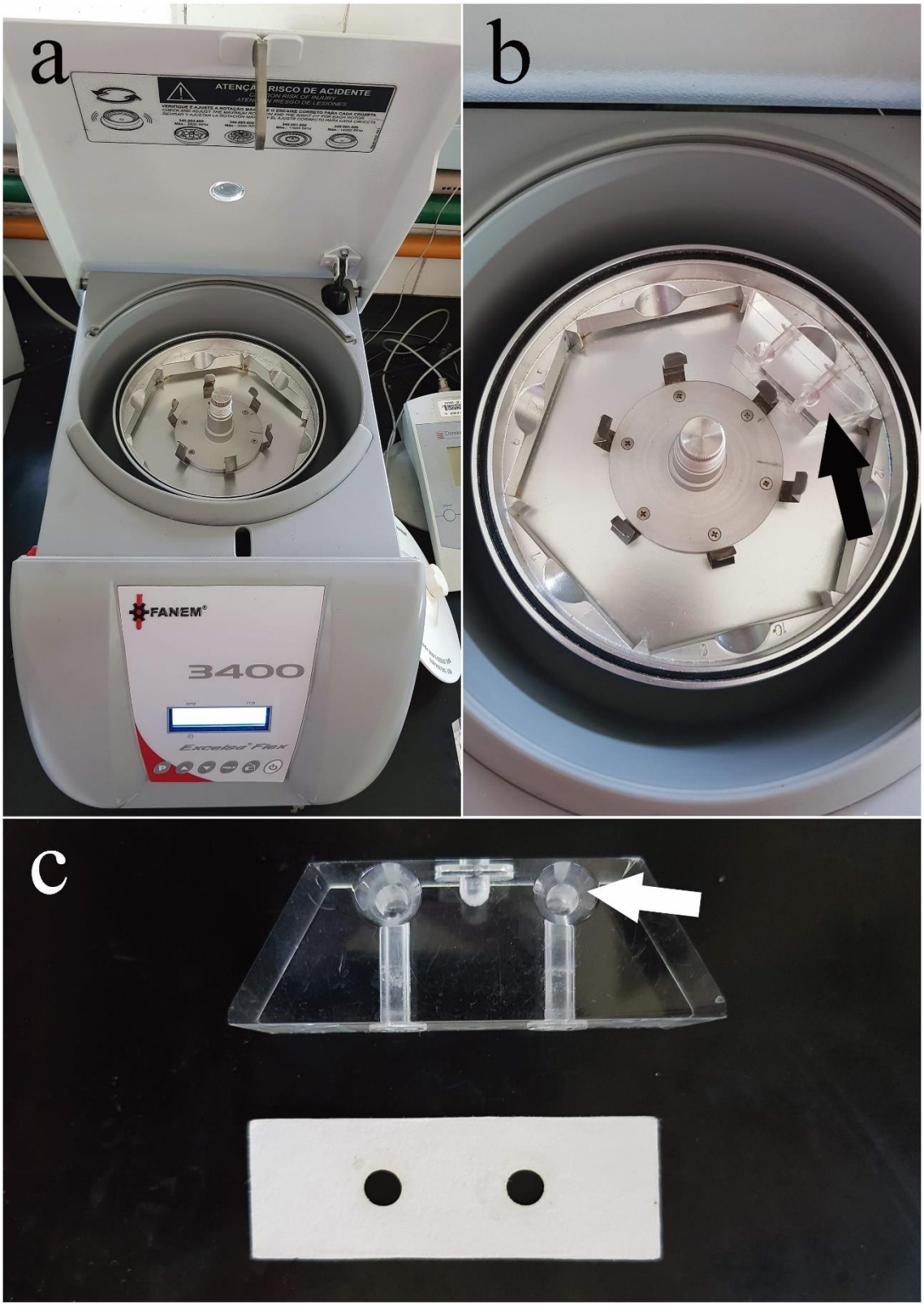

Figura 2.1 Citocentrífuga **a** aparelho aberto; **b** interior do aparelho, onde ocorre a centrifugação, com um trapézio de acrílico posicionado, apontado por seta; **c** trapézio de acrílico, com seta apontando para uma abertura lateral onde o material será depositado e papel de filtro, abaixo.

envolve prender duas lamínulas esterilizadas em metanol, em uma lâmina com fita, sobrepô-las a um papel filtro furado nos locais das lamínulas, para remover o excesso de líquido, e prender o conjunto à base maior de um trapézio de acrílico (Figura 2.1b). O trapézio possui duas aberturas em uma lateral e duas aberturas na base maior, sobrepostas às lamínulas, portanto o líquido celômico fixado foi colocado nas aberturas laterias e a centrifugação fixou o material sólido nas lamínulas, descartando o meio líquido no papel filtro (Figura 2.1c). As lamínulas foram colocadas em água destilada por 10 minutos, para remover o excesso de sal, e deixadas para secar por evaporação; uma vez secas, estas foram coladas em stubs de MEV e mantidas em estufa a vácuo. Algumas das lamínulas se quebraram durante o processo na centrífuga e, nestes casos, os fragmentos foram montados nos stubs, tentando manter o formato original das lamínulas.

Foram feitos cortes nos parapódios, para estudar a parte interna destes, onde se encontram os nefrídeos; estes foram feitos em três regiões do corpo, anterior (no máximo até o sétimo setígero), região branquial (entre setígeros 20-35) e posterior (a partir do setígero 50). Todos os cortes foram desidratados em bateria de álcool (70-100 %), em seguida no aparelho de ponto crítico e montados em stubs. Os stubs, tanto com lamínulas, quanto com cortes, foram submetidos à metalização com ouro e analisados em MEV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB–USP.

2.4. Dimorfismo sexual

O dimorfismo sexual em indivíduos de *D. neapolitana* foi estudado a partir dos gametas, encontrados no celoma dos setígeros posteriores à região branquial, e da presença e estágio de desenvolvimento das papilas espermoducais, encontradas em

indivíduos hermafroditas (Arias et al., 2016). A coloração dos animais vivos foi comparada com os tipos de gametas encontrados nos mesmos.

Em casos incertos quanto ao tipo de gameta encontrado, ou à presença de gametas femininos e masculinos simultaneamente num mesmo espécime, o conteúdo celômico foi analisado sob microscopia ótica e MEV, seguindo a metodologia de citocentrifugação descrita acima, para o estudo dos espermatozoides. Os principais casos incertos foram aqueles de indivíduos com ovócitos e liquido celômico espesso (podendo conter espermatozoides), ou com espermatozoides no celoma e papilas espermoducais desenvolvidas.

Os diferentes estágios de desenvolvimento das papilas espermoducais foram registrados, afastando as brânquias para melhor visualização da região dorsal. Foi também utilizado Azul de Metileno, para realçar a presença e forma destas. Os animais foram fotografados sob microscópio estereoscópio antes e depois da aplicação do corante. Cortes dos setígeros da região branquial, onde se localizam as papilas espermoducais, foram estudados sob MEV, utilizando a metodologia de desidratação e metalização descrita anteriormente. Em alguns indivíduos, a região das papilas espermoducais foi perfurada antes da metalização, no intuito de encontrar gametas no interior das mesmas.

Considerando o hermafroditismo sequencial como atributo da espécie estudada, foram feitas hipóteses relacionando os três gêneros (macho, hermafrodita e fêmea) com as características dos gametas e papilas espermoducais dos indivíduos. As diferentes hipóteses foram correlacionadas ao longo dos meses e em relação às medidas morfométricas, verificando possíveis padrões de dimorfismo sexual e características sequenciais dos gêneros, relacionadas ao hermafroditismo protândrico, através de gráficos reunindo os dados obtidos.

3. Resultados

3.1. Análise dos indivíduos incompletos

Do total de 151 indivíduos coletados, ~20 % (31 indivíduos) estavam completos e ~80 % (120 indivíduos), incompletos, sem a parte posterior. O menor espécime incompleto apresentava 41 setígeros e o maior, 148. No estudo da porcentagem de indivíduos incompletos, divididos em classes de acordo com o número de setígeros, a maior classe foi a com 60–69 setígeros (16,67 %) e a menor, com 140–150 (2,50 %) (Figura 2.2). Alguns espécimes apresentaram fissão de alguns setígeros mais posteriores durante manipulação do corpo, ou durante o cultivo vivo (Capítulo 3 desta Dissertação); esses fragmentos possuíam 5–8 setígeros (Figura 2.3e) e apresentavam movimentação dos parapódios e locomoção, mantendo-se ativos por 2 dias. A porção mais posterior dos indivíduos partidos e as porções distais dos fragmentos supracitados apresentavam contração da musculatura circular, principalmente quando a ruptura foi "voluntária" (Figura 2.3a-e).

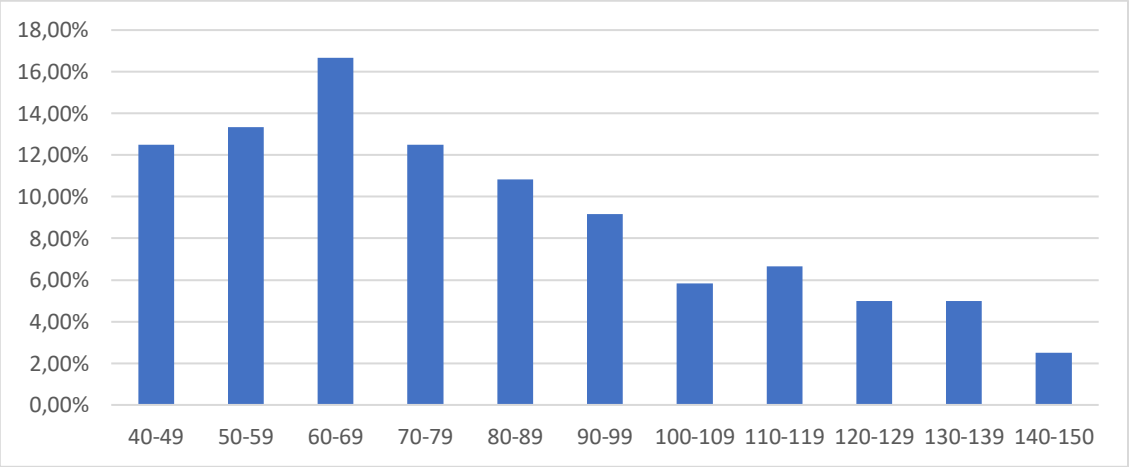

Figura 2.2 Gráfico da porcentagem de indivíduos incompletos, divididos em classes, a partir do número de setígeros.

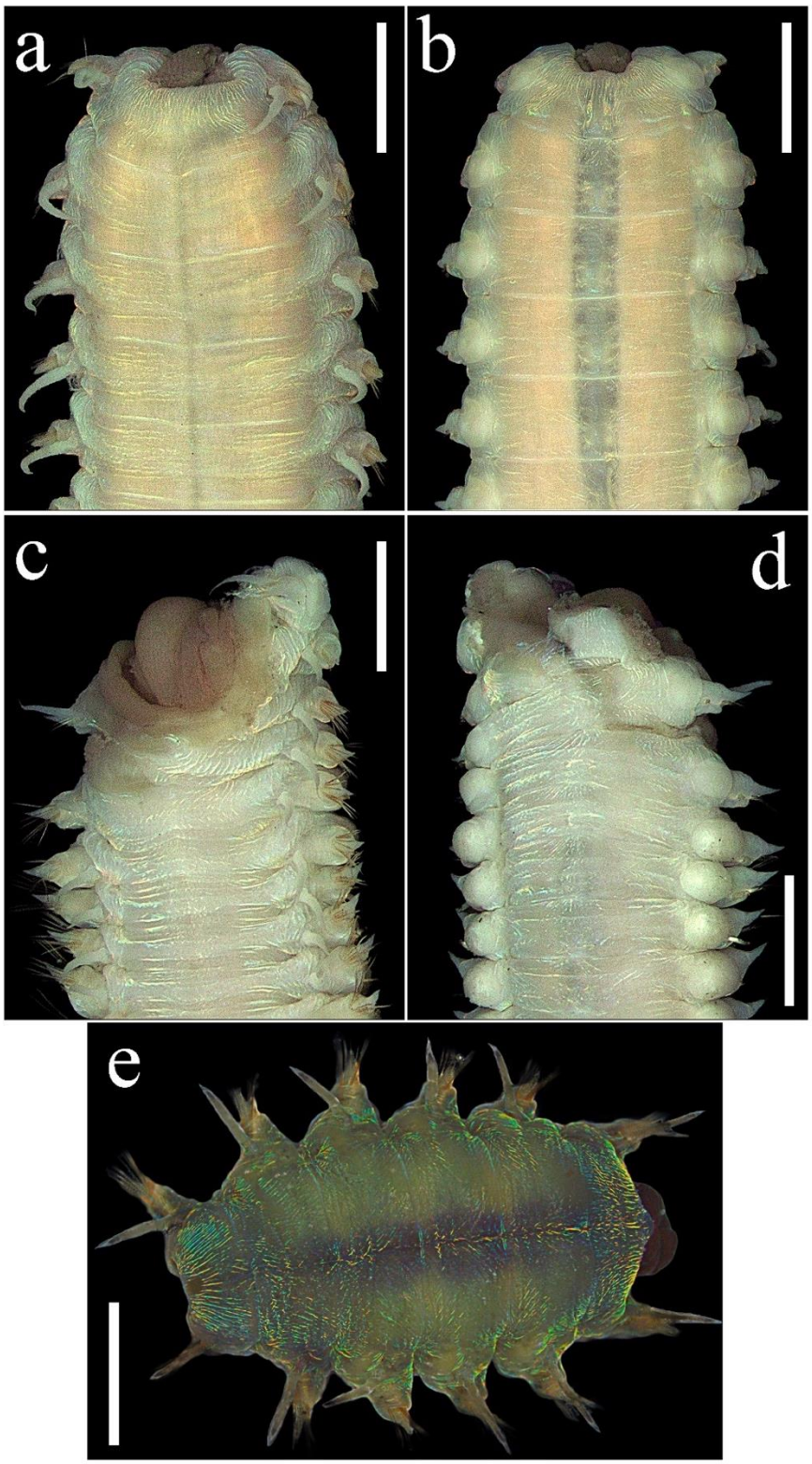

Figura 2.3 *Diopatra nepolitana*, em microscópio estereoscópico: região posterior **a** vista dorsal da porção distal de indivíduo partido por autotomia; **b** vista ventral da porção distal de indivíduo partido por autotomia; **c** vista dorsal da porção distal de indivíduo danificado durante a coleta; **d** vista ventral da porção distal de indivíduo danificado durante a coleta; **e** fragmento autotomizado de indivíduo. **Escalas: a-e** 2 mm.

3.2. Ciclo reprodutivo anual

Em todos os meses de coleta foram encontrados indivíduos com ovócitos maduros. Apenas um indivíduo, coletado em Dezembro, não possuía pelo menos 40 gametas femininos ao longo de todo o corpo, tendo sido analisados apenas 15 ovócitos maduros deste, que equivalem ao total de gametas encontrados no exemplar. Alguns animais incompletos tinham menos de 45 setígeros, não tendo sido possível verificar a presença de gametas femininos, uma vez que estes só aparecem em setígeros mais posteriores. O diâmetro de ovócitos maduros variou entre 105-245 µm.

Não houve diferenças significativas no diâmetro dos ovócitos de um mesmo indivíduo entre as regiões do corpo (Figura 2.4), mas o intervalo entre os setígeros 90-95 apresentou uma variação maior no diâmetro destes gametas. Também não houve diferença significativa na porcentagem de gametas femininos imaturos ao longo do corpo de um mesmo indivíduo; um espécime coletado em Setembro, apresentou 43% de ovócitos imaturos entre os setígeros 50-55, 53% entre os setígeros 70-75, 45% entre 90-95, e 54% entre 110-115. Em todos os meses a média do diâmetro dos ovócitos ficou entre 170-190 µm (Figura 2.5), o valor mínimo, do primeiro quartil, foi de 160 µm e o máximo, do terceiro quartil, foi 200 µm.

A distribuição das medidas dos diâmetros dos ovócitos não apresenta diferenças significativas entre os meses, sempre com a maior quantidade de gametas com diâmetro entre 170-210 µm, em média (Figuras 2.6, 2.7). Comparando-se o diâmetro dos ovócitos e a classe de tamanho dos indivíduos, definida pela largura do corpo no setígero 10, com variação de 0,2-0,5 mm, também não há diferenças significativas entre as classes e a maior parte dos gametas femininos apresentou 170-210 µm de diâmetro (Figura 2.8). Os

ovócitos apresentam distribuição normal ao longo das classes de tamanho, com pico em animais entre 0,3-0,4 mm de largura (Figura 2.9).

Comparando-se a porcentagem de gametas imaturos de cada espécime entre os meses, também não foram observadas diferenças significativas, apesar de um pico na porcentagem de ovócitos imaturos em Abril e Maio (Figura 2.10). Analisando-se a porcentagem de gametas imaturos em relação às classes de tamanho, conforme previamente apresentadas, houve diferenças significativas numa proporção positiva, isto é, quanto maior o indivíduo, maior a porcentagem de ovócitos imaturos (Figuras 2.11, 2.12). Os testes de modelo linear para as classes de tamanho, tanto para diâmetro dos ovócitos, quanto para porcentagem de gametas imaturos, apresentaram valores de F = 0,4204 e p = 0,5168.

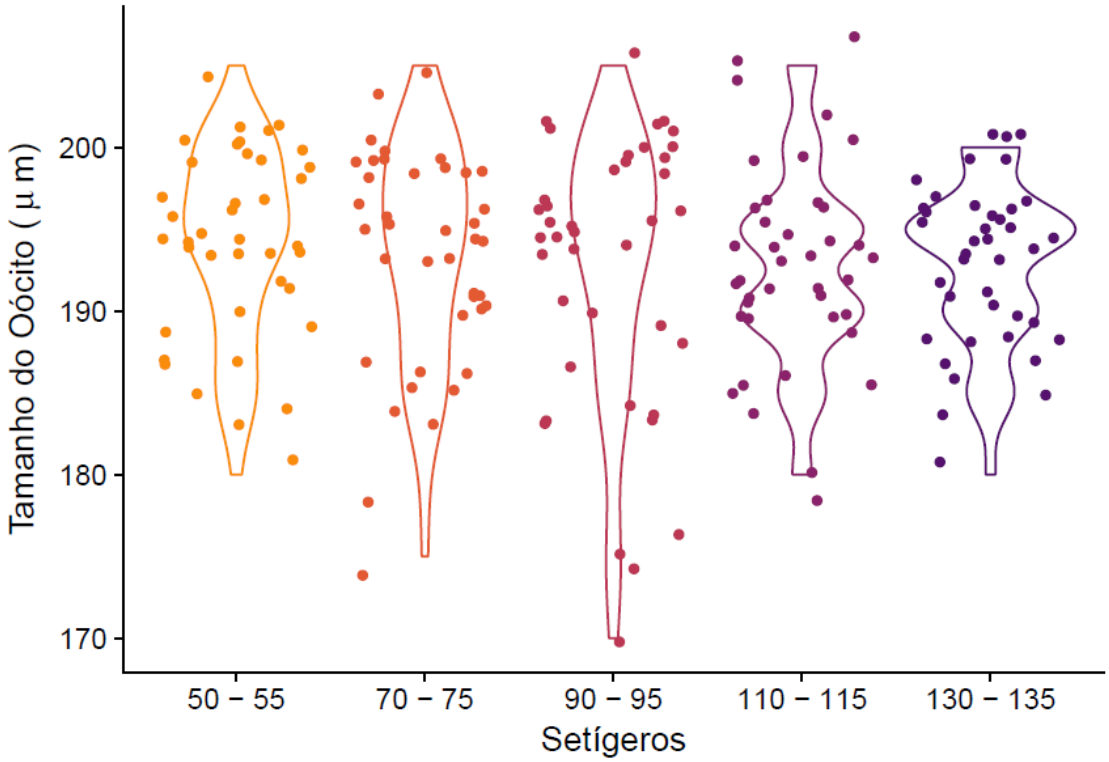

Figura 2.4 Gráficos do tamanho de ovócitos coletados em diferentes setígeros, ao longo de um mesmo indivíduo.

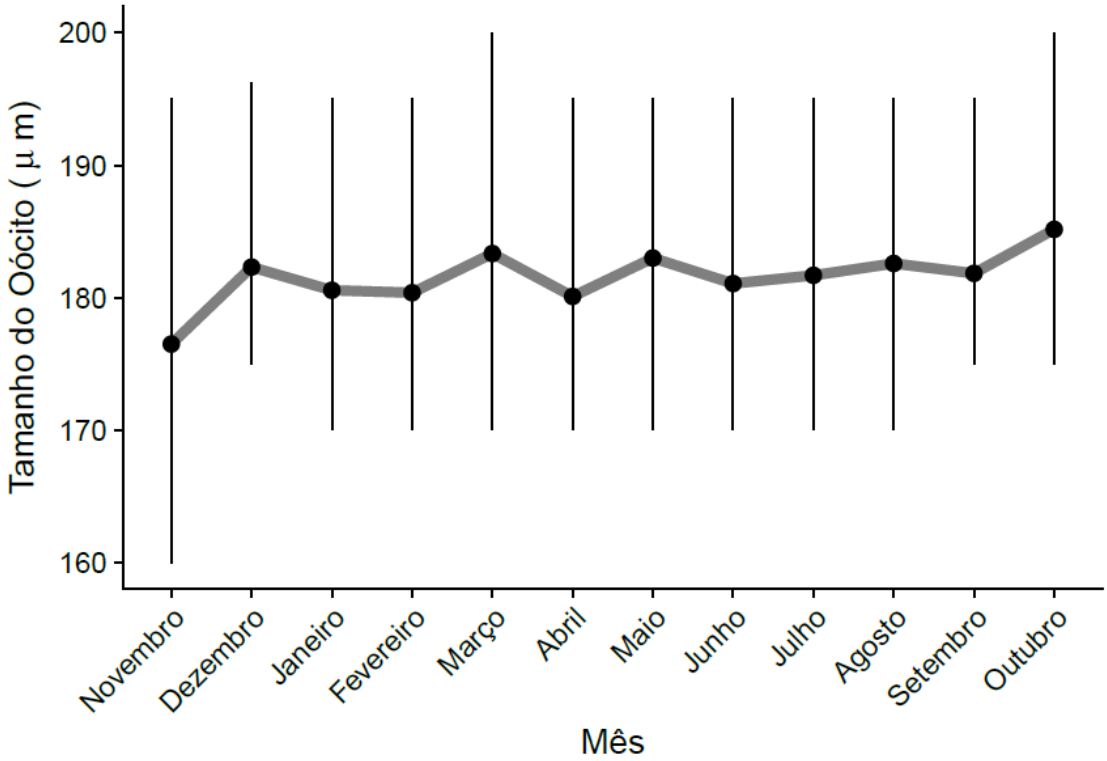

Figura 2.5 Gráfico da média e distância interquartil do tamanho de ovócitos por mês.

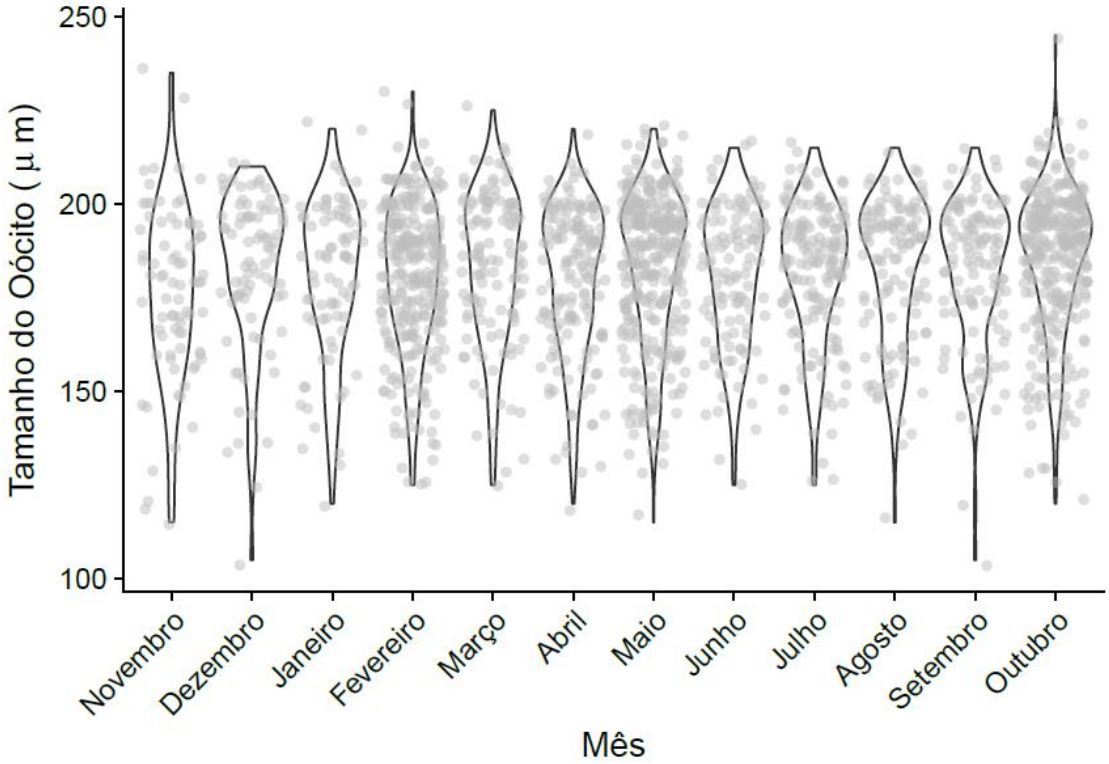

Figura 2.6 Gráficos em violino do tamanho dos ovócitos dos indivíduos por mês.

