



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

FRANCISCA ANDRÉA DA SILVA OLIVEIRA

Filogenia de Didemnidae Giard, 1872 (Tunicata: Ascidiacea)

FORTALEZA

2015

FRANCISCA ANDRÉA DA SILVA OLIVEIRA

Filogenia de Didemnidae Giard, 1872 (Tunicata: Ascidiacea)

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Marinhas.

Orientador: Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Rui Simões de Menezes

O47f Oliveira, Francisca Andréa da Silva.

Filogenia de Didemnidae Giard, 1872 (Tunicata: Ascidiacea) / Francisca Andréa da Silva Oliveira.
– 2015.

117 f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientação: Prof. Dr.º Tito Monteiro da Cruz Lotufo.

1. Ascidiacea. 2. Didemnum. 3. Morfologia. I. Título.

CDD 596.2

FRANCISCA ANDRÉA DA SILVA OLIVEIRA

Filogenia de Didemnidae Giard, 1872 (Tunicata: Ascidiacea)

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Marinhas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo (Orientador)

Universidade de São Paulo – Instituto Oceanográfico

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

Universidade Federal do Ceará

Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR

Prof. Dr. Vicente Vieira Faria

Universidade Federal do Ceará – UFC

Departamento de Biologia

Prof. Dr. Luís Ernesto Arruda Bezerra

Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA

Departamento de Ciências Animais

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Universidade Federal do Ceará – UFC

Departamento de Biologia

Ao Clerton e Thaís, por todo amor,
compreensão e palavras de incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Tito Lotufo, por todo o ensinamento, amizade, apoio e orientação. Meus sinceros agradecimentos e admiração!

Ao Dr. Gustav Paulay, pela colaboração, orientação e por me receber para período sanduíche em seu laboratório no *Florida Museum of Natural History, University of Florida*. Agradeço ainda por fornecer acesso ao material utilizado nesse estudo.

Ao Dr. François Michonneau, pela colaboração, ensinamentos e ajuda no *Florida Museum of Natural History, University of Florida*.

Ao prof. Dr. Vicente Vieira Faria, por sua amizade, conversas, conselhos e todo apoio durante a etapa final na realização desse trabalho.

Ao prof. Dr. Rodrigo Maggioni, pelas valiosas contribuições, ensinamentos e por ceder durante esse último ano a infraestrutura de seu laboratório para a conclusão do presente estudo. Muito obrigada!

Ao prof. Dr. Luís Ernesto Arruda Bezerra pelas contribuições e ajuda nessa etapa de minha formação.

Ao prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro pela ajuda nessa etapa de minha formação acadêmica.

À profa. Dra. Rosana Rocha, por todas as contribuições, desde o empréstimo de material ao envio das amostras coletadas no Panamá. Agradeço ainda por todos os ensinamentos e sugestões.

À profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, pela ajuda e apoio em muito momentos durante à minha formação, em especial durante o mestrado e meu intercâmbio nos EUA, como bolsista de doutorado sanduíche vinculada ao projeto “Conservação e Uso Sustentável da Biodiversidade do Estado do Ceará: Ecologia, Genômica e Exploração Biotecnológica de Invertebrados Marinhos e Microrganismos Associados”.

À profa. Dra. Cristina de Almeida Rocha Barreira, por ser sempre tão solícita todas as vezes que precisei.

À Dra. Bernadette Holthuis por todo o suporte e ajuda mesmo antes da minha chegada a Gainesville.

À Sra. Linda Cole pela acolhida e apoio durante a minha estadia no National Museum of Natural History, Washington, DC.

A Amanda Bemis, John Slapcinsky, John Starmer, Tania Pineda e Nathaniel Evans por suas valiosas contribuições e ajuda no *Florida Museum of Natural History, University of Florida*.

A Clerton Carmo e Thaís Oliveira, pela compreensão, pelo o amor, dedicação e ainda por me apoiarem na realização de mais um sonho.

À minha querida família, minha base, meus amores! Muito obrigada por tudo.

Aos amigos brasileiros em Gainesville, Maristela Lopes, Sílvia Beraldo, Thiago Beraldo e Laís Guerra, muito obrigada por todo o suporte, carinho e atenção.

Aos amigos em Gainesville, em especial Jorge Velez-Juarbe, Vincene Asanuma, Adenia, Alessandro Serafin e Carla Brisotto. A amizade de vocês tornou os meus dias mais alegres.

A todos os professores do Departamento de Engenharia de Pesca e Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará pelos ensinamentos durante à minha formação acadêmica.