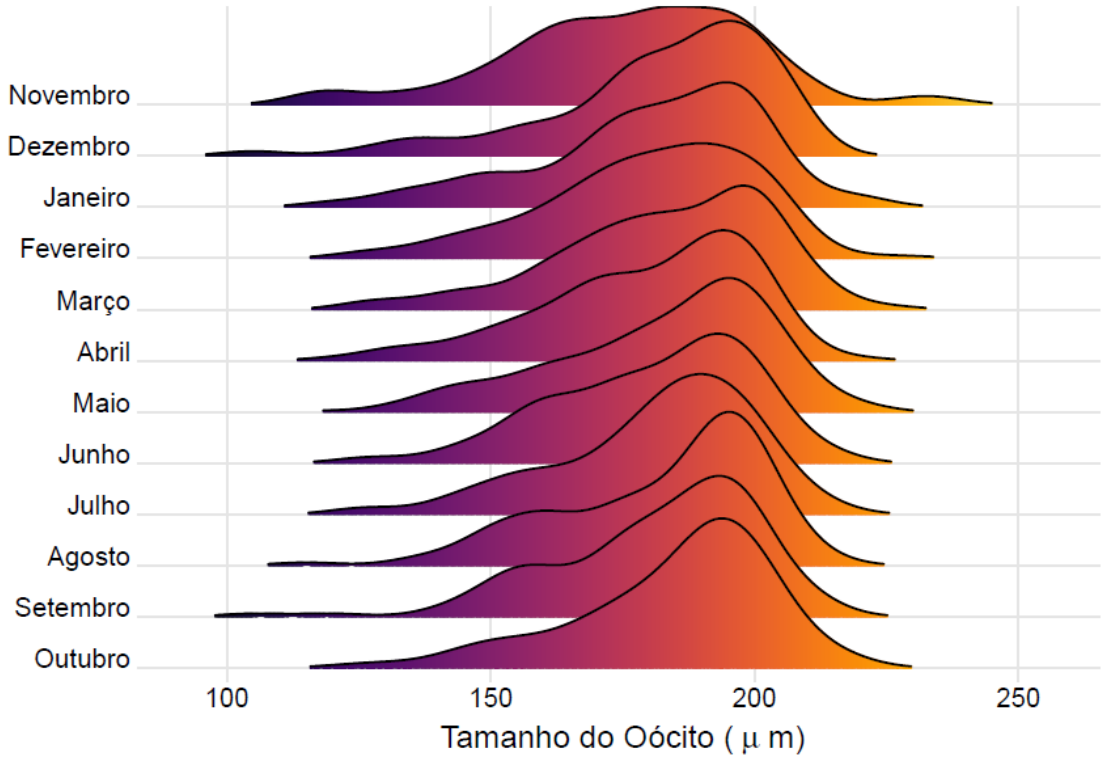

Figura 2.7 Gráficos de densidade do tamanho dos ovócitos dos indivíduos por mês.

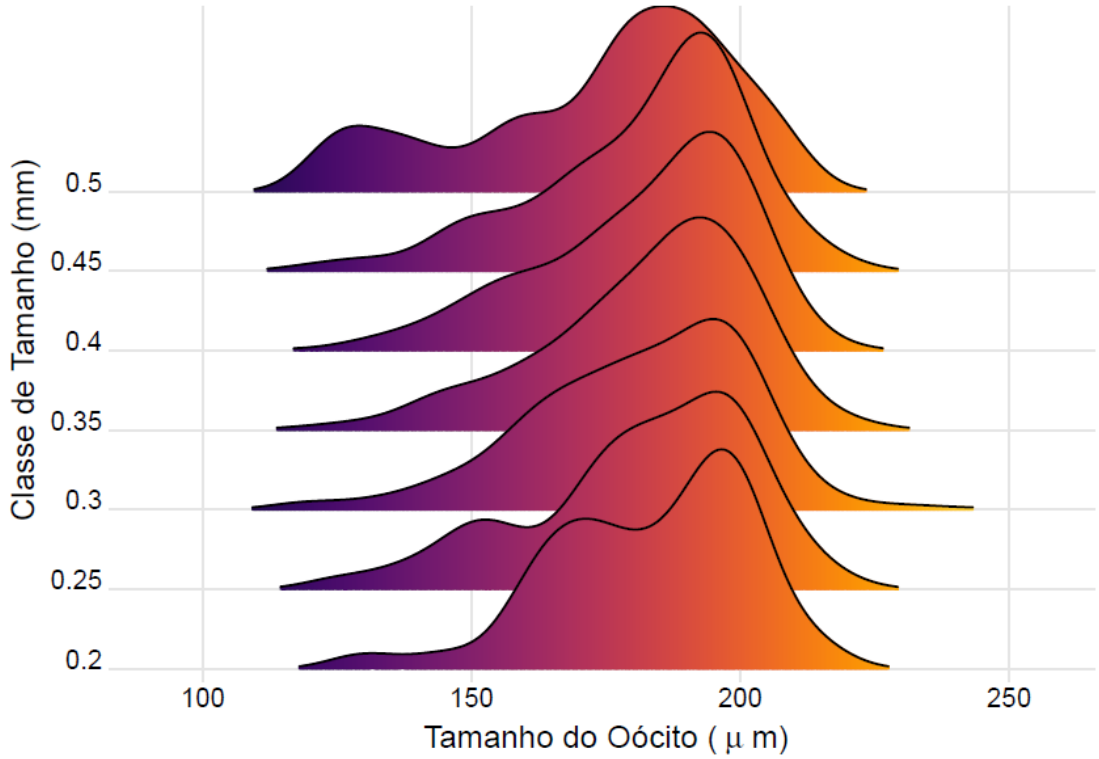

Figura 2.8 Gráficos de densidade do tamanho dos ovócitos dos indivíduos por classe de tamanho.

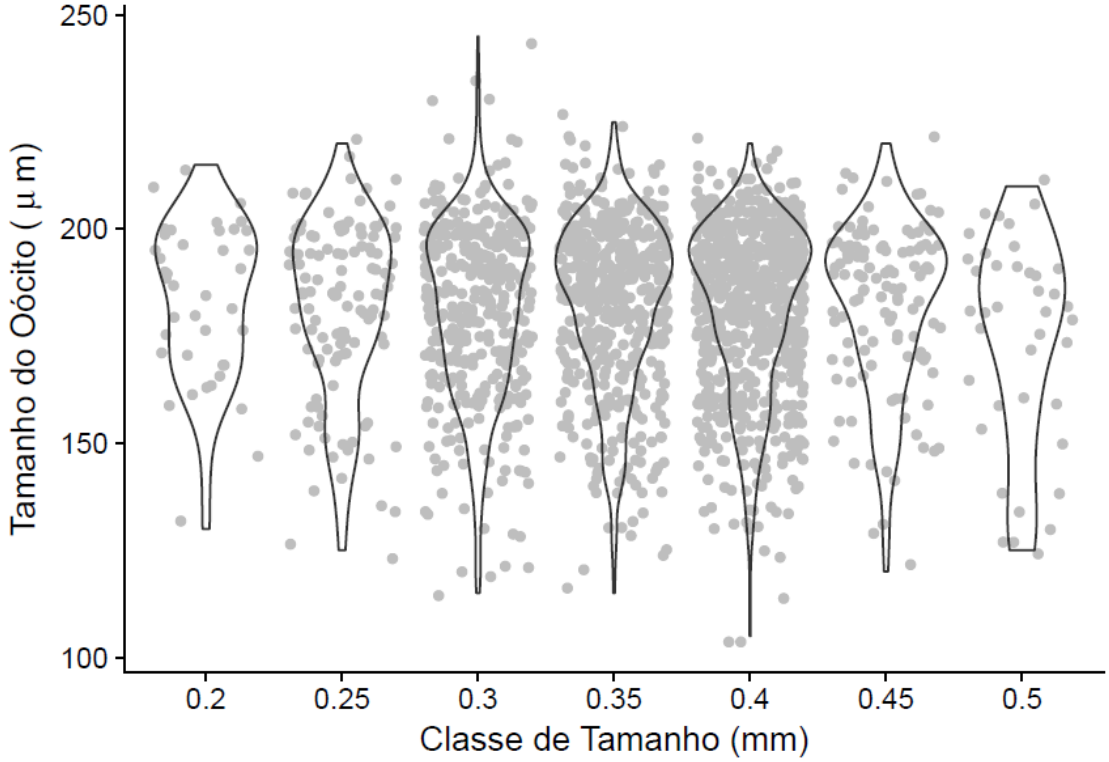

Figura 2.9 Gráficos em violino do tamanho dos ovócitos dos indivíduos por classe de tamanho.

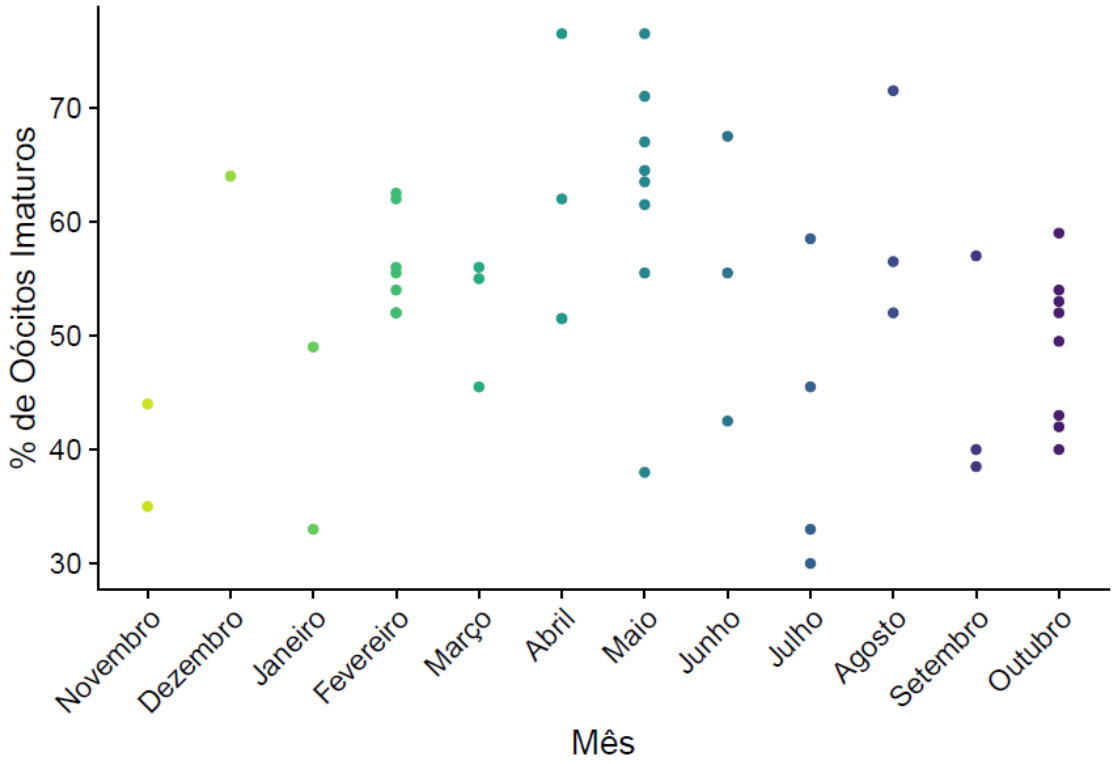

Figura 2.10 Gráfico da porcentagem de gametas imaturos dos indivíduos por mês.

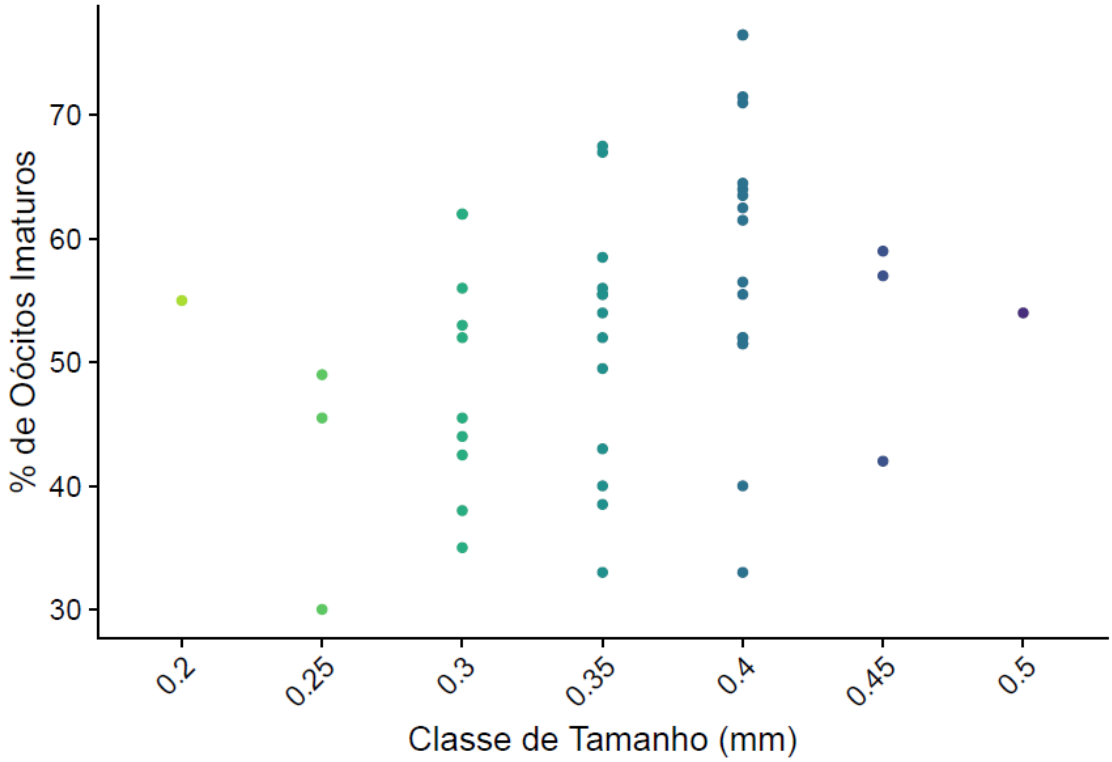

Figura 2.11 Gráfico da porcentagem de gametas imaturos dos indivíduos por classe de tamanho.

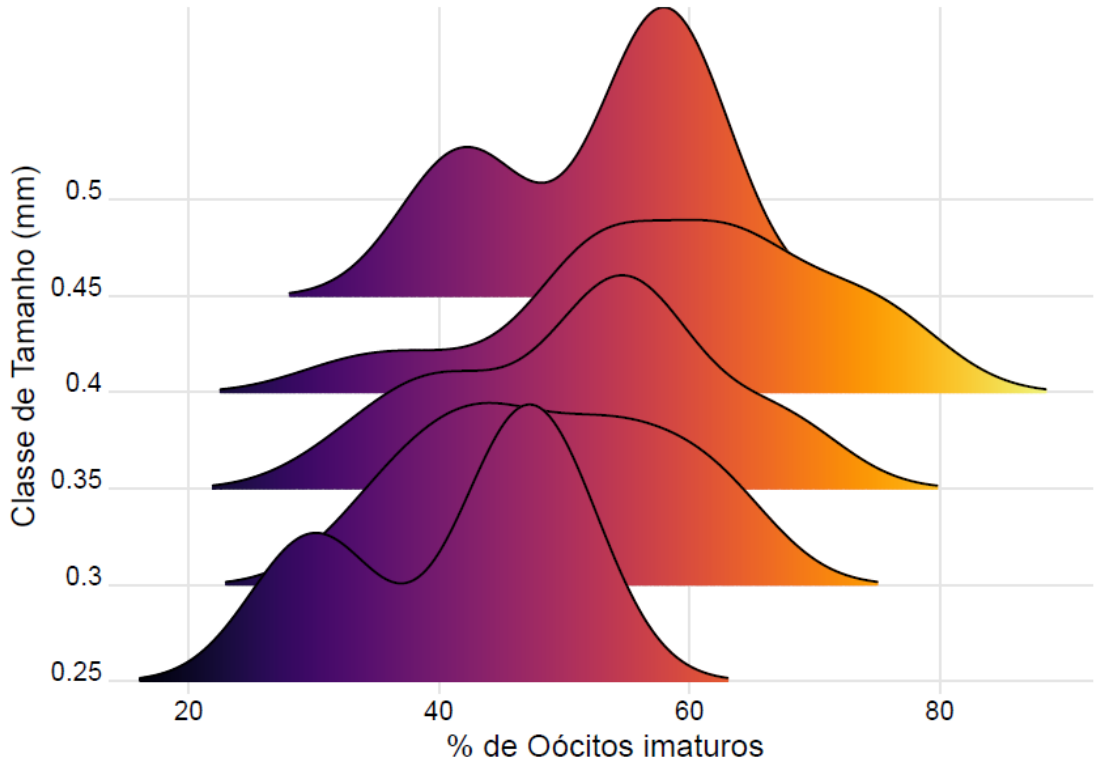

Figura 2.12 Gráficos de densidade da porcentagem de gametas imaturos dos indivíduos por classe de tamanho.

3.3. Espermatogênese

A espermatogênese dos indivíduos de *D. neapolitana* começa com a formação das espermatogônias, a partir do peritônio da parede do corpo. Estas espermatogônias são estruturas elípticas com 25-35 µm de comprimento no maior eixo, formadas por aglomerados de células com ligações citoplasmáticas, organizadas em uma massa central de citoplasma, chamada citóforo (Figuras 2.13a-b, 2.14a-b). Cada espermatogônia se fragmenta em espermatócitos de maneira irregular, cada divisão com aproximadamente 5 µm, mas ainda unidos uns aos outros pelo citóforo (Figuras 2.13c-d, 2.14c-d). Em seguida, as ligações citoplasmáticas vão se tornando menores, as células ficam mais arredondadas e são chamadas de espermátides, ainda unidas pelo citóforo, com tamanho ligeiramente menor, 3–4 µm (Figuras 2.13e-f, 2.14e-f). A partir desse ponto, foram observados dois caminhos da espermiogênese, ambos culminando com a diferenciação das espermátides em espermatozoides. O primeiro destes caminhos é a modificação das espermátides no próprio aglomerado de células, com a porção mais interna das células, o acrossomo, voltada para o centro e diretamente conectada ao citóforo, e, consequentemente, a formação das mitocôndrias e do flagelo na região mais externa (Figuras 2.13e-f, 2.14c, e-f); neste caminho, o espermatozoide é totalmente formado no aglomerado, antes de se desconectar e ficar livre no celoma. No outro método observado, grupos de espermátides se soltam do aglomerado, formando mórulas espermáticas com citóforo central, unindo as espermátides de uma mesma mórula (Figura 2.15e); neste caso, a espermiogênese se dá nas mórulas espermáticas, livres no celoma, e os espermatozoides se individualizam quando todos os de um mesmo grupo estão formados, embora aqui também os acrossomos se formem a partir da região ligada ao citóforo, enquanto mitocôndrias e flagelos derivem da porção mais externa (Figura 2.15a-d).

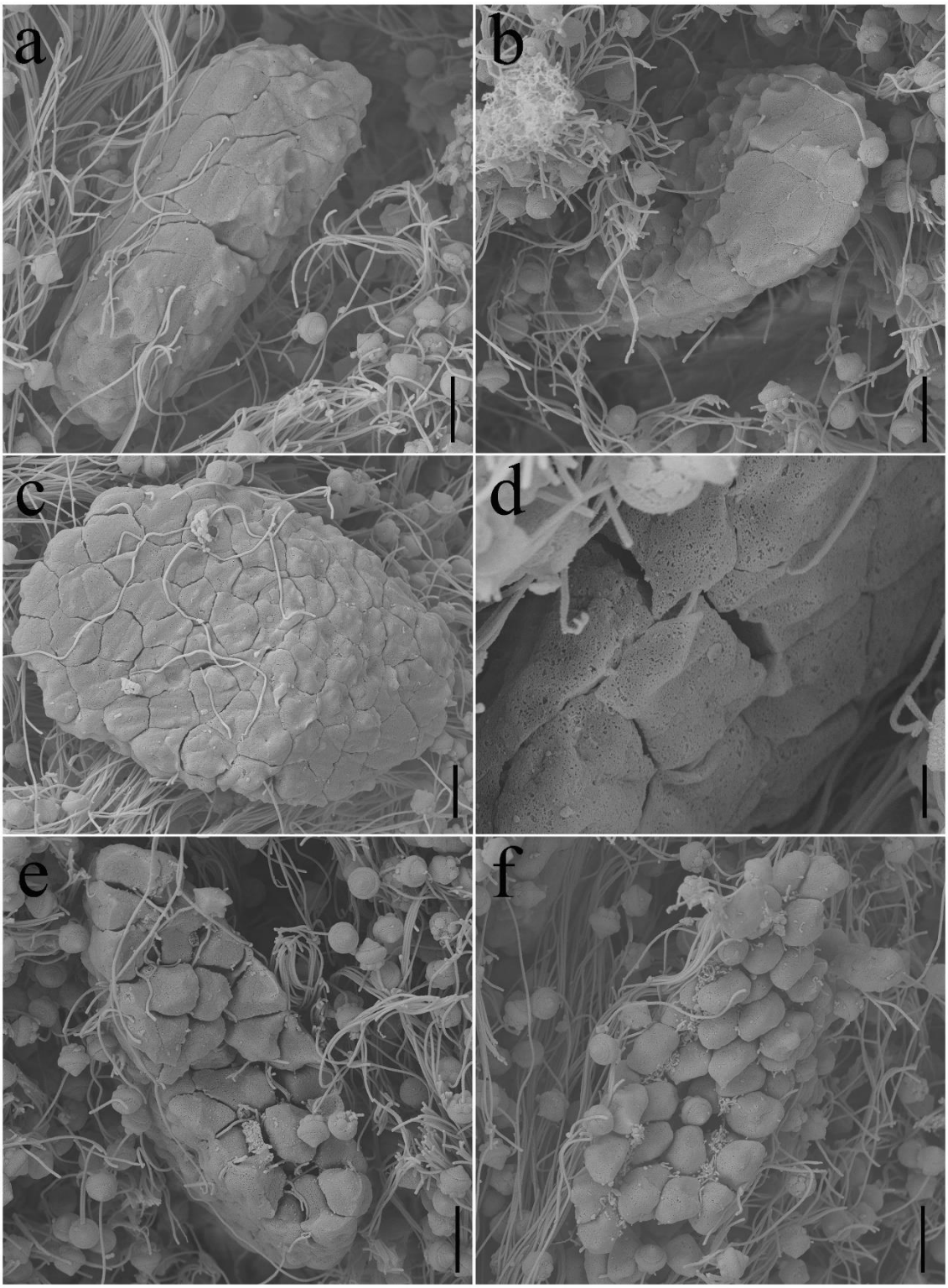

Figura 2.13 Espermatogênese de *D. neapolitana*, em microscópio eletrônico de varredura, observada a partir de cortes do corpo contendo líquido celômico, de indivíduos com gametas masculinos **a-b** espermatogônia liberada no celoma, cercada por espermatozoides; **c-d** espermatócitos unidos pelo citóforo, caracterizados por uma maior delimitação entre as células; **e-f** espermátides unidas pelo citóforo, com espaçamentos entre as células maior e presença de alguns espermatozoides já diferenciados. **Escalas: a-f** 4 µm.

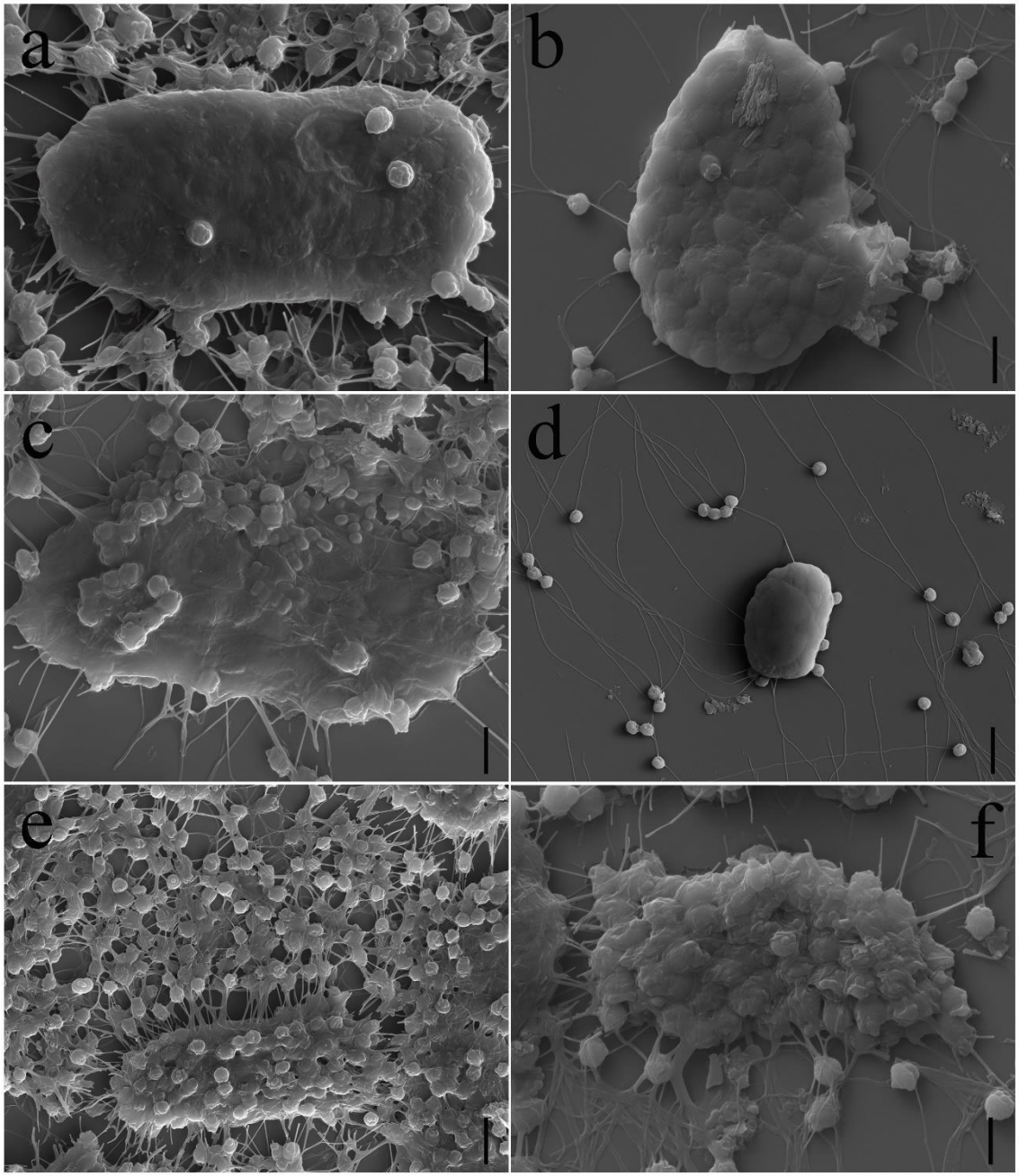

Figura 2.14 Espermatogênese de *D. neapolitana*, em microscópio eletrônico de varredura, observada a partir de citocentrifugação do líquido celômico **a-b** espermatogônia apresentando primórdios de espermatozoides diferenciados; **c-d** espematócitos unidos por citóforo, com maior quantidade de espermatozoides diferenciados, sempre com os flagelos voltados para o exterior; **e-f** espermátides unidas pelo citóforo, com muitos espermatozoides diferenciados na camada mais externa. **Escalas: a-f** 4 µm.

Foram observados celomócitos junto aos espermatozoides e espermátides/mórulas espermáticas, que fagocitam o material residual da gametogênese, ou seja, citóforos, gametas mortos e defeituosos (Figura 2.17a-b). Em alguns indivíduos, foi observado uma quantidade muito grande de celomócitos, compondo praticamente todo o líquido celômico (Figura 2.17c), e nestes casos não havia a presença de gametas.

Os espermatozoides apresentam estrutura morfológica muito semelhante àquela observada por Conti et al (2005) (Figura 2.16), cada um com um acrossomo cônico, simétrico radialmente e liso, com altura de ~0.5 µm e 1 µm de diâmetro na base; na porção mais apical do acrossomo há uma pequena depressão, enquanto a base é delimitada por uma borda (Figura 2.16b-c). O núcleo tem aparência rugosa e formato elipsoidal ou esférico achatado, com diâmetro de ~1.8 µm, portanto 80% maior do que a base do acrossomo, e altura de ~1 µm (Figura 2.16d). As mitocôndrias se encontram imediatamente abaixo da região do núcleo, como 5 unidades esféricas de ~0.5 µm de diâmetro cada, circundando o núcleo; alguns poucos gametas defeituosos apresentavam mais de 5 mitocôndrias. Entre as mitocôndrias encontra-se a inserção do flagelo, rodeada por um anel (Figura 2.16e). A região da cabeça dos espermatozoides apresentava, portanto, ~2 µm de comprimento. Os flagelos são muito longos, com 34-42 µm de comprimento (Figura 2.16f).

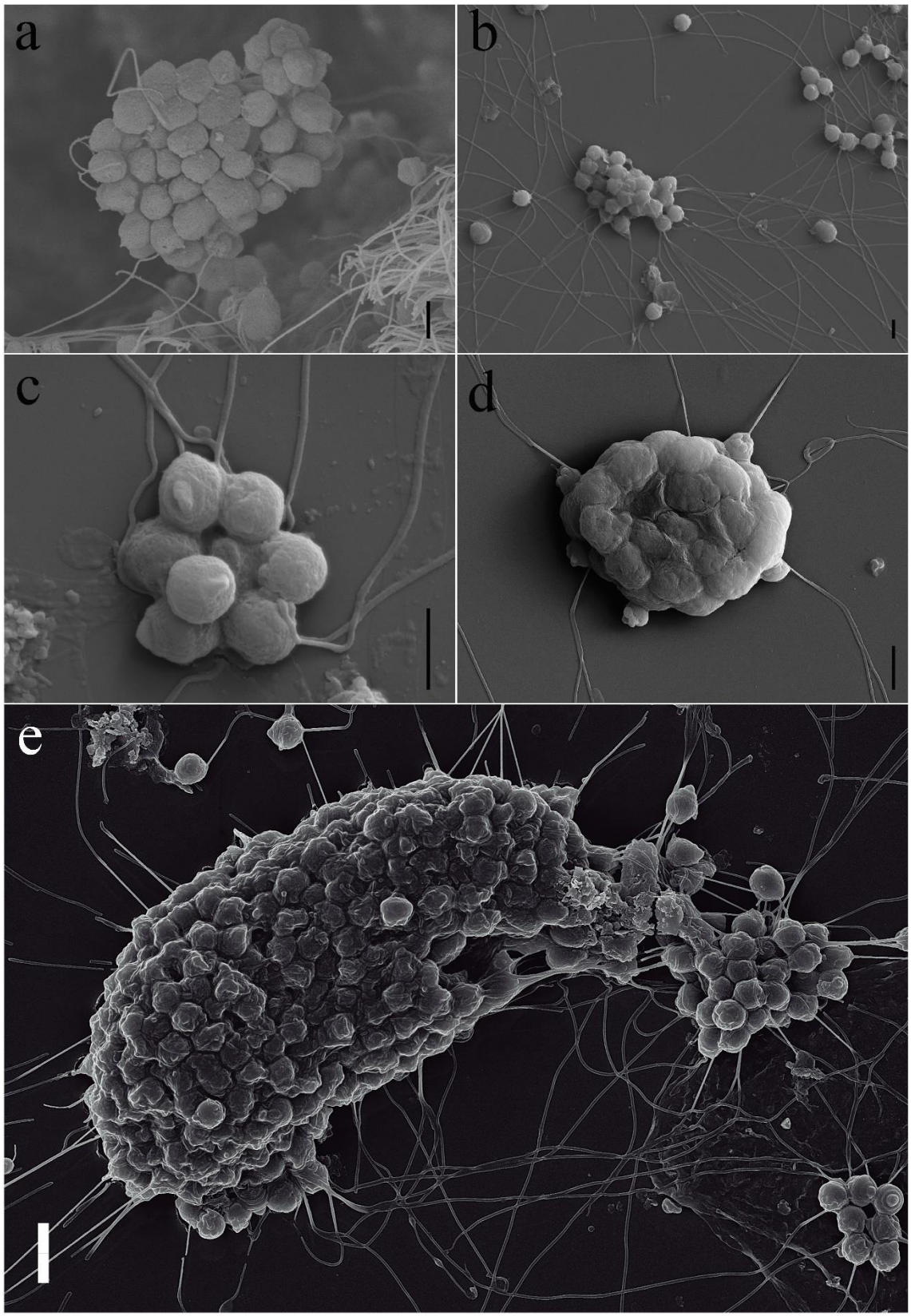

Figura 2.15 Mórulas espermáticas de *D. neapolitana*, em microscópio eletrônico de varredura, observadas a partir de citocentrifugação do líquido celômico **a-d** isoladas do aglomerado original de células, mas ainda com as células unidas entre si pelo citóforo; acrossomos sempre voltados para o interior, onde está o citóforo, e flagelos na porção externa **e** mórula espermática se desprendendo do aglomerado de espermátides. **Escalas: a-d** 2 µm; **e** 4 µm.

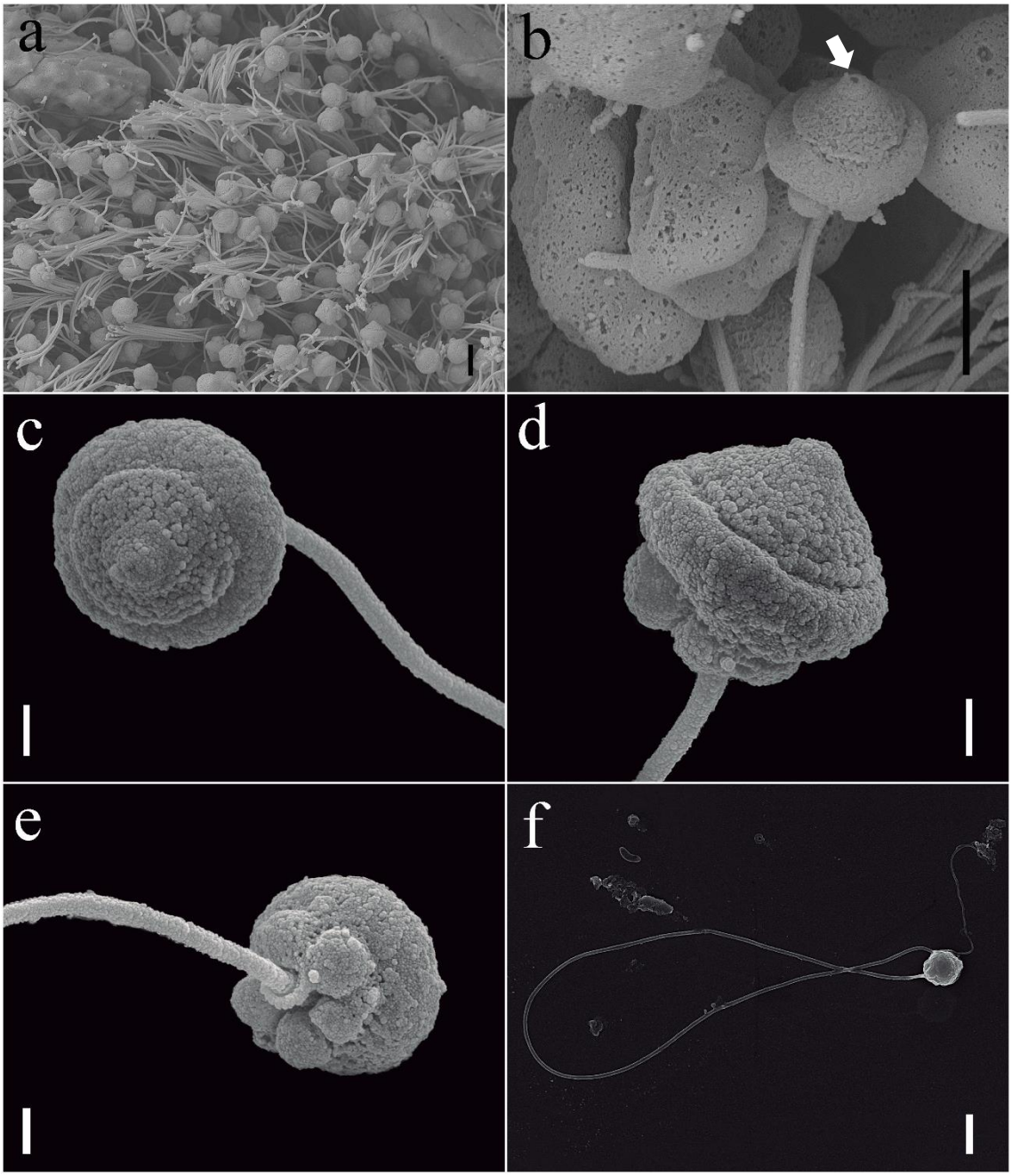

Figura 2.16 Espermatozoides de *D. neapolitana*, em microscópio eletrônico de varredura **a-e** a partir de cortes do corpo; **f** espermatozoides a partir de citocentrifugação do líquido celômico. **a** aglomerado de espermatozoides; **b** espermatozoide próximo a espermátides; seta apontando para depressão apical; **c** visão frontal; **d** visão lateral; **e** visão posterior; **f** espermatozoide inteiro, com flagelo. **Escalas: a, f** 2 µm; **b** 1 µm; **c-e** 400 nm.

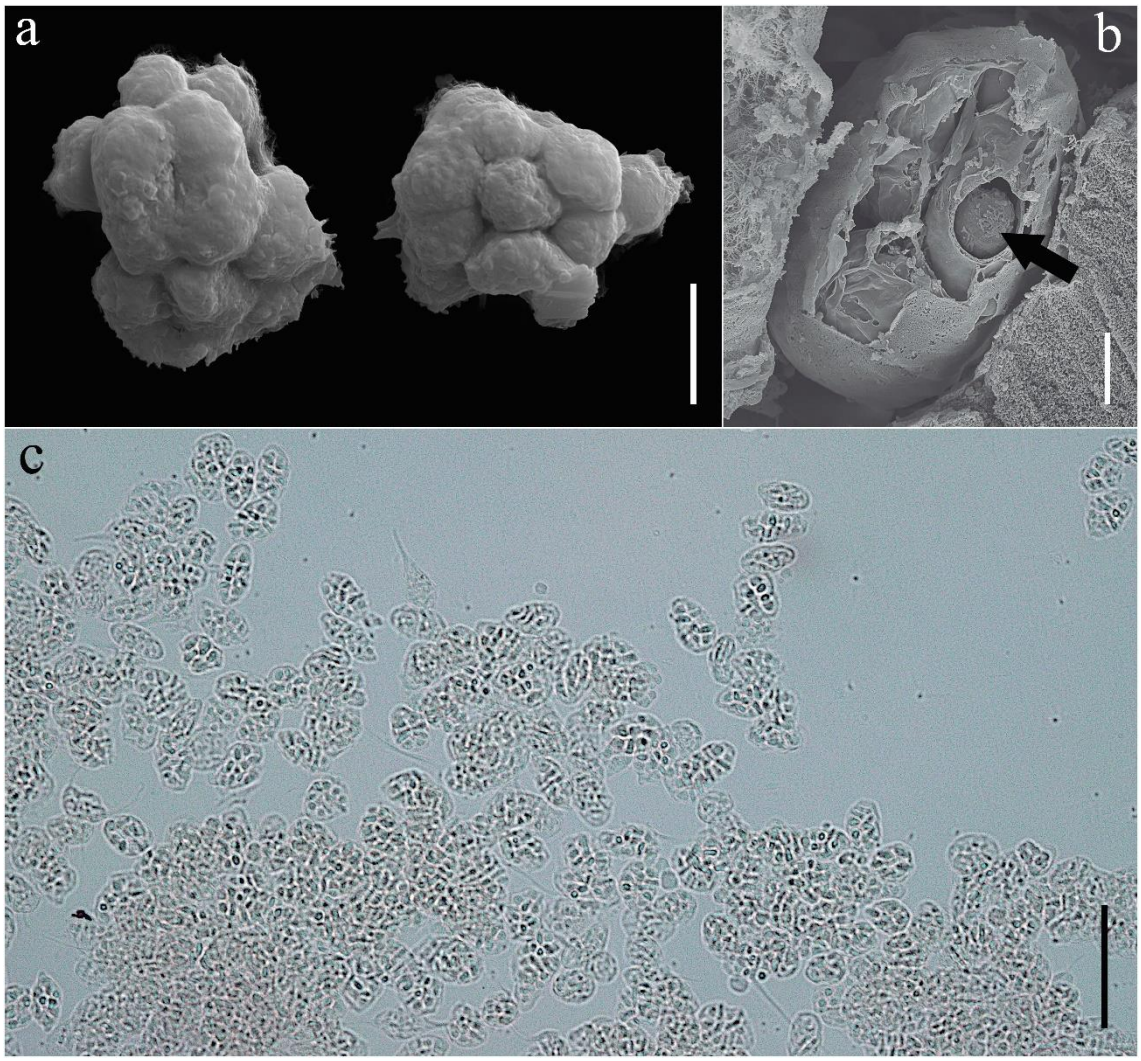

Figura 2.17 Celomócitos de *D. neapolitana* **a** 2 celomócitos em microscópio eletrônico de varredura; **b** celomócito com membrana plasmática danificada, em microscópio eletrônico de varredura; seta apontando para o núcleo; **c** líquido celômico contendo muitos celomócitos em microscópio óptico. **Escalas: a** 10 µm; **b** 4 µm; **c** 50 µm.

3.4. Dimorfismo sexual

Para as análises de dimorfismo sexual foram excluídos indivíduos sem gametas no celoma, seja pelo estágio de desenvolvimento, ou pelo comprimento dos animais. Foram analisados 128 indivíduos, com exemplares de todos os meses coletados. Desse total, 71 indivíduos apresentaram gametas masculinos e 57, gametas femininos; esses valores se referem à quantidade majoritária dos gametas no celoma, após a região

branquial. Os menores indivíduos com gametas masculinos mediam 2.9 cm de comprimento, até o setígero 40, e 1.5 mm de largura, ao nível do setígero 10, enquanto menores indivíduos com gametas femininos mediam 2.8 cm e 2.5 mm, respectivamente; é importante declarar que, em ambos os casos, os menores valores de cada medida (comprimento e largura) não correspondem ao mesmo espécime, ou seja, o menor espécime não era também o mais fino. Seguindo os mesmos parâmetros, os maiores indivíduos com gametas masculinos mediam 4.9 cm de comprimento e 4 mm de largura, enquanto os maiores espécimes com gametas femininos mediam 5.2 cm de comprimento e 5 mm de largura.

Em relação às papilas espermoducais dorsais, foram encontrados indivíduos sem papilas, com papilas semelhantes àquelas observadas por Arias et al. (2016) (aqui tratadas como "bem desenvolvidas") e menos desenvolvidas (= "mal desenvolvidas"). Papilas mal desenvolvidas não apresentam delimitação clara, enquanto as bem desenvolvidas as têm e são mais robustas (Figura 2.18a–c). O início das papilas bem desenvolvidas é entre os setígeros 6-11, variando entre os indivíduos, e a quantidade de papilas ao longo do corpo varia de 3-31 pares. O começo das papilas mal desenvolvidas é entre os setígeros 6-15 e a quantidade ao longo do corpo, de 5-31 pares. Em alguns indivíduos, os primeiros segmentos apresentam papilas bem desenvolvidas, enquanto os posteriores as têm mal desenvolvidas.

O azul de metileno não cora as papilas espermoducais, mas sim a pigmentação dorsal, evidenciando as papilas pelo contraste (Figura 2.18d–f). Tal contraste também foi evidente em indivíduos sem papilas, se assemelhando àqueles com papilas mal desenvolvidas, o que parece indicar que as papilas estão sempre presentes, apenas em diferentes graus de desenvolvimento. O canal espermoducal é corado pelo azul de metileno, nas papilas bem desenvolvidas.

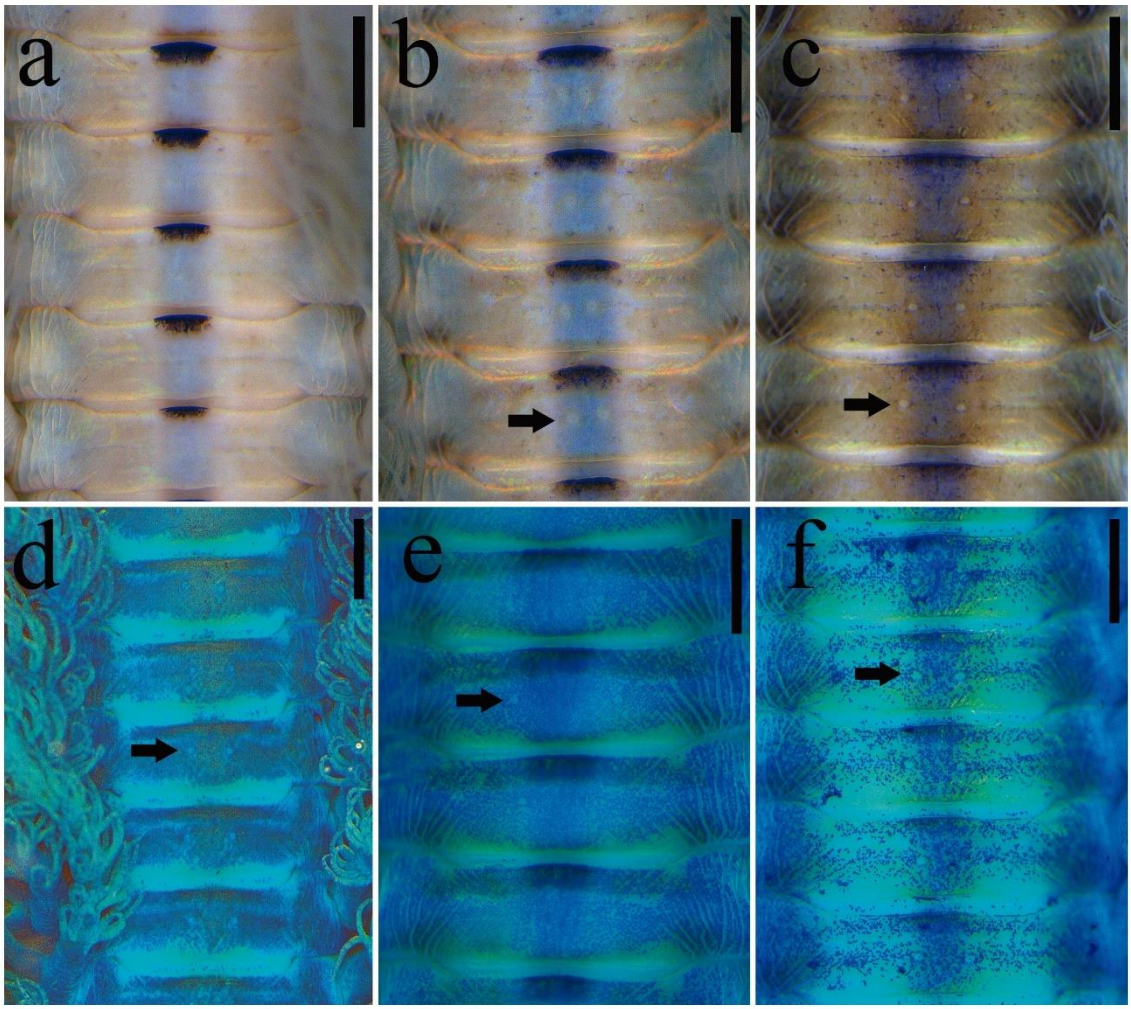

Figura 2.18 *Diopatra neapolitana* vista dorsal na região dos setígeros 5-10, em microscópio estereoscópico **a–c** indivíduos não corados; **d–f** indivíduos corados com azul de metileno; **a, d** indivíduo sem papilas espermoducais; **b, e** indivíduo com papilas espermoducais mal desenvolvidas; **c, f** indivíduo com papílas espermoducais bem desenvolvidas. Setas apontam para as papilas espermoducais. Barras de escala **a–f** = 1 mm.

Imagens de MEV permitem visualização detalhada do canal espermoducal (Figura 2.19a, c), porém não é possível diferenciar claramente papilas bem e mal desenvolvidas (Figura 2.19a-d). Foram encontrados resquícios de líquido celômico no canal espermoducal, sem gametas. Também não foram encontrados gametas nas papilas, quando estas foram perfuradas (Figura 2.19e).