A Cristiane Xerez, amiga querida, meus sinceros agradecimentos por toda ajuda, conselhos e ainda por partilhar comigo seus preciosos livros.

A Nadia Bonnet, amiga especial, agradeço por simplesmente ter surgido na minha vida e tornado os dias de convívio ao seu lado mais que divertidos. Agradeço ainda por toda ajuda.

A Eduardo Freitas e Ronaldo Ruy, pela amizade, por todas as conversas, risadas e ensinamentos transmitidos.

A Tarciana Fortaleza, pela amizade, por toda ajuda com as ilustrações, pelo convívio e conversas.

Raquel Almeida e Amarílis Brandão, pelos momentos felizes, mesmo com a distância vocês estarão sempre em meu pensamento e coração.

A Dayara Normando, Tatiana Duarte e Sandra Vieira, pela convivência e conversas.

A Camila Mayumi pela ajuda com as ilustrações e pelas discussões sobre morfologia.

A Jamile Forte e Janaina Araújo pela ajuda em todo o processo de sequenciamento.

À todos que passaram pelo LECA, com certeza vocês contribuíram de alguma forma com esse estudo.

Aos membros do Equal, em especial as minhas queridas amigas Rosa Lucena e Socorro Vale, pelas conversas e apoio.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concedeu a bolsa de doutorado e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) financiou o presente estudo.

“A classificação por descendência não pode ser inventada por biólogos, ela pode apenas ser descoberta.”

Theodosius Dobzhansky

Filogenia de Didemnidae Giard, 1872 (Tunicata: Ascidiacea)

RESUMO

A família Didemnidae é a mais diversa dentre os tunicados, com 578 espécies descritas. Esta família compreende oito gêneros: *Atriolum*, *Clitella*, *Didemnum*, *Diplosoma*, *Leptoclinides*, *Lissoclinum*, *Polysyncraton* e *Trididemnum*. Morfológicamente, os gêneros são distinguidos pela presença ou ausência de sifão atrial, número de fileiras de fendas, forma do espermiduto, número de folículos testiculares e presença ou ausência de espículas. Estudos anteriores sugerem a monofilia de Didemnidae, mas a monofilia de cada gênero e as relações filogenéticas entre eles é controversa e pouco resolvida. Dessa forma, o objetivo principal do estudo é formular uma hipótese sobre a evolução de Didemnidae. A monofilia de Didemnidae e as relações filogenéticas entre os seus gêneros foram estudadas com o uso de dados moleculares, por meio de sequências dos genes mitocondrial COI e nuclear 18S rDNA. A evolução dos caracteres morfológicos foi examinada à luz desses dados. Os resultados das análises de máxima verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (BI) evidenciaram a monofilia de cinco dos seis gêneros analisados. Com base principalmente nos resultados do gene 18S, dados concatenados (COI+18S) e evidências morfológicas, discutimos as relações filogenéticas entre *Didemnum* e *Polysyncraton* e entre *Diplosoma* e *Lissoclinum*. A hipótese baseada em dados moleculares mostrou dois clados dentro de *Didemnum*. A relação filogenética entre as espécies de *Didemnum* foram investigadas por meio de dados morfológicos e moleculares. As relações entre as espécies de *Didemnum* não puderam ser estabelecidas por meio dos dados morfológicos devido à ausência de suporte para o cladograma obtido. Entretanto, a análise morfológica indicou os caracteres informativos que suportam os clados formados. Os dois clados dentro de *Didemnum* foram distinguidos pela presença de lingueta atrial e larva com múltiplos pares de ampolas. Essa divergência morfológica e o resultado da análise filogenética com o gene COI suportou a divisão de *Didemnum* em dois grupos de espécies. Baseando-se nessas evidências, este presente estudo propõe a criação de um novo gênero de Didemnidae.

Palavras-chave: Didemnidae, filogenia, monofilia, *Didemnum*.

Phylogeny of Didemnidae Giard, 1872 (Tunicata: Ascidiacea)