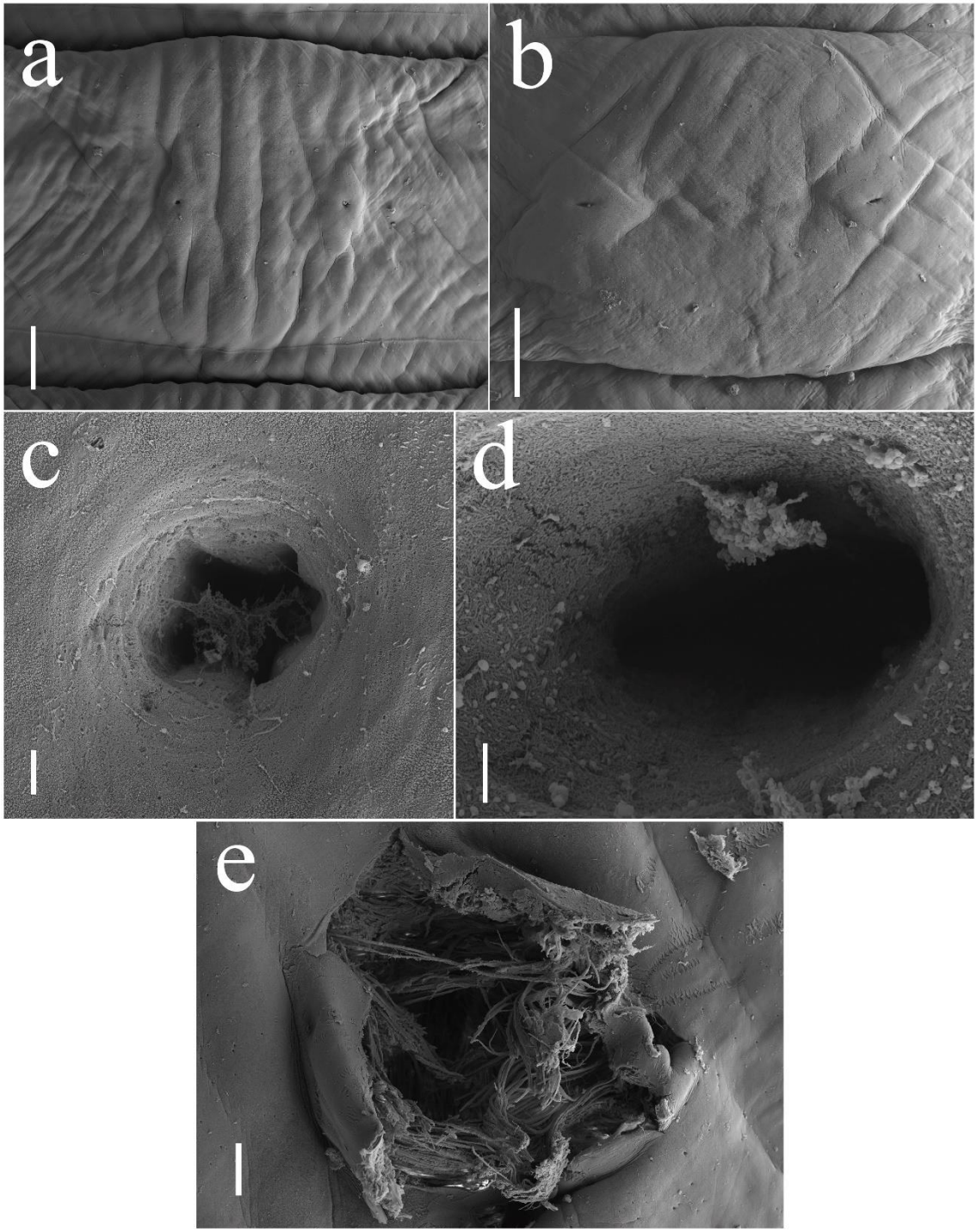

Figura 2.19 *Diopatra neapolitana*, em microscópio eletrônico de varredura, região das papilas espermoducais **a, c, e** indivíduo com papilas bem desenvolvidas (previamente observadas sob microscópio estereoscópico); **b, d** indivíduo com papilas mal desenvolvidas (idem); **a–b** setígero 15, com par de papilas visíveis; **c–d** poros dos dutos espermoducais; **e** papila perfurada. Barras de escala **a–b** = 200 µm; **c** = 4 µm; **d** = 2 µm; **e** = 40 µm.

Considerando primeiramente os indivíduos com gametas masculinos como machos e aqueles com gametas femininos como fêmeas, foram feitos gráficos

correlacionando a porcentagem de cada gênero nas classes de tamanho (C40 e L10), em cada mês de coleta. Os resultados são semelhantes, tanto em comprimento, quanto em largura, com uma maior porcentagem de machos nas classes de menor tamanho, aumentando progressivamente a porcentagem de fêmeas, que dominam nas classes de maior tamanho (Figuras 2.20, 2.21). As coletas do outono e primavera foram caracterizadas pela maior proporção de fêmeas, sendo Maio o mês mais discrepante, com 69,23% de fêmeas; nas estações do inverno e verão, os machos foram mais abundantes, com o ápice de 76,92% de machos em Julho (Figura 2.22).

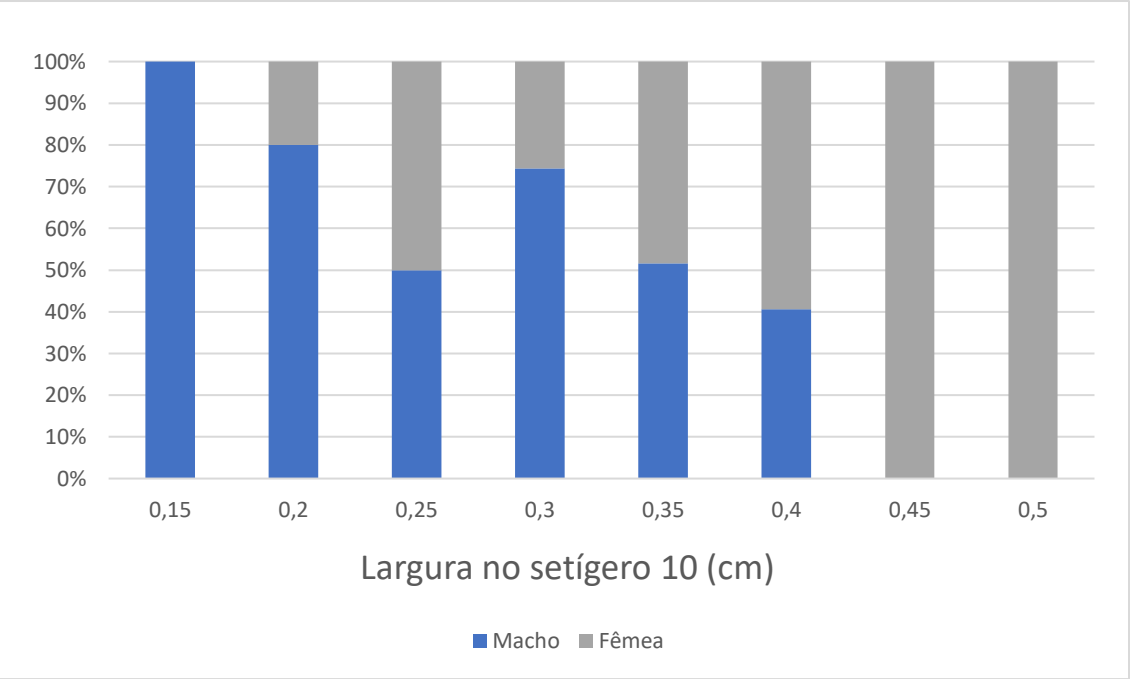

Figura 2.20 Gráfico da porcentagem de indivíduos dos gêneros sexuais por classe de tamanho (L10), considerando gonocorismo.

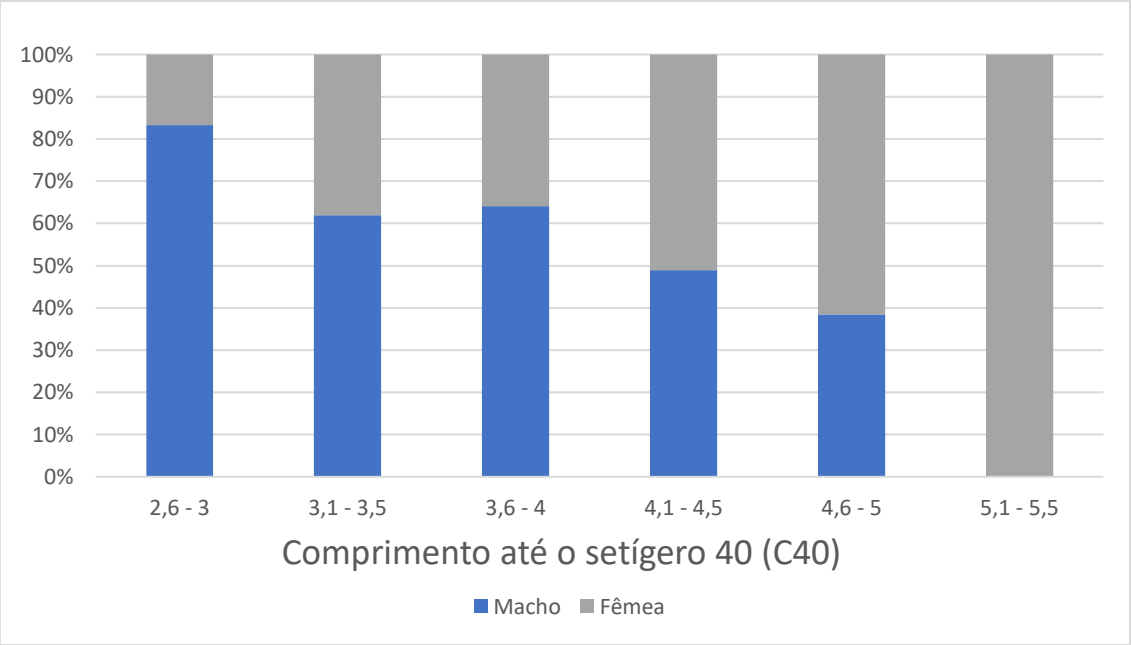

Figura 2.21 Gráfico da porcentagem de indivíduos dos gêneros sexuais por classe de tamanho (C40), considerando gonocorismo.

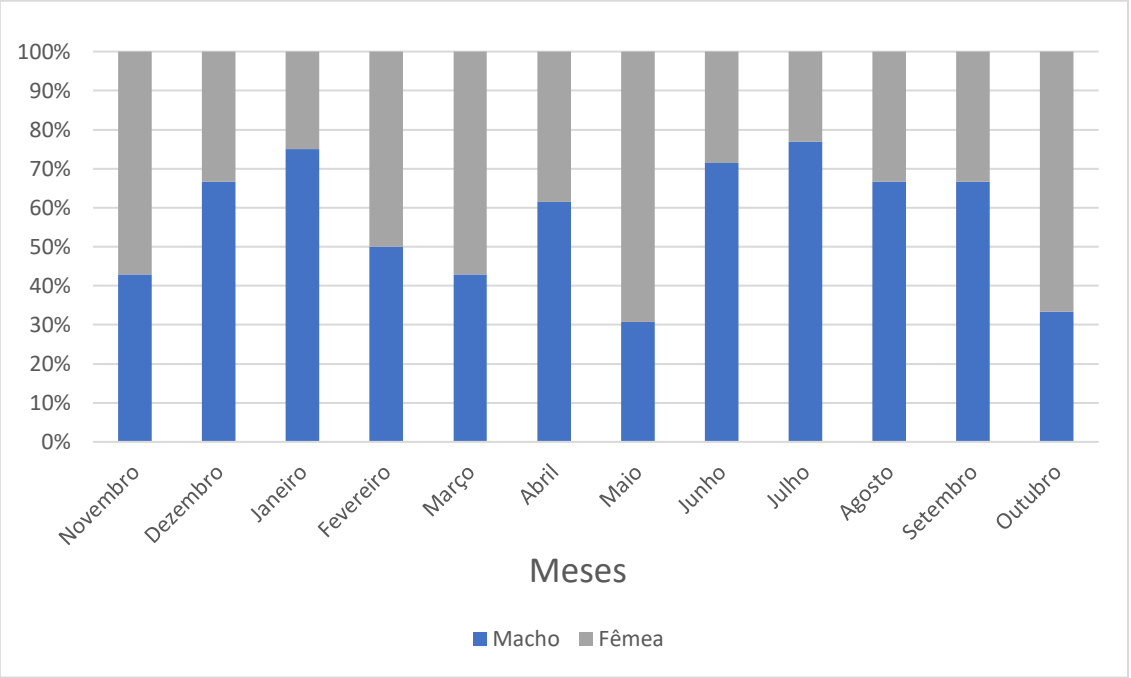

Figura 2.22 Gráfico da porcentagem de indivíduos dos gêneros sexuais ao longo do ano, considerando gonocorismo.

Incluindo os hermafroditas como um terceiro gênero na análise dos mesmos animais, a primeira hipótese foi a de que os animais com papilas bem desenvolvidas são

hermafroditas, independente dos gametas, aqueles sem papilas ou com elas mal desenvolvidas, são machos, quando apresentam apenas gametas masculinos, e fêmeas quando apresentam apenas gametas femininos no celoma. Os resultados relacionados às classes de tamanho (C40 e L10) continuam semelhantes, com uma maior porcentagem de machos nas menores classes de tamanho e de fêmeas nas de tamanho maior. Os hermafroditas não são dominantes em nenhuma classe de tamanho, embora a sua proporção aumente com o tamanho dos animais (Figura 2.23, 2.24). Os machos foram dominantes em Agosto e Setembro, 58,33 % em ambos os meses, os hermafroditas foram mais abundantes em Abril (61,54 %) e as fêmeas, em Dezembro (66,67 %) (Figura 2.25). Fica claro que os machos são mais frequentes durante o inverno e as fêmeas, no final da primavera, não havendo, entretanto, padrões bem definidos para os hermafroditas.

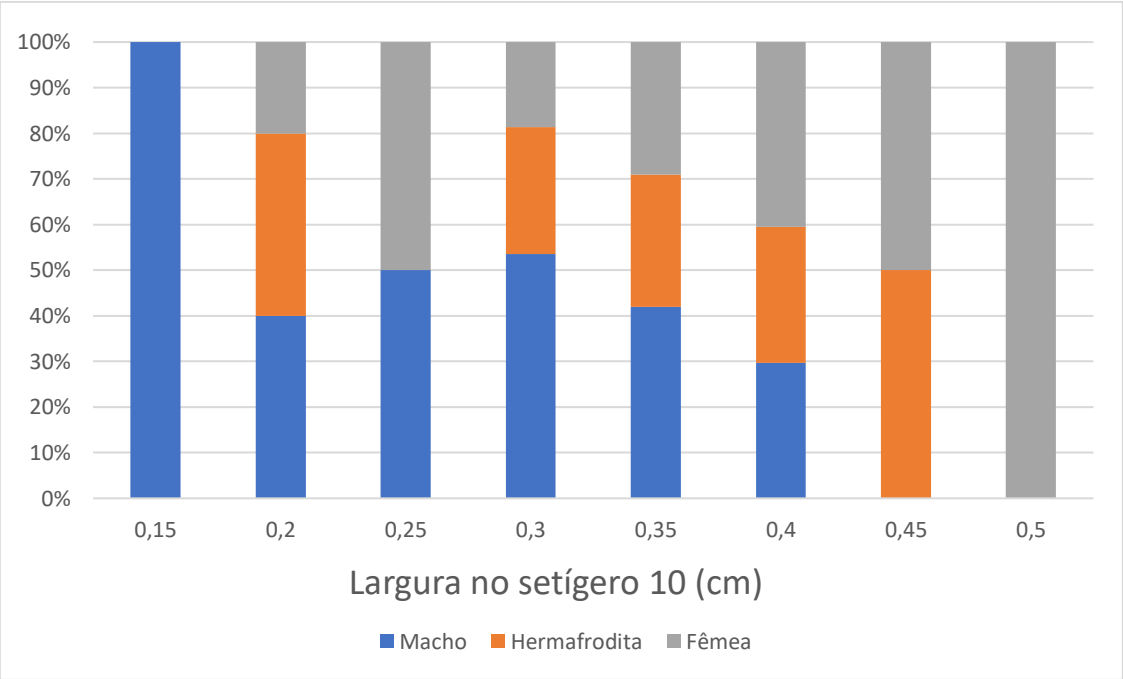

Figura 2.23 Gráfico da porcentagem de indivíduos dos gêneros sexuais por classe de tamanho (L10), considerando hermafroditismo.

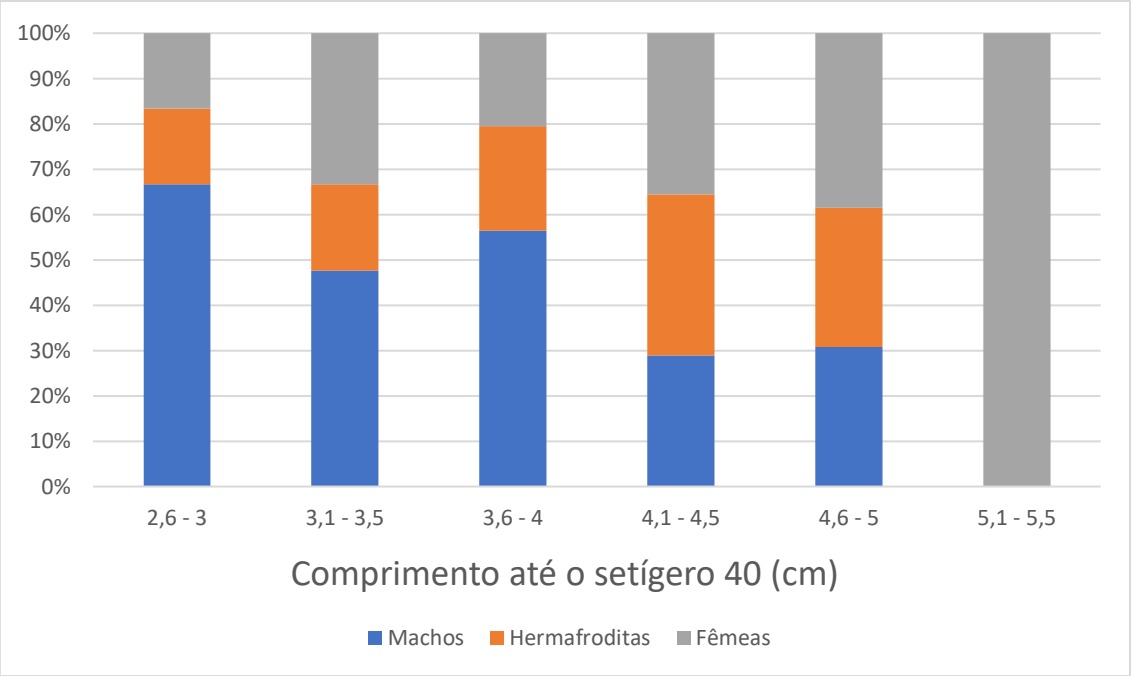

Figura 2.24 Gráfico da porcentagem de indivíduos dos gêneros sexuais por classe de tamanho (C40), considerando hermafroditismo.

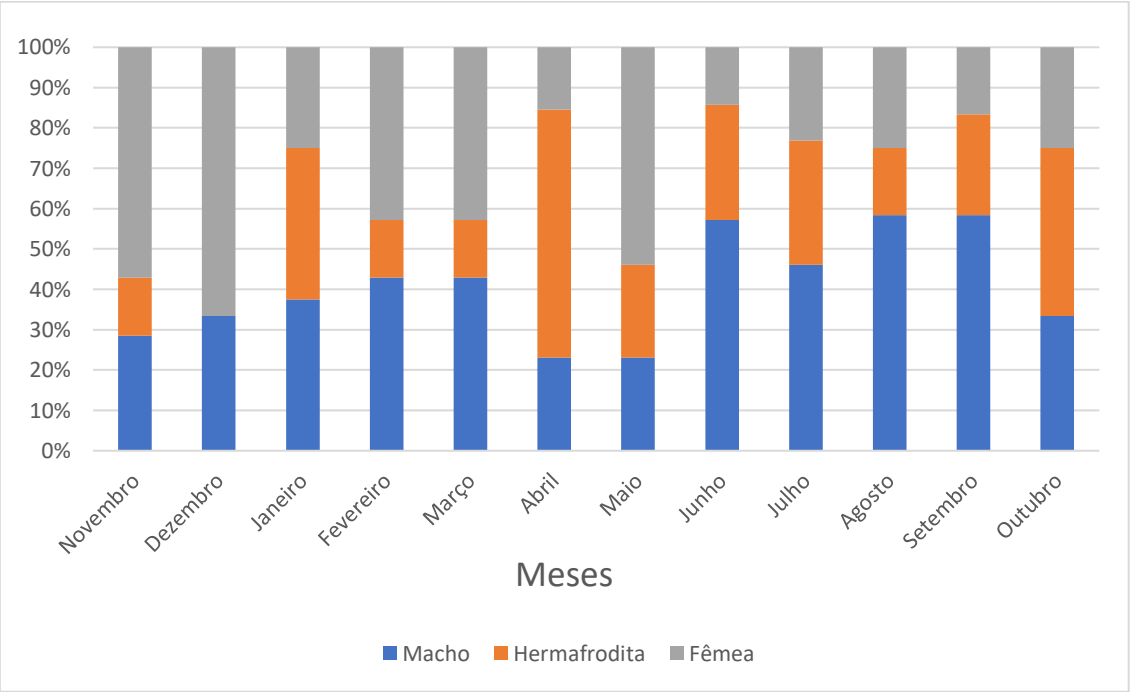

Figura 2.25 Gráfico da porcentagem de indivíduos dos gêneros sexuais ao longo do ano, considerando hermafroditismo.

4. Discussão e Conclusões

4.1. Fragmentação e regeneração

A população de animais de *D. neapolitana* da Baía do Araçá é caracterizada pela maioria dos indivíduos apresentaram corpo incompleto, normalmente com a porção posterior ausente, característica comum em espécies que apresentam reprodução assexuada, incluindo aquelas espécies invasoras (Pearse, 1975; Rouse e Pleijel, 2006). Pires et al. (2012a) demonstraram o grande potencial de regeneração de animais desta espécie, porém os autores notaram que os indivíduos partidos nunca regeneram ambas as partes, sobrevivendo apenas uma porção do animal, com exceção de um local, que se partido, as duas partes morrem, portanto a reprodução assexuada não é viável. Ainda de acordo com Pires et al. (2012a), indivíduos partidos antes do final da região branquial (setígeros 45–55) têm menor taxa de sobrevivência, reforçando o que foi observado no presente estudo, no qual não foi encontrado nenhum indivíduo com menos de 40 setígeros, ao longo do ano de coletas. Ainda assim, pelo menos aparentemente, não há explicação plausível para a maior porcentagem de indivíduos partidos entre os setígeros 60–69 (Figura 2.2).

Em coletas teste anteriores ao início deste estudo, foi observada a autotomia de porções posteriores do corpo, durante a retirada dos animais dos tubos sem anestesia, tendo isto sido relacionado a um mecanismo de estresse ou a uma possível defesa à predação, uma vez que a porção partida se movimentava no tubo em sentido contrário ao do indivíduo, podendo iludir um possível predador, enquanto a parte anterior do corpo

fugia em direção oposta. Por esta razão, durante o ano de coletas, os animais foram sempre anestesiados em solução de cloreto de magnésio, isotônica à água do mar, antes da extração dos tubos, evitando a autotomia.

Porém, o mesmo comportamento de liberar a porção posterior do corpo foi registrado durante o cultivo dos animais vivos (Capítulo 3 desta Dissertação), sem que houvesse qualquer risco de predação. Neste caso, a porção autotomizada abandonou o tubo do animal e se locomoveu pelo substrato até próximo da abertura do tubo de outro indivíduo, de maneira que o comportamento em questão foi então associado a um método reprodutivo, uma vez que as porções posteriores dos animais possuem grande quantidade de gametas. Fragmentos autotomizados foram analisados sob microscópio estereoscópico (Figura 2.3e) e foi verificado que, além da capacidade motora, os fragmentos respondiam a estímulos luminosos com contrações musculares, talvez devido ao fato de a porção mais distal dos cirros dorsais dos fragmentos apresentarem pigmentação escura, possivelmente fotossensível. Os fragmentos também apresentavam os ganchos subaciculares mais protraídos, possivelmente auxiliando na locomoção, muitos espermatozoides no celoma e controle sobre a contração e relaxamento na musculatura circular mais distal em ambas as extremidades, permitindo a liberação do líquido celômico. Por fim, os fragmentos se mantiveram ativos por 2 dias em água do mar, enquanto, em pedaços partidos durante as coletas, a movimentação sessava após poucas horas. Portanto, a autotomia de pedaços posteriores do corpo em indivíduos de *D. neapolitana* pode estar relacionada à reprodução, mas os dados obtidos ainda não são conclusivos. Alguns fragmentos foram preservados e serão estudadas a pigmentação dos cirros dorsais e a estrutura do corpo, num futuro próximo.

Nos animais partidos, a ruptura do corpo ocorre ao final de algum setígero e a musculatura circular se contrai na extremidade distal, cerrando o corpo ao redor do

intestino (Figura 2.3a-b), ou a ruptura é irregular (Figura 2.3c-d). O primeiro modo provavelmente está relacionado a autotomia e o segundo, a danos físicos, decorrentes da própria coleta.

4.2. Análise do ciclo reprodutivo anual

Os gametas femininos foram sempre retirados de uma mesma região do corpo dos espécimes, visando padronização, mas também foram feitos experimentos analisando gametas ao longo do corpo de um mesmo individuo, para testar se havia diferenças no grau de maturação e quantidade de gametas por setígero entre regiões. Isto poderia estar relacionado a maturação ou liberação de gametas diferenciadas entre as regiões do corpo, mas não foram observadas diferenças significativas, como esperado para uma espécie com ovogênese assíncrona (Arias et al., 2016).

Num primeiro momento, o foco principal, para entender o ciclo reprodutivo da população de *D. neapolitana* estudada, era a comparação entre os tamanhos dos ovócitos (calculados a partir do diâmetro) ao longo do um ano de coletas. Considerando os trabalhos existentes sobre o ciclo de vida dos animais dessa espécie, era esperada uma transcrição para o hemisfério sul do ciclo reprodutivo já verificado em populações do hemisfério norte (Cunha et al., 2005; Dagli et al., 2005; Pires et al., 2012b; Arias et al., 2016), mantendo as características conhecidas para cada estação do ano. Isto significaria uma fase de proliferação e crescimento dos gametas no outono e inverno, com gametas imaturos e progressivamente maiores ao longo dos meses, e ovócitos já maduros, porém pequenos, no inverno. Posteriormente, uma fase de maturação e desova da primavera até a metade do verão, caracterizada pela presença de poucos ovócitos imaturos no começo

da primavera e apenas ovócitos maduros a parir do final desta, com tamanhos progressivamente maiores ao longo dos meses. Por fim, uma fase de repouso na segunda metade do verão, caracterizada pela ausência de gametas femininos nos indivíduos.

O presente estudo, entretanto, teve resultados diferentes do esperado, baseado na bibliografia. Em todos os meses do ano foi encontrado, no mínimo, um exemplar com gametas femininos maduros e imaturos no celoma; além disso, não houve qualquer aumento significativo no tamanho dos ovócitos maduros ao longo dos meses. Portanto, para os indivíduos da população de *D. neapolitana* da Baía do Araçá, não há fase de repouso e as demais fases definidas para outras localidades não são bem estabelecidas aqui; a proliferação de gametas femininos, maturação e desova parecem ocorrer simultaneamente em cada espécime, ao longo de todo o ano. Como mostrado na Figura 2.7, a distribuição dos ovócitos por tamanho é muito semelhante em todos os meses analisados; a Figura 2.6 mostra resultados semelhantes, mas na forma de gráfico de violino, que permite analisar melhor a quantidade de ovócitos amostrados, reflexo da diferença no número de indivíduos com gametas femininos em cada mês.

Assim, outras formas de explicar o ciclo reprodutivo destes animais se tornaram necessárias. Os indivíduos com gametas femininos foram, então, agrupados em classes de tamanho, definidas pela largura do corpo na altura do setígero 10, e o tamanho dos ovócitos foi comparado entre estas classes. Isto foi feito no intuito de verificar se as fases da reprodução são definidas em função do tamanho dos exemplares na população estudada, independentemente da época do ano. Os resultados encontrados, todavia, permitem afirmar que não existe tal relação, pois a distribuição dos tamanhos dos gametas é muito semelhante, para todas as classes de largura dos espécimes (Figura 2.8); consequentemente, estas distribuições também são muito semelhantes às distribuições por mês, não havendo diferenças significativas entre classes de tamanho dos animais. Os

mesmos dados, montados num gráfico em violino (Figura 2.9), demonstram que a maioria dos animais com gametas femininos se concentra nas classes 0.3, 0.35 e 0.4 mm de largura no setígero 10, caracterizando uma distribuição normal.

Assim, o diâmetro dos ovócitos maduros se mostrou insuficiente para definir o ciclo de vida dos indivíduos estudados. É importante apontar que o presente trabalho optou por medir apenas os gametas maduros (acima de 100 µm) nas análises apresentadas, pois a presença de gametas imaturos em todos os meses apontava para uma fase de proliferação contínua, de maneira que o foco passou a ser entender a maturação e a desova dos gametas.

Selim et al. (2005) estudaram populações do serpulídeo *Spirobranchus tetraceros*, que também possui ovogênese assíncrona. Nesses animais, o celoma não se esvaziava por inteiro após a liberação dos gametas, mantendo ainda os gametas femininos imaturos, o que possibilitava inferir os picos reprodutivos da espécie.

Com isso em mente, a comparação entre a porcentagem de gametas femininos maduros e imaturos se mostrou importante. Neste estudo, a porcentagem de gametas imaturos ao longo dos meses também não apresentou diferenças significativas, apesar de ocorrer um pico nas porcentagens de Abril e Maio (Figura 2.10). Também foi estudada a porcentagem de gametas imaturos por classe de tamanho, para verificar se esta porcentagem está melhor relacionada com o tamanho dos animais do que com a época do ano em que os indivíduos foram coletados. As figuras 2.11 e 2.12 mostram esse resultado, que indicou uma correlação positiva entre o tamanho do animal e a porcentagem de gametas imaturos em seu corpo. É preciso levar em conta que um valor maior na porcentagem de gametas imaturos reflete uma maior desova pelo indivíduo, uma vez que a proliferação de novos gametas femininos é constante.

Desta maneira, não há como tirar conclusões sobre a maturação dos gametas femininos, seja em função da época do ano, ou do tamanho dos indivíduos. Já a desova é regida pelo tamanho do corpo do animal, mais precisamente a largura, que é um bom indicador da idade do mesmo.

4.3. Padrões da espermatogênese

A presença de citóforo unindo o citoplasma das células espermáticas durante a espermatogênese é comum e bem documentada em poliquetas (Rouse e Pleijel, 2006), porém esta característica não define o modo reprodutivo de cada espécie (Eckelbrager, 1984). Para os indivíduos de *D. neapolitana* estudados no presente trabalho, a principal diferença está no fato de haver dois caminhos possíveis para a espermiogênese, embora em ambos a formação do flagelo se dê durante a própria espermiogênese e os espermatozoides nadem livres no celoma somente quando já estão totalmente formados.

A formação de mórulas espermáticas foi observada e estudada por Pacey e Bentley (1992), para *Arenicola marina* (Família Arenicolidae), e por Eckelbarger e Young (2002), para *Methanoaricia dendrobranchiata* (Família Orbiniidae), dentre outras espécies. A liberação de células a partir do aglomerado unido pelo citóforo já foi estudada por Reunov et al. (2010) em *Boccardiella hamata* (Família Spionidae) e auxiliou na resolução de problemas taxonômicos relacionados àquela espécie, porém naqueles animais o citóforo era desintegrado durante o estágio de espermátides, liberando simultaneamente todas as células, que rapidamente completavam a espermiogênese e formavam os flagelos, nadando livremente no celoma. Isso difere do que foi aqui verificado para *D. neapolitana*, na qual a espermiogênese ocorre com as espermátides ainda ligadas ao citóforo.

A espermiogênese realizada totalmente no aglomerado de células não é uma característica comum para poliquetas, tampouco o é a presença de duas vias de formação de espermatozoides. Considerando que *D. neapolitana* é uma espécie invasora e que há indivíduos com gametas femininos maduros durante todo o ano, consequentemente um ciclo reprodutivo iteróparo, a presença de dois métodos de espermatogênese pode estar relacionada a uma disponibilidade de espermatozoides mais constante e controlada, admitindo que o tempo de duração dos dois processos seja diferente. Pacey e Bentley (1992) estudaram a dissolução do citóforo e maturação de espermatozoides utilizando a substância endócrina "SMF" (Sperm Maturation Factor). A utilização dessa substância para *D. neapolitana*, em estudos futuros, poderá auxiliar na melhor compreensão dos métodos de espermatogênese destes animais.

É comum a presença de celomócitos em poliquetas, fagocitando os subprodutos da espermatogênese, bem como gametas mal formados ou defeituosos (Pacey e Bentley, 1992). Porém estes são normalmente encontrados em pequenas quantidades, enquanto alguns dos indivíduos analisados no presente estudo apresentavam uma quantidade muito grande dessas células, compondo praticamente todo o líquido celômico (Figura 2.17c), característica esta comum apenas em indivíduos imaturos, em animais de outras espécies (Giangrande et al., 2000). Considerando que exemplares de *D. neapolitana* apresentam hermafroditismo sequencial, a grande quantidade celomócitos pode indicar o momento de transição entre os gêneros sexuais, quando essas células estariam limpando o celoma de espermatozoides e resquícios da espermatogênese, impedindo a autofecundação, pois a cavidade do corpo desses animais estaria prestes a ser preenchida por gametas femininos. Não foi possível analisar o conteúdo interno dos celomócitos por microscopia ótica nem MEV, afim de observar o conteúdo fagocitado (Figura 2.17a-b).

É clara a diferença entre as imagens de MEV dos espermatozoides que passaram pela citocentrífuga e aqueles foram secos no interior do corpo dos indivíduos, pelo processo de desidratação em baterias de álcool e ponto crítico. Cada método tem suas vantagens e desvantagens. O processo de citocentrífuga deforma as células observadas, achatando-as e, portanto, comprometendo a estrutura morfológica das espermatogônias, espermatócitos e espermatozoides, porém possibilita a observação de espermatozoides e estruturas destes gametas (flagelos e mitocôndrias), conectados ao citóforo do aglomerado de células (Figura 2.14, 2.16e-f). Além disso, a citocentrífuga possibilita a observação de todos os componentes do líquido celômico, enquanto a análise de uma parte do corpo do adulto na MEV permite estudar apenas a camada mais superficial. Todavia, a análise do celoma a partir do corpo dissecado dos animais preserva a estrutura morfológica de todos os componentes, permitindo uma análise aprimorada da fragmentação das espermatogônias, dos diferentes estágios da espermatogênese e dos próprios espermatozoide (Figura 2.13, 2.16a-d).

Sessões transversais do corpo de animais adultos contendo espermatozoides no celoma foram montadas em resina, após fixação em glutaraldeído e pós fixação em tetróxido de ósmio, afim de realizar cortes para análise sob microscopia eletrônica de transmissão (MET). Essas análises ainda não foram feitas por limitações de tempo, mas o serão num futuro próximo. Estas análises podem vir a trazer resultados e discussões muito mais completas, incluindo, por exemplo, a visualização da posição das espermatogônias antes de serem liberadas no celoma, provavelmente associadas a algum vaso sanguíneo, além do estudo de estruturas celulares internas em todas as etapas da espermatogênese, bem como a organização das células ligadas ao citóforo, a condensação do material genético e formação dos núcleos, formação do acrossomo, das mitocôndrias e do flagelo, incrementando o conhecimento da espermiogênese e da própria estrutura

interna dos espermatozoides. Outro aspecto que poderá ser melhor investigado pela MET é o estudo dos celomócitos e do material por eles fagocitado. O estudo completo da espermatogênese e dos espermatozoides de uma espécie proporcionam caracteres taxonômicos importantes que devem ser usados em conjunto, pois existem diferenças grandes na morfologia dos espermatozoides entre espécies filogeneticamente próximas (Rouse e Fitzhugh, 1994).

4.4. Proporção macho : fêmea : hermafrodita

O primeiro ponto a ser ressaltado é a diferença na quantidade de animais com gametas femininos no estudo do ciclo anual e no estudo das papilas espermoducais. Isto se deve a alguns animais estarem partidos no final da região branquial, apresentando células acessórias, mas não gametas femininos.

A descrição original de *D. neapolitana* é muito antiga (Delle Chiaje, 1841) e o conhecimento sobre esses animais, principalmente em relação à biologia reprodutiva, se modificou muito ao longo dos anos. Lo Bianco (1899) descreveu aspectos reprodutivos de vários animais do Golfo de Nápoles e constatou a presença de uma massa gelatinosa contendo ovos fertilizados de *D. neapolitana*, conectada ao tubo de um indivíduo adulto, um tipo de cuidado parental comum entre poliquetas tubícolas. Estudos posteriores contradisseram essa hipótese e sugeriram, a partir de fertilizações in vitro e da morfologia dos espermatozoides, que esses animais liberavam os gametas diretamente na água, de forma aleatória, termo em inglês chamado de “broadcast spawners” (Cazaux, 1970 apud Arias et al., 2016; Conti et al., 2005). Através de estudos mais recentes de biologia

reprodutiva de outras espécies de *Diopatra*, é possível imaginar que Lo Bianco (1899) tenha descrito ovos de *D. biscayensis*, ao invés de *D. neapolitana*.

Em estudo baseado em cortes histológicos do corpo dos animais, Arias et al. (2016) caracterizaram os indivíduos de *D. neapolitana* como hermafroditas sequenciais protândricos, com a fase hermafrodita diagnosticável pela presença das papilas espermoducais dorsais, que liberam os espermatozoides para o meio externo, enquanto os ovócitos permanecem no celoma. Todos os animais hermafroditas observados naquele estudo apresentavam papilas espermoducais bem desenvolvidas.

Os indivíduos coletados no presente estudo não exibiram um padrão de papilas espermoducais tão bem definido quanto os de Arias et al. (2016), com muitos exemplares apresentando papilas mal desenvolvidas. Essa diferença pode ter levado a interpretações equivocadas nas primeiras coletas do presente estudo, quando não foi usado corante para evidenciar as papilas. Assim, considerando que os animais das primeiras coletas já estavam fixados e buscando uma padronização, a presença de papilas espermoducais passou a ser investigada somente a partir de indivíduos fixados, ao invés de em material vivo. É possível que a fixação dos animais tenha influenciado na morfologia das papilas, assim como ocorre em diversas outras estruturas, mas a diferenciação dos estágios de desenvolvimento não foi prejudicada.

Assim, foi aqui convencionado que a presença de papilas espermoducais bem desenvolvidas caracterizavam animais hermafroditas, enquanto a ausência de tais papilas (ausência das papilas por completo, ou presença destas mal desenvolvidas) seria diagnóstica para machos ou fêmeas, dependendo do tipo de gameta majoritariamente presente no celoma.

Considerando que a mudança de gênero sexual no hermafroditismo sequencial protândrico é relacionada com o tamanho do indivíduo (Rouse e Pleijel, 2006), foi investigado se seria possível definir o gênero dos indivíduos por classes de tamanho. A largura do setígero 10 é muito utilizada na bibliografia como indicativo de tamanho (Dagli et al., 2005; Pires et al., 2012b; Arias et al., 2016), principalmente porque esses animais costumam perder partes do corpo ao longo da vida, ou durante as coletas, de maneira que frequentemente não é possível estimar o comprimento total. Entretanto, o número de indivíduos em cada classe de tamanho (L10) é muito diferente, com 111 dos 128 indivíduos estudados (86,71%) pertencentes às classes 0.3, 0.35 e 0.4 cm. Analisando essas três classes isoladas das demais na figura 2.23, o padrão do hermafroditismo sequencial protândrico é muito claro.

Considerando que o comprimento total do corpo não é uma medida válida, conforme discutido acima, foi adotado o comprimento até o setígero 40, visando estabelecer classes de tamanho relacionadas ao comprimento viáveis. Tal medida não consta na literatura disponível, mas foi adotada neste estudo, pois a zona até o setígero 40 está presente em todos os indivíduos coletados. A figura 2.24 relaciona os gêneros sexuais com essa nova medida de tamanho e os resultados são muito semelhantes àqueles da largura no setígero 10, corroborando novamente o hermafroditismo protândrico; além disso, as classes de tamanho na figura 2.24 se referem a intervalos no comprimento e a quantidade de indivíduos em cada classe é melhor distribuída, em contraponto à medida da largura.

Os indivíduos férteis estudados por Arias et al. (2016) apresentavam 2-10 mm de largura. Os 128 espécimes férteis coletados na Baía do Araçá são mais finos, 1-5 mm, de maneira que os animais de São Sebastião adquirem a maturidade sexual com tamanho menor e nunca chegam a atingir um tamanho tão elevado quanto aqueles da população

do estuário de Villaviciosa. Considerando-se a reprodução contínua dos indivíduos do presente estudo e o hermafroditismo sequencial, atribui-se que o tamanho do corpo dos indivíduos está diretamente relacionado ao sucesso reprodutivo (Berglund, 1990; Rouse e Pleijel, 2006), portanto a conclusão acima é embasada e uma análise dos gêneros sexuais ao longo dos meses estudados se fez necessária, para saber se há padrões de hermafroditismo sequencial, nos diferentes períodos do ano. A figura 2.25 mostra essa análise e, aparentemente, não há padrão de hermafroditismo sequencial ao longo do ano, estando este relacionado exclusivamente ao tamanho dos animais.

Apesar dos resultados suportarem o hermafroditismo sequencial, é preciso analisar as diferenças encontradas nas papilas espermoducais dos indivíduos estudados. Como estas estruturas se desenvolvem ao longo da vida dos animais e são utilizadas para produção e a liberação de espermatozoides para o meio externo, a presença de papilas mal desenvolvidas pode representar tanto um estágio anterior à mudança de macho para hermafrodita, com as papilas ainda em formação, quanto a uma etapa posterior, correspondendo à transição de hermafrodita para fêmea, com as papilas regredindo.

Assim, a ideia inicial de gênero estaria relacionada aos gametas encontrados no corpo de cada espécime. O animal seria um hermafrodita inicial se apresentasse espermatozoides e papilas espermoducais mal desenvolvidas (em formação), e um hermafrodita tardio se apresentasse ovócitos e papilas mal desenvolvidas (em regressão). Mas esta nova classificação geraria diversos problemas, como a própria presença de mais gêneros sexuais, que demandaria um número maior de indivíduos amostrados, para garantir um estudo percentual dos exemplares mais acurado. Isto porque há poucos espécimes em cada classe de tamanho, como discutido anteriormente, e seria necessário um n amostral maior, para ter valor estatístico.

Tentando entender os diferentes estágios de desenvolvimento das papilas espermoducais, foram testados corantes para melhor destacar a morfologia dessas estruturas. O Shirlastain A foi o primeiro utilizado, pois tem afinidade com alguns tecidos de poliquetas, como papilas da faringe e lobos parapodiais, porém não foi possível verificar nenhum contraste. Posteriormente, foi utilizado o azul de metileno, que corou a região dorsal dos indivíduos, principalmente onde há pigmentação, dando um bom contraste com as papilas bem desenvolvidas e destacando os orifícios dos dutos espermoducais; animais com papilas mal desenvolvidas e sem papilas apresentaram resultados muito semelhantes àqueles com papilas bem desenvolvidas (Figura 2.18), demonstrando que, mesmo que estas as papilas ainda não estejam desenvolvidas, a região das mesmas é bem delimitada e diferenciada. A sobreposição na região de ocorrência das papilas mal e bem desenvolvidas evidencia ainda mais esta delimitação.

A observação das papilas espermoducais sob MEV não permitiu diferenciar papilas bem desenvolvidas daquelas mal desenvolvidas ou aparentemente inexistentes, nem verificar a presença de espermatozoides no interior das mesmas. A desidratação e o ponto crítico podem ter modificado a morfologia destas estruturas, reduzindo as diferenças observadas em relação ao restante da parede do corpo (Figura 2.19a–b). Os dutos espermoducais estão presentes em ambos os tipos de papilas (Figura 2.19c–d), com resquícios de substâncias que parecem ser parte do líquido celômico, de maneira que aquelas mal desenvolvidas também tem a capacidade de liberar gametas, dificultando ainda mais a delimitação dos gêneros sexuais de *D. neapolitana*. Por fim, as papilas de alguns exemplares foram perfuradas antes da metalização, para expor o seu interior e verificar a presença de gametas masculinos, porém nenhum espermatozoide foi encontrado (Figura 2.19e).

Por outro lado, a grande quantidade de celomócitos encontrada em alguns exemplares da Baía do Araçá pode suportar a ocorrência de hermafroditismo sequencial, pois o aumento na quantidade destas células é proporcional à drástica diminuição ou desaparecimento de gametas masculinos. Bybee et al. (2007) também encontraram grande quantidade de celomócitos, estudando o hermafroditismo sequencial em indivíduos de *Sabellastarte spectabilis* (Família Sabellidae). Desconsiderando espécies com hermafroditismo sequencial, a presença de grande quantidade de celócitos na cavidade do corpo é comum apenas em indivíduos imaturos (Giangrande et al., 2000), mas os animais observados no presente estudo apresentavam largura do corpo maior do que 4 mm, figurando entre as maiores classes de tamanho.

A classificação dos animais desta espécie como hermafroditas é muito recente, com apenas um trabalho publicado sobre o tema (Arias et al., 2016), no qual foram encontradas apenas papilas espermoducais plenamente desenvolvidas, contendo espermatozoides. Na população da Baía do Araçá, em contrapartida, foram também observadas papilas pouco desenvolvidas e não foram encontrados espermatozoides nem nas mais desenvolvidas. Assim, fica clara a necessidade de mais estudos sobre a biologia reprodutiva de *D. neapolitana*, com mais tempo de amostragem e coleta de um número maior de exemplares, para decifrar os passos da ontogenia destes animais.

Devido às dificuldades em determinar a real natureza das papilas espermoducais, uma outra abordagem escolhida foi a determinação dos gêneros sexuais a partir do tipo de gameta mais predominante no celoma, dividindo-os apenas em machos e fêmeas. O hermafroditismo sequencial protândrico pressupõe machos menores do que as fêmeas (consequentemente hermafroditas maiores do que machos e menores que fêmeas), portanto a abordagem de análise gonocórica não pretende desconsiderar o hermafroditismo sequencial, apenas delimitar o machos e fêmeas para entender melhor

as diferenças nos tamanhos. Além disso os trabalhos anteriores ao de Arias et al. (2016) (Dagli et al., 2005; Pires et al., 2012b) desconheciam o hermafroditismo na espécie, portanto essa abordagem permite também a comparação com aqueles artigos.

Considerando apenas machos e fêmeas, fica clara a predominância de machos nas classes de menor tamanho e de fêmeas nas maiores, tanto em relação ao comprimento, quanto à largura (Figuras 2.20, 2.21). Isto está de acordo com os trabalhos anteriores (Dagli et al., 2005; Pires et al., 2012b) e também com a hipótese do hermafroditismo sequencial (Arias et al., 2016), como esperado, embora a proporção total de machos:fêmeas no presente trabalho seja praticamente 1:1 (55.47:44.53%), enquanto a maioria dos outros autores observou uma proporção de 3:1, mas Pires et al. (2012b) também encontraram uma proporção de 1:1 entre os indivíduos de Portugal, em Ria de Aveiro.

Correlacionando os dados gonocóricos com os meses analisados (Figura 2.22), é possível perceber uma proporção maior de machos principalmente no inverno e no verão, em contraponto as fêmeas são mais abundantes na primavera e no outono. O trabalho de Dagli et al. (2005), apesar de apresentar uma grande quantidade de indivíduos com gênero sexual incerto, aponta para uma maior proporção de machos no inverno e maior quantidade de fêmeas no outono. Portanto os dados são corroborados entre os hemisférios e a temperatura se mostra como um fator importante no ciclo reprodutivo dos indivíduos de *D. neapolitana*, apesar da disparidade destes dados com os trabalhos de Pires et al. (2012b) e Arias et al. (2016). Mais estudos são necessários para elucidar esse tema.

Capítulo 3 – Desenvolvimento

1. Introdução

Paxton (1993) reconheceu e descreveu 4 padrões de desenvolvimento para os animais da família Onuphidae: desenvolvimento dentro do tubo parental, desenvolvimento direto em casulo, massa de ovos fixada à abertura do tubo parental e "broadcast spawning", ou seja, liberação dos gametas e fertilização externa, na água do mar. Wilson (1991) utilizou uma abordagem muito semelhante, visando classificar os modos reprodutivos de todos os poliquetas, apontando que os 2 aspectos principais do desenvolvimento são o destino do gameta feminino e o tipo da larva durante o desenvolvimento (lecitotrófica, planctotrófica, etc.). Os experimentos realizados neste capítulo visaram estudar esses dois aspectos da biologia reprodutiva de indivíduos pertencentes a *D. nepolitana*, da Baía do Araçá.

O gênero *Diopatra* passou por muitas revisões taxonômicas (Augener, 1918; Fauvel, 1933; Hartman, 1944; Day, 1960; Fauchald, 1968; Paxton, 1986, 1993; Budaeva e Fauchald, 2011), e ainda há grande dificuldade na identificação de espécies. Trabalhos com foco em biologia reprodutiva auxiliam no conhecimento das espécies, destacando características que podem ser diagnósticas. Porém, com todos os problemas de identificação específica deste grupo, um erro recorrente é atribuir características reprodutivas a uma espécie mal identificada (Lo Bianco, 1899; Choe, 1960).

Amoureux et al. (1978), por exemplo, sugeriu a presença de cuidado parental entre indivíduos de *D. neapolitana*, após observar larvas dentro dos tubos de adultos, em

material do Estreito de Gibraltar. Entretanto, outros estudos (Bhaud e Cazaux, 1987; Fadlaoui et al., 1995; Conti e Massa, 1998) observaram, a partir de fertilização *in vitro*, a presença de larvas lecitotróficas nesta espécie, de maneira que as observações de Amoureux (1978) possivelmente se referem a indivíduos de outra espécie de *Diopatra* (Paxton et al., 1995).

Erros na taxonomia e identificação dos adultos podem gerar informações conflitantes sobre os aspectos reprodutivos. Com os problemas taxonômicos do grupo sendo resolvidos e descrições mais claras, objetivas e padronizadas ficando disponíveis, a identificação correta da espécie estudada se torna mais fácil. Uma maneira de diminuir os erros taxonômicos é acoplar dados reprodutivos à taxonomia, Blake e Arnofsky (1999) demonstraram que análises filogenéticas combinando dados larvais e ontogenéticos aos caracteres morfológicos dos adultos proporcionam informações mais completas sobre a sistemática e relações de parentesco, do que análises apenas dos caracteres dos adultos, isoladamente.

A espécie *D. neapolitana* foi recentemente redescrita por Arias et al. (2016) e um neótipo foi estabelecido, de modo que o conhecimento sobre a biologia do desenvolvimento dessa espécie deve ser atualizado também. O presente trabalho tem como parte dos objetivos criar protocolos de fertilização e redescrever o desenvolvimento larval dos indivíduos de *D. neapolitana* da população presente na Baía do Araçá, a partir da fertilização *in vitro* e com base na literatura conhecida (Allen, 1959; Cazaux, 1970 apud Arias et al., 2016; Bhaud e Cazaux, 1987). O acesso a técnicas de análise aprimoradas que há atualmente, como a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e a Microscopia Confocal de Varredura à Laser (MCVL), pode auxiliar em descrições mais completas.

Em relação à dispersão de gametas, indivíduos de *D. neapolitana* são tratados como "broadcast spawners" pela literatura (Conti et al., 2005; Dagli et al., 2005, Pires et al., 2012b, Arias et al., 2016), ou seja, os gametas masculinos e femininos são liberados na coluna d'água e a fertilização ocorre ao acaso. A atribuição deste modo de dispersão se dá principalmente à morfologia dos espermatozoides destes animais, considerado "ect aquasperm", de acordo com a definição proposta por Rouse e Jamieson (1987) e aprimorada por Jamieson e Rouse (1989), e pela falta de evidências de gametas femininos, ou ovos fertilizados, dentro dos tubos dos adultos, ou em massas gelatinosas.

Outra atribuição dada como suporte para a liberação de gametas na coluna d'água é a presença de larvas lecitotróficas em *D. neapolitana*, mas a dispersão dos gametas e o desenvolvimento da larva são características independentes, apesar de poderem ser analisadas em conjunto para entender o padrão de desenvolvimento (Wilson, 1991; Paxton, 1993). Além disso, Wilson (1991) considerou o destino do gameta feminino como sinônimo da dispersão de gametas, como exemplo, as definições de "ect aquasperm" e "ent aquasperm" (Rouse e Jamieson, 1987; Jamieson e Rouse, 1989) estão relacionadas à liberação ou retenção de ovócitos, que definirá o papel dos espermatozoides. O estudo da morfologia dos espermatozoides isoladamente é um indício fraco do método de dispersão da espécie, assim como o são a ausência de ovócitos e larvas nos tubos de adultos, ou em massas gelatinosas, uma vez que liberação de gametas em *D. neapolitana* também nunca foi efetivamente observada.

A liberação de gametas em poliquetas depende de vários fatores, tanto bióticos, quanto abióticos, o que impõe dificuldades à elaboração de experimentos. O presente trabalho também teve como objetivo criar protocolos para o estudo da liberação de gametas em *D. neapolitana*, que fossem simples e possíveis de serem replicados, nos quais as diferentes variáveis pudessem ser testadas independentemente.

2. Materiais e métodos

2.1. Cultivo dos adultos

Para o estudo do desenvolvimento de indivíduos de *D. neapolitana*, foram cultivados 27 indivíduos em Junho de 2017, 7 dos quais no Laboratório de Poliquetologia (LaPol) do Departamento de Zoologia do IB-USP e 20 no Centro de Biologia Marinha (CEBIMar) da USP, em São Sebastião.

Estes animais foram coletados na Baía do Araçá, anestesiados em cloreto de magnésio a 7,5%, isotônico à água do mar, e retirados dos tubos, seguindo a metodologia apresentada em capítulos anteriores desta Dissertação. Através de punção e extração de pequena quantidade de líquido celômico dos animais, foi verificado o tipo de gameta presente em cada indivíduo e determinado o seu sexo (ver Capítulo 2).

Os animais foram mantidos numa sala com temperatura controlada, em aquário de vidro cilíndrico, com volume de ~45 l, com aeração, substrato preenchendo aproximadamente metade da altura do mesmo, o restante do volume, com água do mar. Foi utilizada areia da praia como substrato, peneirada, para evitar sedimentos muito grandes, ou outros animais, e esterilizada em estufa a 60º C, por 24 horas. Os animais despertaram do anestésico no aquário, para construírem seus tubos no novo substrato (Anexo 1); foi verificado onde cada animal se instalou, para facilitar a identificação e remoção do mesmo, para os experimentos. Os tubos originais não foram mantidos, por estarem danificados pela coleta e também por poderem conter outros organismos em seu interior.

Foram feitas trocas diárias na água do aquário, para prevenir o aumento na salinidade, bem como para a própria limpeza do ambiente. Os cultivos realizados no CEBIMar foram facilitados pela presença de água do mar encanada, portanto a troca de água era intermitente. A alimentação era composta de pequenos bivalves ou camarões cortados em pequenos pedaços e entregues com auxílio de uma pinça na entrada de cada tubo (Anexos 2–3). Os animais foram alimentados diariamente e, para prevenir contaminação, o alimento era descartado, caso não fosse consumido em alguns minutos.

Nos experimentos, toda a água do aquário foi removida, incluindo aquela dentro do tubo do animal a ser testado, com auxílio de uma pipeta. O tubo foi, então, preenchido com mistura de água do mar e cloreto de magnésio a 7,5%, na proporção de 4:1, respectivamente, de maneira a anestesiar apenas o espécime desejado; o líquido de dentro do tubo foi trocado por misturas progressivamente mais concentradas de cloreto de magnésio, até a proporção 1:2, que foi deixada por 30 min. Os indivíduos foram, então, retirados de seus tubos com uma pinça de ponta fina, resguardando sempre a integridade física dos animais; nos casos em que havia resistência muscular do animal para retirada, ele foi mantido por mais tempo no anestésico, até que estivesse completamente relaxado. Nos experimentos que utilizavam muitos indivíduos simultaneamente, toda a água do aquário era substituída pela solução anestésica.

2.2. Procedimentos da fertilização *in vitro*

A fertilização *in vitro* foi feita a partir de uma fêmea (ou hermafrodita contendo gametas femininos) selecionada, que foi anestesiada e transferida para uma placa de petri contendo água do mar ultrafiltrada (filtro de 0.2 µm), para retirada dos gametas. O animal

foi mantido na placa de petri em água do mar, ao invés da solução anestésica, para não danificar os gametas. Os gametas femininos foram obtidos através de pequenas incisões na região dorsal do animal, entre o intestino e os parapódios, expondo o celoma, de onde os gametas foram removidos com uma pipeta. Os gametas femininos foram lavados com água ultrafiltrada, em peneira de malha de 100 µm, afim de eliminar gametas imaturos e outras substâncias potencialmente nocivas, do celoma do adulto. Os ovócitos maduros foram, então, passados para uma placa de petri contendo água ultrafiltrada e penicilina a 40 mg/L, para reduzir ao máximo a contaminação por microrganismos.

Isto feito, foi selecionado um macho e seguido o mesmo protocolo para a remoção dos gametas do interior do mesmo. Foi removido ~0,2 ml de liquido celômico, misturado a 5 ml de água do mar ultrafiltrada, para ativação dos espermatozoides (Anexos 4–7). A fertilização foi feita misturando 1 ml da solução de espermatozoides na placa de petri contendo os ovócitos.

Após 1 hora da fertilização, os zigotos foram lavados em peneira com malha de 100 µm, afim de retirar o excesso de espermatozoides na água, reduzindo a proliferação de bactérias. Os zigotos foram transferidos para outra placa de petri, esterilizada, também com água ultrafiltrada.

Os estágios de desenvolvimento dos embriões foram analisados em microscópio estereoscópio, na própria placa de petri, e em microscópio ótico, numa câmara de contagem do tipo Sedgewick Rafter, ou em lâmina de microscopia. As fotos foram tiradas nas dependências do CEBIMar, com auxílio do Prof. Alvaro Esteves Migotto. Foram feitas trocas diárias da água da placa de petri e microrganismos, quando observados, foram removidos com auxílio de uma pipeta. Embriões que alcançaram estágios mais avançados, com natação, foram transferidos para placas maiores, para que tivessem mais espaço para a movimentação.

Foram fixados embriões de todos os estágios do desenvolvimento, em formol e em solução de trialdeído. Em ambos os métodos, os embriões e larvas foram previamente anestesiados em solução de água do mar ultrafiltrada e cloreto de magnésio isotônico, na proporção de 3:1, respectivamente, e mantidos em geladeira a 4º C, por 10 minutos. Para a fixação em formol, os embriões foram colocados em formol 4% em solução de água do mar e deixados na geladeira a 4ºC, por 12 horas; posteriormente, foram lavados em água do mar e transferidos para solução de álcool e água do mar, em concentração 1:1; finalmente, foram lavados em água destilada, transferidos para álcool a 80 % e armazenados em freezer a -20º C.

Para a fixação em trialdeído, foi preparada uma solução com 80 ml de glutaraldeído a 3.1 %, 40 ml de paraformaldeído a 4 %, 5 ml de cacodilato de sódio 2M e 6.25 g de sacarose P.A. (Di Domenico, 2012). Os embriões e larvas foram mergulhados nesta solução e mantidos em geladeira a 4º C por 2 horas; em seguida, foram transferidos para uma solução tampão de cacodilato de sódio 0.1 M com sacarose e poucas gotas da solução de trialdeído; finalmente, os animais foram pós fixados em tetróxido de ósmio 0.1 M. A fixação em tetróxido de ósmio foi feita conforme o protocolo usual, em solução tampão de cacodilato de sódio 0.1M, em iguais proporções, deixada em geladeira a 4º C, por 1 hora, e, em seguida, o material foi desidratado em baterias progressivamente mais concentradas de álcool (0-100%), com 3 baterias para o álcool 100%, para eliminar completamente o tetróxido de ósmio.

Para o estudo sob MEV, foram selecionados exemplares fixados de todos os estágios do desenvolvimento, estes foram desidratados em baterias de álcool progressivamente mais concentradas, quanto necessário, também no aparelho de ponto crítico, montados em stubs, cobertos por fina camada de ouro e analisados sob o feixe de elétrons, no Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB-USP.

2.3. Liberação de gametas

Para estudar a liberação de gametas na coluna d'água, característica de "broadcast spawners", foi feito um experimento com indivíduos adultos isolados, nas dependências do CEBIMar. Foram usados tubos de policarbonato transparentes, de 30 cm de altura e 3 cm de diâmetro, com uma das extremidades fechada e metade da altura preenchida com substrato. O substrato e os procedimentos de alimentação seguiram o mesmo protocolo do cultivo dos animais vivos.

Foram estudados 12 indivíduos, 6 dos quais machos e 6 fêmeas, cada um colocado em um tubo separado, sem contato com os demais indivíduos. Foram estabelecidos 4 grupos, cada um de 3 indivíduos; o primeiro grupo era composto apenas por machos; o segundo, por machos e ovócitos em suspensão na coluna d'água; o terceiro continha apenas fêmeas; e o quarto, fêmeas e espermatozoides em suspensão. Os gametas colocados na coluna d'água foram removidos de animais adultos cultivados no laboratório, não incluídos nos grupos analisados no experimento.

Os tubos de policarbonato tinham aeração e o experimento foi executado em sala climatizada, a 22º C. A água dos tubos foi trocada duas vezes por dia, de acordo com os horários de pico das marés baixas, e o experimento se estendeu por 2 semanas. A água removida foi estudada sob microscópio ótico, buscando localizar gametas liberados pelos animais, ou embriões, nos casos dos grupos com gametas em suspensão. Qualquer outro comportamento apresentado pelos indivíduos, visualizado pela transparência dos tubos, foi anotado.

3. Resultados

3.1. Fertilização *in vitro*

Após a fertilização, ocorre a formação do envelope de fertilização, uma fina camada transparente formada externamente à membrana citoplasmática (Figura 3.1a), separadas por uma grande quantidade de finas microvilosidades (Anexo 8). Assim como o ovócito, o envelope é oval, com espaço maior e, consequentemente, mais visível na região do polo animal (Figura 3.1b). O ovócito, então, diminui de tamanho, enquanto o envelope de fertilização mantém as mesmas proporções, ao mesmo tempo em que aparece o segundo corpúsculo polar, na região do polo vegetal (Anexo 9). Em seguida, ocorre a primeira clivagem, iniciando-se a partir do polo animal e dividindo o zigoto meridionalmente, formando 2 blastômeros levemente assimétricos, a célula AB ligeiramente menor do que a célula CD (Anexo 10). As clivagens seguintes ocorrem simultaneamente nos blastômeros divididos, seguindo o padrão clássico de clivagem espiral de anelídeos (Anexo 11). A mórula tem praticamente o mesmo tamanho do ovócito não fertilizado e as clivagens a partir desse estágio são mais rápidas, formando uma estereoblástula. Neste estágio começa o processo de gastrulação por epibolia.

O processo de gastrulação é caracterizado pelo aparecimento de cílios na camada externa dos embriões (Anexos 12–13), que ganham movimento imediatamente e, consequentemente, os indivíduos começam a girar no próprio eixo, mas sem sair do lugar (Anexos 14–16) (Figura 3.1c). O batimento ciliar é caracterizado por movimentos de chicotada e recuperação em cada cílio ao longo do corpo, de forma sincronizada (Anexos 17–20). Em seguida, se tornam larvas livre natantes e começam a nadar com direção

definida pelo eixo ântero-posterior (Figura 3.1d-e), ao mesmo tempo em que giram o corpo no sentido anti-horário (Anexo 21). As larvas se movimentam rapidamente e se concentram mais na superfície das placas, apesar de circularem por toda extensão da coluna d'água disponível; comumente as larvas se aglomeram na superfície, formando placas de indivíduos girando apenas no mesmo eixo, apenas as larvas das bordas trocando de lugar (Anexo 22). Os cílios aumentam em tamanho e número, cobrindo praticamente todo o corpo das larvas, com exceção das extremidades anterior e posterior, apenas com o tufo apical na região anterior, que cresce rapidamente; simultaneamente, aparece um par de ocelos com formato de manchas avermelhadas na região anterior do corpo. É possível ver células contendo vitelo, maiores do que as demais, se concentrando na região anterior e central do corpo das larvas (Figura 3.1f).

Na sequência, as larvas, ainda praticamente do mesmo tamanho dos ovócitos não fertilizados (Anexo 24), atingem o estágio de trocófora, com natação mais rápida e direção definida pela luminosidade (Anexo 23). O par de ocelos na região anterior é bastante conspícuo (Figura 3.1g), assim como as células contendo vitelo (Anexo 25). As larvas começam, então, a crescer, principalmente alongando o corpo no sentido ântero-posterior (Anexo 26)(Figura 3.1h). Após o crescimento, as larvas atingem o estágio de pós-trocófora, em que o tufo apical cresce ainda mais, atingindo quase o dobro do tamanho das larvas, um pequeno tufo de cílios surge na região posterior, além da formação de três pares de cerdas, embora sem parapódios aparentes. Internamente, é possível ver o começo da formação do intestino, caracterizado por células mais escuras, assim como a diferenciação da faringe, onde aparecerão as maxilas.

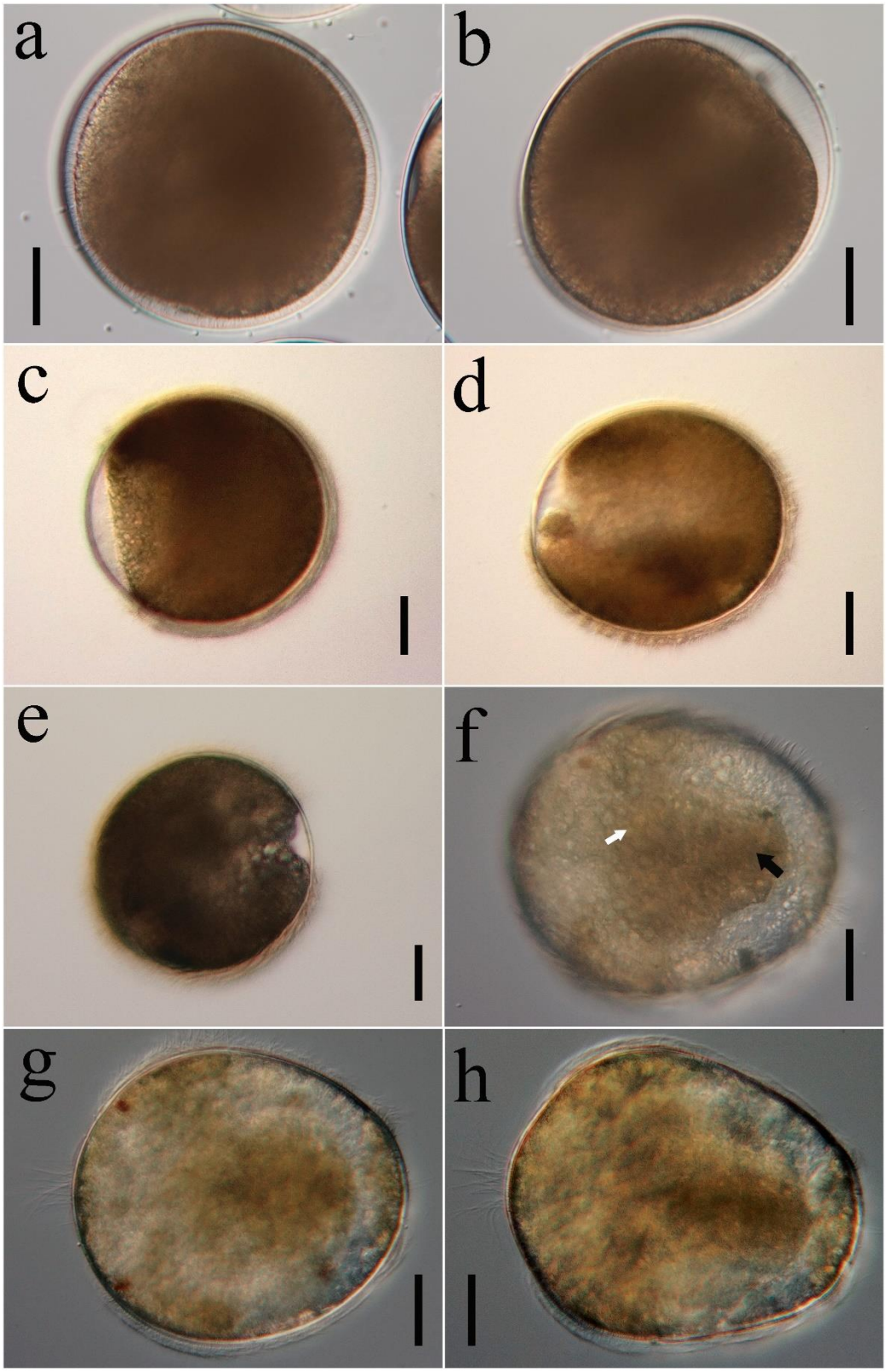

Figura 3.1 Embriões de *D. neapolitana* fotografados vivos, em microscópio óptico **a** zigoto formando o envelope de fertilização; **b** zigoto com envelope de fertilização formado; **c** larva com natação apenas rotacional; **d–e** larva livre natante, com direção ântero-posterior no movimento; **f** larva trocófora, seta branca apontando para células com vitelo, seta preta indicando a formação do intestino; **g** larva trocófora, com ocelos e tufo apical; **h** início da larva pós-trocófora, caracterizada por corpo mais alongado e intestino mais desenvolvido. **Escalas: a–h** 50 µm.

O próximo estágio consiste de larvas com 3 pares de parapódios formados (Figuras 3.2a; 3.3a), apenas com cerdas simples, de 2 tipos: com ponta afilada e levemente curva (Figura 3.3i) e com ponta achatada, coberta por uma estrutura que lembra um capuz (Figuras 3.2c; 3.3j). O corpo das larvas se torna notavelmente alongado e os cílios se concentram principalmente em 2 bandas bem definidas, uma na região anterior, entre o primeiro par de parapódios e os ocelos, a outra na região posterior (Figuras 3.2a-b; 3.3a-b), logo após o último par de parapódios (Anexos 27–28); os parapódios não auxiliam na natação, que é realizada exclusivamente pelos cílios (Anexos 29–33) (Figura 3.2a). O trato digestório está praticamente todo formado, incluindo a faringe, onde as maxilas começam a se formar (Anexo 34); na região anterior ventral forma-se uma invaginação, que originará a boca. Neste ponto, são visíveis internamente as cerdas em formação, antes da formação dos parapódios. As células vitelínicas formam uma estrutura maciça interna, na região anterior, sob a banda ciliada (Anexo 35–36) (Figura 3.2b). Alguns dos indivíduos secretaram muco, que adere larvas entre si, ou ao fundo da placa (Anexo 37).

Os estágios seguintes (Figura 3.3c–e) exibiram o mesmo padrão de formação de cerdas e parapódios. No estágio de 4 setígeros, as antenas e palpos começam a ser formados, primeiramente apenas como círculos conspícuos na região anterior (Figura 3.3c-d), que se alongam até formarem os apêndices por completo (Figura 3.3f–g). Quando as cerdas do quinto par de parapódios estão visíveis internamente, o intestino já está completamente formado, assim como as maxilas, que se tornam mais escuras (Anexos 38–40) (Figura 3.2d); as larvas, então, passam a protrair e retrair as maxilas continuamente (Figura 3.3h). Muitas larvas secretam muco copiosamente, aderindo ao fundo da placa.

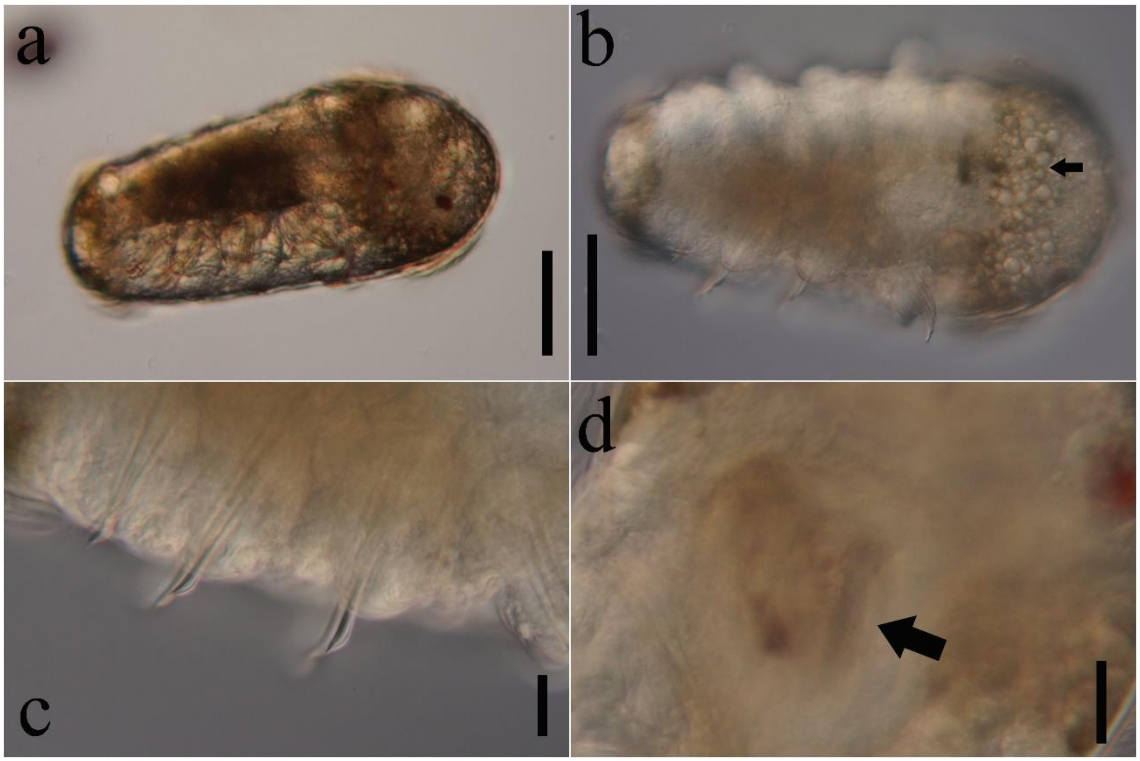

Figura 3.2 Larvas de *D. neapolitana* vivas, com setígeros formados, em microscópio óptico **a** vista lateral da larva; **b** vista dorsal da larva, seta apontando para a banda de células com vitelo; **c** parapódios com cerdas; **d** maxilas, apontadas pela seta. **Escalas: a–b** 100 µm; **c–d** 10 µm.

Cronologia da fertilização *in vitro*

Foram feitos quatro experimentos de fertilização *in vitro*, com temperatura controlada, dois dos quais a 18º C, no LaPol, os demais a 22º C, no CEBIMar. Com a temperatura a 18º C, o número de óvulos fertilizados foi de 90.91 % em uma das placas e 96.24 % na outra; a 22º C, um dos experimentos teve taxa de fertilização de 91.32 % dos óvulos e o segundo, de 100 %. Os tempos de desenvolvimento de cada etapa são descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Tempo de desenvolvimento de cada estágio dos embriões/larvas de *D. neapolitana*, na fertilização *in vitro*, com temperaturas a 18º C e 22ºC.

Estágio de desenvolvimento	**Tempo – 18ºC**	**Tempo – 22ºC**
Formação do envelope de fertilização	30 minutos	20 minutos
Primeira clivagem	1 hora e 30 minutos	40 minutos
Segunda clivagem	2 horas	1 hora
Terceira clivagem	2 horas e 30 minutos	1 hora e 20 minutos
Mórula	4 horas	2 horas
Larvas livre natantes	5 horas e 30 minutos	3 horas e 30 minutos
Formação do tufo apical	21 horas	10 horas
Larvas trocóforas	27 horas	17 horas
Larvas pós-trocóforas	36 horas	27 horas
Aparecimento de cerdas	48 horas	35 horas
Larva com 3 setígeros	72 horas	42 horas
Larva com 4 setígeros	–	54 horas
Larva com 5 setígeros	–	72 horas

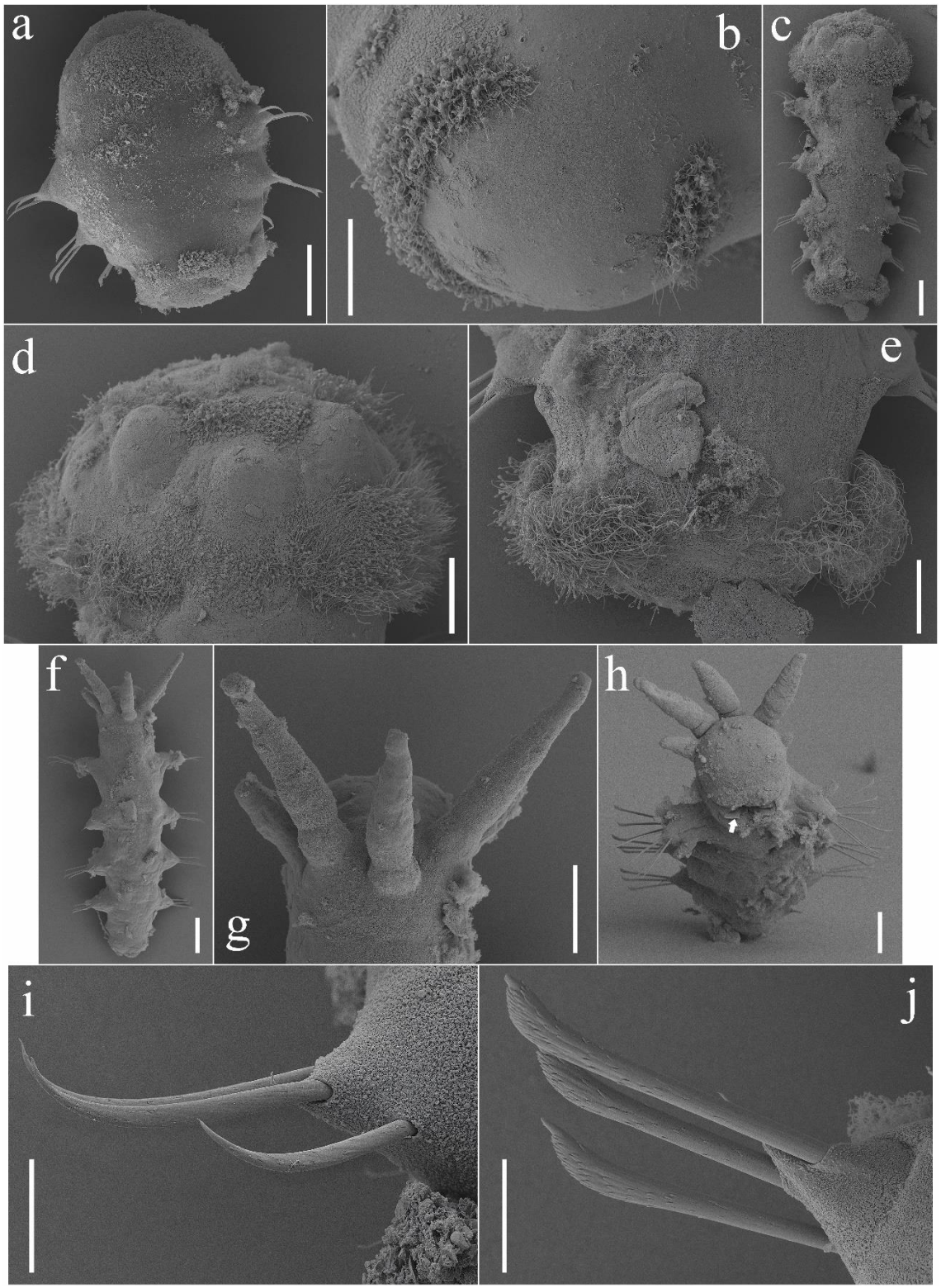

Figura 3.3 Estágios larvais de *D. neapolitana*, em microscópio eletrônico de varredura **a** larva com 3 setígeros; **b** banda ciliar posterior da larva com 3 setígeros; **c** larva com 4 setígeros; **d** região anterior da larva com 4 setígeros, mostrando a banda ciliar e o começo da formação das antenas; **e** região posterior da larva com 4 setígeros, mostrando a banda ciliar; **f** larva com 5 setígeros; **g** região anterior da larva com 5 setígeros, mostrando as antenas e palpos formados; **g** visão ventral da larva com 5 setígeros com cirros dorsal e ventral formados, seta apontando para maxilas bem desenvolvidas e protraídas; **i** cerdas do primeiro parapódio da larva com 3 setígeros; **j** cerdas do terceiro parapódio da larva com 3 setígeros. **Escalas: a, c, f–h** 50 µm; **b, d–e** 25 µm; **i–j** 10 µm.

3.2. Dados sobre a dispersão de gametas

No estudo realizado, não foram observados gametas liberados, zigotos, larvas ou embriões nos tubos em nenhum dos experimentos.

Não houve diferença no padrão de alimentação dos indivíduos isolados durante o estudo, quando comparado aos animais do cultivo de adultos vivos em um mesmo aquário. Um indivíduo do grupo 2, com predominância de gametas masculinos no celoma e na presença de gametas femininos na coluna d'água, apresentou comportamento aberrante, retirando a parte anterior do corpo, até a altura do final da região branquial, para fora do tubo e movimentando muito as brânquias, se mantendo nessa posição por aproximadamente 5 minutos; o comportamento foi repetido várias vezes ao longo dos dias e apenas por esse indivíduo; este comportamento é comum em indivíduos parasitados por digêneas da espécie *Gymnophallus choledochus* (Rangel e Santos, 2009; Arias et al., 2016).

4. Discussão e conclusões

4.1. Fertilização e desenvolvimento

Foram feitos vários experimentos preliminares de fertilização in vitro antes dos 2 experimentos principais, visando entender as principais dificuldades e empecilhos envolvidos. O primeiro problema encontrado foi a baixa taxa de fertilidade do ovócitos,

no experimento teste com melhor resultado, apenas 42.86% dos gametas foram fertilizados, pois não haviam sido retirados do meio os ovócitos imaturos.

Foi observado que nenhum dos ovócitos com menos de 100 µm, ou contendo células acessórias, era fecundado (dado utilizado no capítulo anterior como determinante na identificação dos “gametas imaturos”). Assim, os gametas imaturos foram removidos primeiramente com a lavagem em peneira com malha de 100 µm e, em seguida, mecanicamente, com uma pipeta de boca. Isto conferiu um aumento considerável à taxa de fertilidade.

Outro problema encontrado foi a morte, em vários estágios, de muitos zigotos e larvas, pela contaminação por microrganismos, principalmente bactérias. As medidas tomadas para evitar essa complicação envolvem várias etapas, como a utilização apenas de água do mar do ultrafiltrada (malha de 0.2 µm), durante todo o processo de fertilização e desenvolvimento, acréscimo de penicilina nas primeiras etapas da fertilização, limpeza da placa de petri pouco tempo após o depósito dos espermatozoides e contínua remoção de óvulos não fertilizados e embriões mortos.

Além desses procedimentos, outros cuidados se fizeram necessários, para manter os embriões e larvas vivos, pois estes apresentam fragilidades e peculiaridades em todos os estágios. A utilização da peneira para separar os indivíduos e a troca de água deveriam ser feitas cuidadosamente, pois os animais facilmente se prendem à tela e, consequentemente, morrem, apesar de não passarem pela malha. A precisão da manipulação mecânica é muito maior utilizando uma pipeta de boca, mas com o cuidado de não lesar os animais com a extremidade da pipeta, caso esta apresente alguma irregularidade. As larvas em estágios com setígeros produzem muco e aderem ao fundo do recipiente, dificultando a remoção dos organismos, para a troca completa de água; as larvas também se prendem umas às outras com facilidade, pela copiosa produção de

muco, e devem ser separadas o mais rapidamente possível, para não morrerem. Os espermatozoides dos indivíduos de *D. neapolitana* apresentam dificuldade em ser armazenados, pois estes são ativados em contato com a água do mar, assim como em muitos invertebrados, mas a falta de testículos dificulta a coleta do líquido celômico contendo espermatozoides sem contato com o meio aquoso.

A criação de protocolos de fertilização, incluindo os detalhes que aumentam o sucesso dos experimentos, é muito importante para o conhecimento de biologia reprodutiva, não apenas do grupo estudado.

Houve grande diferença entre os tempos de desenvolvimento de cada estágio entre os experimentos de fertilização *in vitro* realizados a 18º C e 22º C. A 18º C, as larvas não sobreviveram após o estágio de 3 setígeros ou início da formação do quarto setígero, enquanto a 22º C, elas chegaram a 5 setígeros e então não foi possível continuar o experimento, não pela mortalidade das larvas, mas porque foi adicionado substrato e não foi mais possível acompanhá-las. Desses experimentos, se conclui que, no intervalo de temperaturas estudado, o desenvolvimento dos embriões e larvas de *D. neapolitana* é mais lento, quanto menor for a temperatura ambiente, além das larvas apresentam maior mortalidade em temperaturas menores. Além disso a média anual da temperatura da água do mar em São Sebastião é de 21.2ºC, com mínima de 19.8ºC e máxima de 22.6ºC (Global Sea Temperature), mais próximas das fertilizações a 22ºC, justificando a maior velocidade e o desenvolvimento alcançar estágios larvais mais avançados nesta temperatura.

A formação do intestino e das maxilas se dá antes do fim da reserva energética e então as larvas podem se alimentar de microrganismos e algas presentes na água.

Os dados obtidos não possibilitam, sozinhos, tirar conclusões sobre a habilidade de dispersão e invasão de membros de *D. neapolitana* no Brasil, mais especificamente na Baía do Araçá. O sucesso de uma espécie invasora depende de vários fatores, incluindo capacidade de dispersão e adaptações ao novo ambiente (Sakai et al., 2001, Viard et al., 2006). Podemos concluir com o presente trabalho que as larvas de *D. neapolitana* são lecitotróficas, com grande reserva de vitelo e, consequentemente, podem passar os primeiros dias do desenvolvimento sem alimento, além disso o tempo do desenvolvimento varia com a temperatura. Considerando que nos primeiros estágios do desenvolvimento as larvas consomem as reservas nutritivas do óvulo e só posteriormente passam a se alimentar, a introdução da espécie em questão durante a fase larval seria possível por água de lastro em navios. Dando suporte a essa ideia, a Baía do Araçá se encontra muito próxima ao porto de São Sebastião, um dos mais movimentados do Brasil.

4.2. Dispersão de gametas

A literatura disponível sobre métodos reprodutivos de *D. neapolitana* sugere que estes animais liberam os gametas na coluna d'água e a fertilização ocorre ao acaso, método chamado de "broadcast spawners" (Conti et al., 2005; Pires et al., 2012b; Arias et al., 2016). O principal embasamento para essa ideia está pautado na morfologia dos espermatozoides (Conti et al., 2005), considerados como "ect aquasperm", denominação proposta por Jamieson & Rouse (1989), que agrupa os espermatozoides que fertilizam gametas femininos na coluna d'água. Este tipo de espermatozoide apresenta as seguintes características: acrossomo em forma de capuz, núcleo em forma sub esférica, mitocôndrias arredondadas e flagelo longo, com microtúbulos arranjados na composição

9+2. A morfologia dos espermatozoides de membros de *D. neapolitana* se assemelha muito a essas características, como visto anteriormente. O outro tipo de espermatozoides, conforme também definido por Jamieson & Rouse (1989), é o "ent aquasperm", que são liberados na coluna d'água e são atraídos até as fêmeas (ou indivíduos com gametas femininos) de diversas maneiras, como fluxo de água, hormônios, entre outros. As variações morfológicas nos gametas em cada classe são enormes, assim como as semelhanças entre alguns "ect aquasperms" e "ent aquasperms", mas isto porque as definições destas classes são baseadas no modo de ação dos espermatozoides e não em sua morfologia. Ambos os tipos de espermatozoide ocorrem em membros de *Diopatra* (Rouse e Jamieson, 1987) de maneira que a morfologia dos gametas dentro desse gênero é muito variável; há espécies, como *D. marocensis*, cujos membros apresentam cuidado parental (Arias et al., 2013) e, consequentemente, ocorre fertilização interna ao tubo, por "ent aquasperms". Portanto o que define o tipo do espermatozoide é o comportamento do indivíduo que contém os gametas femininos. Deduzir o tipo de liberação de gametas a partir da morfologia dos espermatozoides pode, portanto, levar a erros.

Foram tentados experimentos visando entender o método de liberação e dispersão de gametas em membros de *D. neapolitana*, tanto masculinos quanto femininos, mas estes foram inconclusivos, pois a liberação de gametas não ocorreu. Estes dados são insuficientes para concluir o método de dispersão de gametas da espécie estudada e mais estudos sob esse escopo são necessários. A metodologia criada e apresentada para cultivo dos animais separadamente pode ser útil para trabalhos visando isolar a comunicação direta entre indivíduos.

A observação dos mecanismos de liberação de gametas na coluna d'água e fertilização por "broadcast spawn" é muito difícil, com poucos registros, mesmo em espécies cuja biologia reprodutiva foi bem estudada, como em membros de espionídeos

(Blake e Arnofsky, 1999). Indivíduos de *Scolelepis squamata* estudados na França (Mesnil, 1896) foram caracterizados como "broadcast spawners", pela presença de ovos fertilizados no aquário, embora um estudo com indivíduos de Barbados (Richards, 1970) tenha encontrado espermatóforos, sugerindo que esta espécie apresenta fertilização interna. Em nenhum dos dois estudos foi efetivamente observada a liberação de gametas, o que evidencia a dificuldade em observar esse comportamento. Ainda em relação a espécies de espionídeos, que são dos poucos poliquetas cujos métodos reprodutivos foram bem estudados, há indícios de que a liberação de gametas estaria relacionada a alterações na salinidade (George, 1966), ou a mudanças bruscas na temperatura (Bochert & Bick, 1995). Assim, embora espionídeos e onufídeos sejam famílias muito distante filogeneticamente, essas variáveis também devem ser estudadas em membros de *D. neapolitana*, para verificar se também nestes animais elas exercem um papel importante.

5. Anexos

Todos os vídeos que compõe os anexos estão disponíveis no YouTube, com os links presentes abaixo. Além disso foi criada uma "playlist", com nome de "Dissertação de Mestrado – Gilberto Bergamo", contendo todos estes vídeos para facilitar o acesso: https://www.youtube.com/playlist?list=PLMSlOJwtQM9X2SGz-4Hbsn81TnH6Ue_ZO

Anexo 1 Indivíduo de *D. neapolitana* começando a construção do próprio tubo em aquário – https://youtu.be/BR2JrutuczE

Anexo 2 Indivíduo de *D. neapolitana* coletando alimento de pinça em aquário – https://youtu.be/j8AZJIrPvEg

Anexo 3 Indivíduo de *D. neapolitana* coletando alimento em substrato de aquário – https://youtu.be/RYoLpbWhmxw

Anexo 4 Espermatozoides de *D. neapolitana* – https://youtu.be/sqlvwbGxjH4

Anexo 5 Espermatozoides de *D. neapolitana* – https://youtu.be/zqx-2FkWPhA

Anexo 6 Espermatozoides de *D. neapolitana* – https://youtu.be/J4vqF5OIp6k

Anexo 7 Espermatozoides de *D. neapolitana* – https://youtu.be/Dgeea_ae4-A

Anexo 8 Zigoto de *D. neapolitana*, com foco nas microvilosidades do envelope de fertilização – https://youtu.be/fteolrthHqE

Anexo 9 Ovócito de *D. neapolitana*, do começo da fertilização até o aparecimento do segundo corpúsculo polar, passando pela formação do envelope de fertilização – https://youtu.be/GVvmIAhu22Q

Anexo 10 Zigoto de *D. neapolitana*, da formação do envelope de fertilização até a segunda clivagem – https://youtu.be/zSAJonGludA

Anexo 11 Zigoto de *D. neapolitana* recém fertilizado e as 5 primeiras clivagens, filmado em time lapse – https://youtu.be/_0DYusMuocg

Anexo 12 Larva livre natante de *D. neapolitana* em estágio inicial, com foco nos cílios, filmado em câmera lenta – https://youtu.be/qacjfOIKCVI

Anexo 13 Larva livre natante de *D. neapolitana* em estágio inicial, filmado em câmera lenta – https://youtu.be/dL6pt-e0WFA

Anexo 14 Larva livre natante de *D. neapolitana* em estágio inicial, mostrando rotação no próprio eixo – https://youtu.be/jTXvao5vN70

Anexo 15 Larva livre natante de *D. neapolitana* em estágio inicial, mostrando rotação no próprio eixo, filmado em câmera lenta – https://youtu.be/64q5RyRXmtI

Anexo 16 Larva livre natante de *D. neapolitana*, mostrando rotação no próprio eixo, filmado em câmera lenta – https://youtu.be/u09G3xNB-LM

Anexo 17 Larva livre natante de *D. neapolitana*, mostrando o batimento ciliar ao longo do corpo, filmado em câmera lenta – https://youtu.be/_qjUCBcRZn4

Anexo 18 Larva livre natante de *D. neapolitana*, mostrando o batimento ciliar ao longo do corpo, filmado em câmera lenta – https://youtu.be/OyvEUtcbggI

Anexo 19 Larva livre natante de *D. neapolitana*, mostrando o batimento ciliar com foco nos cílios, filmado em câmera lenta – https://youtu.be/5vw-3PjXvhs

Anexo 20 Larva livre natante de *D. neapolitana*, mostrando o batimento ciliar com foco nos cílios, filmado em câmera lenta – https://youtu.be/xkk8G9waCsg

Anexo 21 Natação da larva livre natante de *D. neapolitana*, com rotação em sentido anti-horário – https://youtu.be/3ry4Drwv9vk

Anexo 22 Larvas livre natantes concentradas na superfície da água, se movimentando a partir dos indivíduos da borda – https://youtu.be/WwRDWLDzNrs

Anexo 23 Natação da larva trocófora de *D. neapolitana* – https://youtu.be/WVxKuF_sWsQ

Anexo 24 Larva trocófora de *D. neapolitana* – https://youtu.be/zsm0Ge2Wy-c

Anexo 25 Larva trocófora de *D. neapolitana* com foco nas manchas avermelhadas e células com vitelo na região anterior – https://youtu.be/xrTrLJli5zM

Anexo 26 Estágio intermediário de larva trocófora e pós-trocófora de *D. neapolitana*, ligeiramente mais cumprida do que a trocófora e com começo da formação do intestino– https://youtu.be/nm3ezpQrzVE

Anexo 27 Larva com setígeros de *D. neapolitana*, mostrando as duas bandas ciliares – https://youtu.be/LJpoVWQK8EY

Anexo 28 Larva com setígeros de *D. neapolitana*, mostrando as duas bandas ciliares, filmado em câmera lenta – https://youtu.be/JaWpBaH364Y

Anexo 29 Natação das larvas com setígeros de *D. neapolitana* – https://youtu.be/MEC_u2Rsais

Anexo 30 Natação das larvas com setígeros de *D. neapolitana* – https://youtu.be/6hebFrto-KU

Anexo 31 Natação das larvas com setígeros de *D. neapolitana* – https://youtu.be/bbuhmGeI_LE

Anexo 32 Natação das larvas com setígeros de *D. neapolitana* – https://youtu.be/Q_DCI2MedCg

Anexo 33 Natação das larvas com setígeros de *D. neapolitana* – https://youtu.be/HzLDKwC6e4c

Anexo 34 Larva com setígeros de *D. neapolitana*, com foco nas maxilas recém formadas, com coloração clara e dentes mal definidos – https://youtu.be/hiDLcCn2ddM

Anexo 35 Larva com setígeros de *D. neapolitana*, com foco nas cerdas, nas bandas ciliares, na região do intestino, nas células com vitelo e na região das maxilas – https://youtu.be/havB_iyqDsM

Anexo 36 Larva com setígeros de *D. neapolitana*, em vários planos de foco – https://youtu.be/P7R8Xn_Mejk

Anexo 37 Larva com setígeros de *D. neapolitana*, fixada ao fundo da cuba por muco, com foco nas maxilas – https://youtu.be/G8SxLhRzjmo

Anexo 38 Larva com setígeros de *D. neapolitana* com maxilas bem desenvolvidas, começando a escurecer – https://youtu.be/8sJ4xA_rX6Q

Anexo 39 Larva com setígeros de *D. neapolitana* com maxilas bem desenvolvidas, começando a escurecer, filmado em câmera lenta – https://youtu.be/8QuCCzMj-ME

Anexo 40 Larva com setígeros de *D. neapolitana*, com foco nas maxilas bem desenvolvidas – https://youtu.be/Xw19w_dmMjA

Conclusões gerais e perspectivas

Considerando os indivíduos coletados no presente trabalho, todos provenientes da Baía do Araçá em São Sebastião, é possível afirmar que estes pertencem à espécie *Diopatra neapolitana* Della Chiaje, 1841, com embasamento em caracteres morfológicos e dados moleculares. A localidade tipo da espécie em questão é o Mar Mediterrâneo, mais especificamente a Baía de Pozzuoli, no Golfo de Napoles, Itália. Portanto, é muito provável que *D. neapolitana* seja uma espécie introduzida no Brasil. Não é descartada a possibilidade de existirem outras espécies de *Diopatra* na Baía do Araçá, como trabalhos anteriores sugerem, principalmente porque as coletas foram restritas a um ponto da baía, visando coletar indivíduos de uma mesma população para realização dos estudos de biologia reprodutiva. Uma perspectiva importante para o futuro é comparar os indivíduos coletados neste trabalho com os poliquetas do gênero *Diopatra* coletados nos trabalhos anteriores, na mesma localidade e descritos como pertencentes a outras espécies, principalmente relacionando caracteres morfológicos e, quando possível, dados moleculares, que dependem do modo de fixação dos espécimes. Também seria interessante ter acesso ao neótipo, descrito por Arias et al. (2016), para comparar com os indivíduos descritos nesta dissertação. Os dados moleculares sugerem que *D. aciculata* e *D. dentata* pertencem, na verdade à espécie *D. neapolitana*, porém estudos moleculares considerando outros marcadores (principalmente nucleares) serão importantes para garantir esta hipótese.

Assim como os indivíduos da série tipo, os animais do presente estudo também apesentam hermafroditismo sequencial protândrico, isto é, estes anelídeos nascem machos, se transformam em um momento da vida em hermafroditas, produzindo gametas

masculinos e femininos concomitantemente e depois passam a ser fêmeas. A troca de gênero sexual está relacionada ao tamanho, portanto os indivíduos menores costumam ser machos e os maiores, fêmeas, com os hermafroditas ocupando as posições intermediarias de tamanho corporal em uma amostragem populacional. A característica que evidencia este comportamento é a presença de papilas espermoducais na região dorsal dos hermafroditas, estrutura que produz os espermatozoides. Nos indivíduos de Nápoles, estas papilas são sempre muito desenvolvidas, enquanto nos exemplares da Baía do Araçá existem diferentes graus de desenvolvimentos das papilas, possivelmente relacionados a estágios intermediários na troca de gêneros, em que as papilas podem estar começando a se desenvolver ou regredindo. Análises histológicas e de micro tomografia computadorizada (microCT), em conjunto, poderão esclarecer melhor o estágio de desenvolvimento e estrutura interna das papilas quando estas não estão totalmente desenvolvidas, podendo também definir melhor o processo de mudança de gênero, no hermafroditismo sequencial.

A morfologia dos espermatozoides analisados é muito semelhante, como esperado, ao descrito na literatura. Porém a espermatogênese nos animais deste estudo apresenta dois caminhos diferentes, sendo o primeiro caracterizado pela formação de mórulas espermáticas, muito comum em outros grupos de poliquetas, e o segundo relacionado à maturação dos espermatozoides no aglomerado de células ligadas pelo citóforo, processo raro em outros grupos de Annelida. Mais rara ainda é a presença de dois caminhos possíveis para formação de gametas masculinos. Uma hipótese levantada relaciona este mecanismo ao controle da disponibilidade de espermatozoides maduros ao longo de todo o ano, possível se cada modo de espermiogênese apresentar tempo de maturação diferente para os gametas. Portanto, mais estudos sobre a espermatogênese destes animais devem ser conduzidos, principalmente utilizando a histologia e

microscopia eletrônica de transmissão, para esclarecer melhor as características de cada caminhos de maturação dos espermatozoides e se estes dois processos estão presentes tanto em machos, quanto em hermafroditas. Logo, estas perspectivas futuras devem incluir também o estudo das papilas sob os métodos supracitados.

Quanto aos gametas femininos, o foco do presente trabalho foi tentar entender o ciclo reprodutivo anual destes animais, baseado nos ovócitos, sem foco na ovogênese. Os resultados obtidos demonstram que, diferente de populações de *D. neapolitana* de outras localidades já estudadas, a população da Baía do Araçá não apresenta picos reprodutivos claros, relacionados a períodos de produção, maturação e liberação de gametas femininos. Nos indivíduos da Baía do Araçá estudados, a reprodução se mostra assíncrona, com produção de novos gametas e maturação dos presentes no celoma ocorrendo concomitantemente. Este dado é evidenciado pela presença simultânea de gametas imaturos e maduros, em indivíduos coletados em todos os meses. Além disso, estudos do tamanho dos ovócitos ao longo do ano e entre as diferentes classes de tamanho dos indivíduos não mostraram diferenças significativas. Para a população estudada a proporção de gametas imaturos e maduros no celoma se mostra mais eficaz em explicar os padrões reprodutivos, dado coerente com a reprodução assíncrona; deve-se ressaltar que, devido à presença de gametas no celoma ao longo de todo o ano, uma maior proporção de gametas imaturos aponta para desovas recentes. Portanto, para a população estudada nesta Dissertação, a desova está relacionada ao tamanho do corpo de cada indivíduo. Para dar mais suporte a estes dados, seria interessante um estudo mais extenso do ciclo de vida de *D. neapolitana* na Baía do Araçá, de pelo menos 2 anos.

A taxa de indivíduos partidos ou fragmentados foi enorme nas coletas realizadas. É possível observar dois padrões de fragmentação, um mais irregular e possivelmente relacionado a predação, ou a danos causados aos indivíduos durante a coleta, e outro mais

regular, possivelmente relacionado a autotomia da porção posterior do corpo, comportamento registrado em cultivo destes animais vivos. Estes fragmentos autotomizados se mantiveram vivos, com movimentação, por dois dias. Por serem pedaços da região posterior, estes apresentavam grande quantidade de gametas no celoma. Somado a isto, indivíduos de *D. neapolitana* apresentam grande capacidade de regeneração, levantando a dúvida sobre a possibilidade deste comportamento de autotomia estar relacionado à reprodução, mais especificamente à dispersão de gametas. Trabalhos de comportamento com indivíduos adultos vivos auxiliariam na resolução desta questão.

Porém, esta seria apenas mais uma estratégia reprodutiva, pois a liberação e dispersão de gametas destes animais é descrita na literatura como "broadcast spawn". Este método não está descartado, nos animais da Baía do Araçá, apesar deste estudo não ter identificado a liberação de gametas na coluna d'água, como seria esperado para esta estratégia. A observação da liberação de gametas é muito difícil, porém em outros grupos de poliquetas este fenômeno pode ser induzido por mudanças na salinidade e temperatura da água, portanto estudos futuros com *D. neapolitana* podem considerar a utilização destas variáveis.

O estudo da fertilização *in vitro* e desenvolvimento das larvas de *D. neapolitana* demonstrou que a temperatura da água é um fator importante no tempo de desenvolvimento, evidenciado pela mudança de fases larvais. Além disso a formação das maxilas e produção de muco, associado ao assentamento e formação do tubo, ocorrem nas larvas enquanto ainda existe uma reserva grande de vitelo, característica comum em animais do gênero *Diopatra*. Portanto, considerando que esta é uma espécie invasora para o Brasil, existe a possibilidade de a dispersão das larvas ter ocasionado a invasão, principalmente por água de lastro dos navios. Mas não deve ser descartada a utilização de

D. neapolitana como isca de peixe e a comercialização destes animais por navios, documentada desde o século 19, que pode, também, ter possibilitado o processo de invasão. Logo não há como afirmar, com os dados atuais, o modo de introdução destes animais e principalmente se é recente ou não, mas as perspectivas apresentadas podem auxiliar, juntas, nesta resolução. A comparação, apresentada anteriormente, dos indivíduos de *Diopatra* coletados previamente na Baía do Araçá com os do presente trabalho pode estabelecer uma perspectiva cronológica mais exata da introdução desta espécie. Por fim, uma descrição melhor do desenvolvimento larval será possível com microscopia eletrônica de transmissão dos cortes das larvas e microscopia confocal, que possibilitará o estudo de desenvolvimento dos cílios, da musculatura e estruturas prostomiais e também sensoriais. Os diferentes estágios larvais foram fixados de modo específico para realização destes estudos, com solução de trialdeído para microscopia eletrônica de transmissão e com formol para a confocal, de maneira que estas análises serão realizadas em um futuro próximo.

Bibliografia

AKAIKE, H. Maximum likelihood identification of Gaussian autoregressive moving average models. **Biometrika**, v. 60, n. 2, p. 255-265, 1973.

ALLEN, M. J. Embryological development of the polychaetous annelid, Diopatra cuprea (Bosc). **The Biological Bulletin**, v. 116, n. 3, p. 339–361, 1959.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

AMARAL, A. C. Z.; MIGOTTO, A. E.; TURRA, A.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Araçá: biodiversidade, impactos e ameaças. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 219–264, 2010.

AMARAL, A. C. Z.; NALLIN, S. A. H.; STEINER, T. M.; FORRONI, T. O.; GOMES-FILHO, D. Catálogo das espécies de Annelida Polychaeta do Brasil. **Campinas, Unicamp**, p. 183, 2013.

AMOUREUX, L.; RULLIER, F.; FISHELSON, L. Systématique et écologie d'annélides polychètes de la presqu'il du Sinai. **Israel Journal of Zoology**, v. 27, n. 2-3, p. 57-163, 1978.

ARIAS, A.; PAXTON, H.; BUDAEVA, N. Redescription and biology of Diopatra neapolitana (Annelida: Onuphidae), a protandric hermaphrodite with external spermaducal papillae. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 174, p. 1–17, 2016.

ARIAS, A.; RICHTER, A.; ANADÓN, N.; PAXTON, H. Evidence of simultaneous hermaphroditism in the brooding Diopatra marocensis (Annelida: Onuphidae) from northern Spain. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 93, n. 06, p. 1533–1542, 2013.

AUDOUIN, J. V.; MILNE-EDWARDS, H. Classification des annelides, et description de celles qui habitent les cotes de la France. **Annales des Sciences Naturelles**, v. 1, n. 29, p. 195–269, 1833.

AUGENER, H. Polychaeta. Beiträge zur Kenntnis des Meeresfauna Westafrikas. **Herausgegeben von W. Michaelsen**, v. 2, p. 67–625, 1918.

BERGLUND, A. Sequential hermaphroditism and the size-advantage hypothesis: an experimental test. **Animal Behaviour**, v. 39, n. 3, p. 426–433, 1990.

BERK, S. K.; MAHON, A. R.; LIMA, F. P.; HALANYCH, K. M.; WETHEY, D. S.; WOODIN, S. A. Range shifts and species diversity in marine ecosystem engineers: patterns and predictions for European sedimentary habitats. **Global Ecology and Biogeography**, v. 19, n. 2, p. 223-232, 2010.

BHAUD, M.; CAZAUX, C. Description and identification of polychaete larvae: their implications in current biological problems. **Oceanis**, v. 13, p. 596–753, 1987.

BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–155, 2007.

BLAKE, J. A.; ARNOFSKY, P. L. Reproduction and larval development of the spioniform Polychaeta with application to systematics and phylogeny. **Hydrobiologia**, v. 402, p. 57–106, 1999.

BOCHERT, R.; BICK, A. Reproduction and larval development of Marenzelleria viridis (Polychaeta: Spionidae). **Marine Biology**, v. 123, n. 4, p. 763–773, 1995.

BOSC, L. A. G. Histoire naturelle des vers contenant leur description et leurs moeurs, avec figures dessinées d'après nature. **De l'imprimerie de Guilleminet, a Paris**, v. 1, p. 324, 1802.

BUDAEVA, N.; FAUCHALD, K. Phylogeny of the Diopatra generic complex with a revision of Paradiopatra Ehlres, 1887 (Polychaeta: Onuphidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 163, n. 2, p. 319–436, 2011.

BUDAEVA, N.; SCHEPETOV, D.; ZANOL, J.; NERETINA, T.; WILLASSEN, E. When molecules support morphology: Phylogenetic reconstruction of the family Onuphidae (Eunicida, Annelida) based on 16S rDNA and 18S rDNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 94, p. 791–801, 2016.

BYBEE, D. R.; BAILEY-BROCK, J. H.; TAMARU, C. S. Gametogenesis and spawning periodicity in the fan worm Sabellastarte spectabilis (Polychaeta: Sabellidae). **Marine Biology**, v. 151, n. 2, p. 639–648, 2007.

CAZAUX, C. Recherches sur l'écologie et le développement larvaires des Polychètes de la région d'Arcachon. Doutorado—França: Université de Bordeaux, 1970.

CHOE, S. On the life history of the polychaete worm, Diopatra neapolitana Delle Chiaje. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 26, p. 430–437, 1960.

ÇINAR, M. E. Alien polychaete species worldwide: current status and their impacts. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 93, n. 05, p. 1257–1278, 2013.

CONTI, G.; LOFFREDO, F.; LANTINI, M. S. Fine structure of the spermatozoon of Diopatra neapolitana (Polychaeta, Onuphidae). **Zoomorphology**, v. 124, n. 3, p. 155–160, 2005.

CONTI, G.; MASSA, F. Experienze de allavamento del polichete Diopatra neapolitana Delle Chiaje, 1841 nella Laguna di S. Gilla (Sardegna Meridionale). **Biologia Marina Meditteranea**, v. 5, n. 3, p. 1473–1480, 1998.

CUNHA, T.; HALL, A.; QUEIROGA, H. Estimation of the Diopatra neapolitana annual harvest resulting from digging activity in Canal de Mira, Ria de Aveiro. **Fisheries Research**, v. 76, n. 1, p. 56–66, 2005.

DAGLI, E.; ERGEN, Z.; CINAR, M. E. One-year observation on the population structure of Diopatra neapolitana Delle Chiaje (Polychaeta: Onuphidae) in Izmir Bay (Aegean Sea, eastern Mediterranean). **Marine Ecology**, v. 26, n. 3–4, p. 265–272, 2005.

DAY, J. H. The polychaet fauna of South Africa. Part 5. Errant species dredged off Cape coasts. **Annals of South African Museum**, v. 45, p. 261–373, 1960.

DAY, J. H. A monograph on the Polychaeta of Southern Africa. **British Museum of Natural History**, v. 656, p. 1–878, 1967.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 407-415, 2005.

de QUATREFAGES, A. M. Histoire Naturelle des Annelides, Marine et d'Eau Douce. Annelides et gephyriens. Librairie **Encyclopedique de Roret**, v. 2, p. 67-70, 1866.

DELLE CHIAJE, S. Descrizione e notomia degli animali invertebrati della Sicilia citeriore : osservati vivi negli anni 1822-1830. v. Tome 5, 1841.

DI DOMENICO, M. Poliquetas intersticiais da costa sul e sudeste do Brasil . Doutorado—Brasil: Universidade Federal do Paraná, 2012.

ECKELBARGER, K. J. Ultrastructure of spermatogenesis in the reef-building polychaete Phragmatopoma lapidosa (Sabellariidae) with special reference to acrosome morphogenesis. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 89, n. 2, p. 146–164, 1984.

ECKELBARGER, K. J.; YOUNG, C. M. Spermiogenesis and Modified Sperm Morphology in the "Seepworm" Methanoaricia dendrobranchiata (Polychaeta: Orbiniidae) From a Methane Seep Environment in the Gulf of Mexico: Implications for Fertilization Biology. **The Biological Bulletin**, v. 203, n. 2, p. 134–143, 2002.

EHLERS, E. Reports on the results of dredging, under the direction of L.F. Pourtales, during the years 1868–1870, and of Alexander Agassiz, in the Gulf of Mexico (1877–78), and in the Caribbean Sea (1878–79), in the U.S. Coast Survey Steamer "Blake", Lieut.-Com. C.D. Sigsbee, U.S.N., and Commander J. R. Bartlett, U.S.N., commanding. 31. Report on the annelids. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College**, v. 15, p. 1–335, 1887.

FADLAOUI, S.; LECHAPT, J. P.; RETIERE, C. Larval Development of the Onuphid Diopatra Marocensis (Annelida: Polychaeta) From the Atlantic Coast of Morocco. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 75, n. 04, p. 957, 1995.

FAUCHALD, K. Onuphidae (Polychaeta) from western Mexico. **Allan Hancock Monographs in Marine Biology**, v. 3, p. 1–82, 1968.

FAUCHALD, K. A Review of the Genus Eunice (Polychaeta: Eunicidae) Based upon Type Material. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 523, p. 1–422, 1992.

FAUCHALD, K.; JUMARS, P. A. The diet of worms: a study of polychaete feeding guilds. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review**, v. 17, p. 193-284, 1979.

FAUVEL, P. Polychètes errantes. **Faune de France**, v. 5, p. 1-488, 1923

FAUVEL, P. Annélides polychètes du Golfe du Pei Tcheu Ly de la collection du Musée Hoang ho Pai ho. **Publication Musée Hoangho Paiho de Tien-Tsin**, v. 15, p. 1–67, 1933.

FAUVEL, P. Annelida Polychaeta. The Fauna of India, including Pakistan, Ceylon, Burma and Malaya. **Allahabad, The Indian Press**, p. 507, 1953.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, p. 294–299, 1994.

GEORGE, J. D. Reproduction and early development of the spionid polychaete, Scolecolepides viridis (Verrill). **The Biological Bulletin**, v. 130, n. 1, p. 76–93, 1966.

GIANGRANDE, A. Polychaete reproductive patterns, life cycles and life histories: an overview. **Oceanography and marine Biology**, v. 35, p. 323-386, 1997.

GIANGRANDE, A.; LICCIANO, M.; PAGLIARA, P.; GAMBI, M. C. Gametogenesis and larval development in Sabella spallanzanii (Polychaeta: Sabellidae) from the Mediterranean Sea. **Marine Biology**, v. 136, n. 5, p. 847–861, 2000.

GIESE, A. C. Comparative Physiology: Annual Reproductive Cycles of Marine Invertebrates. **Annual Review of Physiology**, v. 21, n. 1, p. 547–576, 1959.

GRUBE, A. E. Die Familien der Anneliden. **Archiv für Naturgeschichte**, v. 16, p. 249–364, 1850.

HARTMAN, O. Polychaetous Annelids Part V Eunicea. **Allan Hancock Foundation**, v. 10, p. 236, 1944.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.

IZUKA, A. On two new species of annelids belonging to the Eunicidae. **Dobutsugaku Zasshi**, v. 233, p. 139-143, 1907.

JAMIESON, B. G. M.; ROUSE, G. W. The spermatozoa of the Polychaeta (Annelida): an ultrastructural review. **Biological Reviews**, v. 64, n. 2, p. 93–157, 1989.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, A.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KINBERG, J. G. H. Annulata nova. **Ofversigt af Kongliga Vetenskaps-Akademiens Forhandlingar**, v. 21, P. 559-574, 1865.

KNOX, G. A.; CAMERON, D. B. Port Phillip Bay survey 1957–1963. Part 2(4) Polychaeta. **Memoirs of the National Museum of Victoria**, v. 32, p. 21–42, 1971.

LO BIANCO, S. Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturita sessuale degli animali del Golfo di Napoli. **Mittheilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel**, v. 13, p. 448–573, 1899.

LOPEZ, P. P. Estrutura da comunidade de poliquetos da zona entremares da região de Araça, São Sebastião (SP). Mestrado—Brasil: Universidade Estadual de Campinas, 1993.

LOURIDO, A.; CACABELOS, E.; TRONCOSO, J. S. Patterns of distribution of the polychaete fauna in subtidal soft sediments of the Ría de Aldán (north-western Spain). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 88, n. 2, p. 263-275, 2008.

MALMGREEN, A. J. Annulata Polychaeta: Spetsbergiae, Groenlandiae, Islandiae et Scandinaviae. Hactenus cognita. **Ex Officina Frenckelliana**, v. 24, p. 127-235, 1867.

MESNIL, F. Études de morphologie externe chez les annélides, 1. Les spionidens des côtes de la marche. **Bulletin Scientifique de la France et de la Belgique**, v. 29, p. 110–287, 1896.

MICHAELSEN, W. Clitellata = Gürtelwürmer in Kükenthal, W. (ed), **Handbuch der Zoologie**, p. 1–118, 1928–1932.

MILNE-EDWARDS, H. Les annélides. In: Histoire naturelle des animaux sans vertèbres (J.B.P.A. de Lamarck), 2nd ed. by G.P. Deshayes and H. Milne-Edwards. **Bailliere**, v. 5, p. 699, 1838.

MONRO, C. C. A. Polychaete worms. **Discovery Reports**, v. 2, p. 222, 1930.

NYGREN, A. Cryptic polychaete diversity: a review. **Zoologica Scripta**, v. 43, n. 2, p. 172–183, 2014.

OLIVE, P. J. W.; KYRIACOU, C. P.; LAST, K. S.; KRAMER, C.; BAILHACHE, T.; ROSATO, E. Dancing to the rhythms of geological time: the biorhythm capabilities

of Polychaeta in a geological context. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 48, n. 1–3, p. 197–206, 2005.

PACEY, A. A.; BENTLEY, M. G. An ultrastructural study of spermatogenesis and sperm morula breakdown in Arenicola marina (L.) (Annelida: Polychaeta). **Helgoländer Meeresuntersuchungen**, v. 46, n. 2, p. 185–199, 1992.

PAXTON, H. Generic revision and relationships of the family Onuphidae (Annelida: Polychaeta). **Records of the Australian Museum**, v. 38, n. 1, p. 1–74, 1986.

PAXTON, H. Diopatra Audouin and Milne-Edwards (Polychaeta: Onuphidae) from Australia, with a discussion of developmental patterns in the genus. **The Beagle, Records of the Northern Territory Museum of Arts and Sciences**, v. 10, p. 115–154, 1993.

PAXTON, H. Replacement of adult maxillary jaws in Eunicida (Polychaeta). **Scientia Marina**, v. 70, n. S3, p. 331–336, 2006.

PAXTON, H.; ARIAS, A. Unveiling a surprising diversity of the genus Diopatra Audouin & Milne-Edwards, 1833 (Annelida: Onuphidae) in the Macaronesian region (eastern North Atlantic) with the description of four new species. **Zootaxa**, v. 4300, n. 4, p. 505-535, 2017.

PAXTON, H.; FADLAOUI, S.; LECHAPT, J. P. Diopatra Marocensis, a New Brooding Species of Onuphidae (Annelida: Polychaeta). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 75, n. 04, p. 949-955, 1995.

PEARSE, J. S. Reproduction of Marine Invertebrates: Annelids and Echiurans. **Academic Press**, v. 3, 1975.

PIRES, A.; FREITAS, R.; QUINTINO, V.; RODRIGUES, A. M. Can Diopatra neapolitana (Annelida: Onuphidae) regenerate body damage caused by bait digging or predation? **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 110, p. 36–42, 2012a.

PIRES, A.; GENTIL, F.; QUINTINO, V.; RODRIGUES, A. M. Reproductive biology of Diopatra neapolitana (Annelida, Onuphidae), an exploited natural resource in Ria de Aveiro (Northwestern Portugal). **Marine Ecology**, v. 33, n. 1, p. 56–65, 2012b.

PIRES, A.; PAXTON, H.; QUINTINO, V.; RODRIGUES, A. M. Diopatra (Annelida: Onuphidae) diversity in European waters with the description of Diopatra micrura, new species. **Zootaxa**, v. 2395, n. 1, p. 17-33, 2010.

PIRES, A.; QUINTINO, V.; GENTIL, F.; FREITAS, R.; RODRIGUES, A. M. Reproductive biology of a brooding Diopatra species: Diopatra marocensis Paxton et al., 1995. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 110, p. 85–92, 2012c.

POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

RANGEL, L. F.; SANTOS, M. J. Diopatra neapolitana (Polychaeta: Onuphidae) as a second intermediate host of Gymnophallus choledochus (Digenea: Gymnophallidae) in the Aveiro Estuary (Portugal): distribution within the host and histopathology. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 5, p. 1233-1236, 2009.

REUNOV, A. A.; YURCHENKO, O. V.; ALEXANDROVA, Y. N.; RADASHEVSKY, V. I. Spermatogenesis in Boccardiella hamata (Polychaeta: Spionidae) from the Sea of Japan: sperm formation mechanisms as characteristics for future taxonomic revision. **Acta Zoologica**, v. 91, n. 4, p. 447–456, 2010.

RICHARDS, S. L. Spawning and reproductive morphology of Scolelepis squamata (Spionidae: Polychaeta). **Canadian Journal of Zoology**, v. 48, n. 6, p. 1369–1379, 1970.

RODRIGUES, A. M.; PIRES, A.; MENDO, S.; QUINTINO, V. Diopatra neapolitana and Diopatra marocensis from the Portuguese coast: Morphological and genetic comparison. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 85, n. 4, p. 609-617, 2009.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

ROUSE, G. W.; FAUCHALD, K. Cladistics and polychaetes. **Zoologica Scripta**, v. 26, p. 139–204, 1997.

ROUSE, G. W.; FITZHUGH, K. Broadcasting fables: Is external fertilization really primitive? Sex, size, and larvae in sabellid polychaetes. **Zoologica Scripta**, v. 23, n. 4, p. 271–312, 1994.

ROUSE, G. W.; JAMIESON, B. G. M. An ultrastructural study of the spermatozoa of the polychaetes Eurythoe complanata (Amphinomidae), Clymenella sp. and Micromaldane sp. (Maldanidae), with definition of sperm types in relation to reproductive biology. **Journal of Submicroscopic Cytology**, v. 19, p. 573–584, 1987.

ROUSE, G. W.; PLEIJEL, F. Polychaetes. **Oxford University Press**, p. 354, 2001.

ROUSE, G. W.; PLEIJEL, F. Reproductive biology and phylogeny of Annelida. **Science Publishers**, v. 4, 2006.

SÁ, E.; e COSTA, P. F.; da FONSECA, L. C.; ALVES, A. S.; CASTRO, N.; dos SANTOS CABRAL, S.; CHAINHO, P.; CANNING-CLODE, J.; MELO, P.;

POMBO, A. M.; COSTA, J. L. Trade of live bait in Portugal and risks of introduction of non-indigenous species associated to importation. **Ocean & Coastal Management**, v. 146, p. 121–128, 2017.

SAKAI, A. K.; ALLENDORF, F. W.; HOLT, J. S.; LODGE, D. M.; MOLOFSKY, J.; WITH, K. A.; BAUGHMAN, S.; CABIN, R. J.; COHEN, J. E.; ELLSTRAND, N. C.; MCCAULEY, D. E.; O'NEIL, P.; PARKER, I. M.; THOMPSON, J. N.; WELLER, S. G. The Population Biology of Invasive Species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 32, n. 1, p. 305–332, 2001.

SELIM, S. A.; NABY, F. A.; GAB-ALLA, A. A. F. A.; GHOBASHY, A. Gametogenesis and spawning of *Spirobranchus tetraceros* (Polychaeta, Serpulidae) in Abu Kir Bay, Egypt. **Mediterranean Marine Science**, v. 6, n. 1, p. 89, 2005.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

STEINER, T. Estudo Taxonômico da Família Onuphidae (Annelida, Polychaeta) das Regiões Sudeste e Sul do Brasil. Doutorado—Universidade de São Paulo, 2005.

STRUCK, T. Phylogeny of Annelida. In: **Handbook of Zoology: A Natural History of the Phyla of the Animal Kingdom Annelida**, p. 1–23, 2012.

STRUCK, T.; PURSCHKE, G.; HALANYCH, K. M. Phylogeny of Eunicida (Annelida) and exploring data congruence using a partition addition bootstrap alteration (PABA) approach. **Systematic Biology**, v. 55, n. 1, p. 1-20, 2006.

TAVARÉ, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. **Lectures on mathematics in the life sciences**, v. 17, n. 2, p. 57-86, 1986.

VIARD, F.; ELLIEN, C.; DUPONT, L. Dispersal ability and invasion success of Crepidula fornicata in a single gulf: insights from genetic markers and larval-dispersal model. **Helgoland Marine Research**, v. 60, n. 2, p. 144–152, 2006.

WEHE, T.; FIEGE, D. Annotated checklist of the polychaete species of the seas surrounding the Arabian Peninsula: Red Sea, Gulf of Aden, Arabian Sea, Gulf of Oman, Arabian Gulf. **Fauna of Arabia**, v. 19, p. 7-238, 2002.

WEIGERT, A.; BLEIDORN, C. Current status of annelid phylogeny. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 16, n. 2, p. 345–362, 2016.

WILSON, W. H. Sexual Reproductive Modes in Polychaetes: Classification and Diversity. **Bulletin of Marine Science**, v. 48, p. 17, 1991.

ZANOL, J.; HALANYCH, K. M.; STRUCK, T. H.; FAUCHALD, K. Phylogeny of the bristle worm family Eunicidae (Eunicida, Annelida) and the phylogenetic utility of noncongruent 16S, COI and 18S in combined analyses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 2, p. 660-676, 2010.