ABSTRACT

Didemnidae is the largest family of tunicates with 578 species described. This family comprises eight genera: *Atrium*, *Clitella*, *Didemnum*, *Diplosoma*, *Leptoclinides*, *Lissoclinum*, *Polysyncraton* and *Trididemnum*. Morphologically, the genera can be distinguished mainly by the presence or absence of atrial siphon, the number of stigmata rows, the form of the vas deferens, the number of testicular lobes, and the presence or absence of spicules. Previous studies have suggested the monophyly of Didemnidae, but the monophyly of each genus and phylogenetic relationships among them is controversial and poorly resolved. Thus, the main goal of this study was to formulate a hypothesis about the evolution of Didemnidae. This study used molecular data (mitochondrial gene COI and 18S rDNA nuclear gene) to assess the monophyly of Didemnidae and determine the phylogenetic relationships among its genera. The evolution of morphological characters was evaluated in light of these data. The results of maximum likelihood analysis (ML) and Bayesian inference (BI) indicated the monophyly of five of the six analyzed genera. Based primarily on the 18S gene, concatenated data (COI and 18S), and the morphological evidence, we discussed the close relationships between *Didemnum* and *Polysyncraton*, and between *Diplosoma* and *Lissoclinum*. The molecular tree showed two clades within *Didemnum*. The phylogenetic relationships among species of *Didemnum* were investigated by morphological and molecular data. The relationships among *Didemnum* species could not be established through morphological data due to lack of support for the cladogram obtained. However, morphological analysis indicated the informative characters that support the two clades within *Didemnum*. These clades were distinguished by the presence of an atrial lip and number of ampullae in the larvae. This morphological divergence and the phylogenetic analysis with COI gene support the division of the genus *Didemnum* into two groups. Based on these evidences, this study proposes a new genus of Didemnidae.

Keywords: Didemnidae, phylogeny, monophyly, *Didemnum*.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 – Aspecto externo das ascídias; A) Ascídia solitária *Herdmania pallida*; B) ascídia colonial *Didemnum sordidum*. Fotos: A) Nadia Bonnet, B) Gustav Paulay, respectivamente. Desenho esquemático da organização interna de uma ascídia; A) Anatomia de uma ascídia solitária, B) Anatomia de uma ascídia colonial. Fonte: A) Brusca & Brusca, 2003; B) Monniot, Monniot & Laboutre, 1991, respectivamente..16

Figura 2 – Estrutura da faringe; A) Lisa e sem vasos longitudinais, B) Lisa e com vasos longitudinais e C) Com pregas e vasos longitudinais. Fonte: Monniot, Monniot & Laboute, 1991.....17

Figura 3 – Posição das gônadas; A) Gônadas associadas ao tubo digestório e B) Gônadas na parede do corpo. Fonte: Monniot, Monniot & Laboute, 1991.....17

Figura 4 – Cenário da diversidade de ascídias em número de espécies e famílias. Fonte: Shenkar & Swalla, 2011.....18

Figura 5 – Desenho esquemático dos gêneros mais diversos de Didemnidae; A) *Didemnum*, B) *Diplosoma*, C) *Leptoclinides*, D) *Lissoclinum*, E) *Polysyncraton* e F) *Trididemnum*. Fonte: Adaptado de Monniot, Monniot & Laboute, 1991; Moreno & Rocha, 2008. Caracteres morfológicos: 1 – Sifão atrial (aberto ou tubular), 2 – Número de fileiras de fendas (três ou quatro), 3 – Forma do espermiduto (espiral ou reto) e 4 – Número de lobos testiculares (único ou dividido ou mais que 2 folículos).....19

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Hipótese da filogenia da família Didemnidae baseada em sequências do gene mitocondrial COI. Os números nos ramos e abaixo representam os valores de *bootstrap* para a máxima verossimilhança (>60%) e probabilidade posterior para a inferência Bayesiana (>0.9), respectivamente. Gêneros de Didemnidae representados nesse estudo: A) *Didemnum*, B) *Diplosoma*, C) *Leptoclinides*, D) *Lissoclinum*, E) *Polysyncraton* e F) *Trididemnum*. Caracteres morfológicos: 1 – Sifão atrial (aberto ou tubular), 2 – Número de fileiras de fendas (três ou quatro), 3 – Forma do espermiduto (espiral ou reto) e 4 – Número de lobos testiculares (único ou dividido ou mais que 2 folículos).....38

Figura 2 – Hipótese da filogenia molecular da família Didemnidae baseada em sequências do gene nuclear 18S. Número no ramo representa o valor de *bootstrap* para a máxima verossimilhança (>60%) e probabilidade posterior para a Inferência Bayesiana (>0.9), respectivamente.....39

Figura 3 – Hipótese da filogenia molecular da família Didemnidae baseada em sequências dos genes (COI e 18S) concatenados. Número no ramo representa o valor de *bootstrap* para a máxima verossimilhança (>60%) e probabilidade posterior para a Inferência Bayesiana (>0.9), respectivamente.....40

CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Forma do sistema de cavidade cloacal; A) Horizontal torácica e B) Profunda (incluindo a região do abdome).....113
- Figura 2** – Desenho esquemático indicando o local de incubação dos simbiosites; A) Superfície da colônia, B) Cavidade cloacal e C) Matriz da túnica (HIROSE, 2015).....113
- Figura 3** – Forma das espículas; A) Globular e B) Estrelada, escala: 40 μm113
- Figura 4** – Forma da abertura atrial A) Ampla e B) Estreita.....114
- Figura 5** – Lingueta atrial bifurcada.....114
- Figura 6** – Órgão torácico lateral; A) Circular e sésil; B) Alongado e sésil e C) Oval e saliente.....114
- Figura 7** – Apêndice fixador; A) Inserido no fim do tórax e B) Inserido no pedúnculo esofágico retal.....115
- Figura 8** – Alça intestinal; A) Fechada e B) Aberta.....115
- Figura 9** - Forma do espermiduto; a) Reto e b) Espiral.....115
- Figura 10** – Número de lobos testiculares; A) Múltiplos, B) Bilobado e C) Único..116
- Figura 11** – Desenho esquemático de uma larva.....116
- Figura 12** – Consenso estrito das oito árvores mais parcimoniosas, com comprimento de 114 passos, índices de consistência 0,33 e retenção 0,45. Os números acima dos nós indicam sua posição e abaixo os caracteres.....66
- Figura 13** – Hipótese filogenética molecular do gênero *Didemnum* baseada no gene mitocondrial COI. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap* maior que 60% para a análise de máxima verossimilhança (ML). Legendas: GM – Golfo do México, BRA – Brasil, PYF – Polinésia Francesa, e AUS – Austrália.....70
- Figura 14** – Hipótese filogenética molecular do gênero *Didemnum* baseada no gene mitocondrial COI. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap* maior que 0.9 para a inferência Bayesiana. Legendas: GM – Golfo do México, BRA – Brasil, PYF – Polinésia Francesa, e AUS – Austrália.....71

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1 – Breve histórico da classificação dos gêneros de Didemnidae.....	20
---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Lista de espécies e número de acesso das sequências obtidas no presente estudo.....	30
---	----

Tabela 2 – Lista de espécies e número de acesso do COI e 18S rDNA das sequências do GenBank.....	32
---	----

Tabela 3 – Iniciadores para os genes mitocondrial e nuclear.....	33
---	----

Tabela 4 – Protocolo do programa de amplificação para os genes mitocondrial e nuclear.....	33
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Espécies de <i>Didemnum</i> incluídas nas análises morfológicas e moleculares.....	52
--	----

Tabela 2 – Lista de caracteres morfológicos para as espécies de <i>Didemnum</i> (Ascidiacea:Didemnidae).....	62
---	----

Tabela 3 – Iniciadores para os genes mitocondrial COI.....	63
---	----

Tabela 4 – Protocolo de amplificação para o gene COI.....	64
--	----

Tabela 5 – Nós e transformação dos caracteres apomórficos.....	67
---	----

Tabela 6 – Número de passos, índices de consistência e retenção para cada caractere analisado.....	67
---	----

SUMÁRIO

PREFÁCIO	14
1 – INTRODUÇÃO GERAL	14
2 – OBJETIVOS	24
2.1 – Geral.....	24
2.2 – Secundários.....	24
CAPÍTULO 1 – FILOGENIA MOLECULAR DE DIDEMNIDAE GIARD, 1872 (TUNICATA: ASCIDIACEA)	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
1 – INTRODUÇÃO.....	27
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.1 – Obtenção do material biológico.....	29
2.2 – Extração de DNA, amplificação e sequenciamento.....	32
2.3 – Análises filogenéticas.....	35
3 – RESULTADOS.....	36
4 – DISCUSSÃO.....	41
5 – CONCLUSÕES.....	46
CAPÍTULO 2 – FILOGENIA DO GÊNERO <i>DIDEMNUM</i> SAVIGNY, 1816 (ASCIDIACEA: DIDEMNIDAE): UMA NOVA PROPOSTA DE CLASSIFICAÇÃO	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
1 – INTRODUÇÃO.....	49
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.1 – Material biológico e táxons terminais amostrados.....	51
2.2 – Dados morfológicos.....	53
2.2.1 – Descrição dos caracteres.....	54
2.3 – Dados moleculares.....	63
2.4 – Análise filogenética.....	65
3 – RESULTADOS.....	66
3.1 – Análise dos dados morfológicos.....	66
3.2 – Análise dos dados moleculares.....	69
4 – DISCUSSÃO.....	72
5 – CONCLUSÕES.....	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICE A – Matriz de caracteres e estados para as espécies do gênero <i>Didemnum</i> (Ascidiacea: Didemnidae).....	86
APÊNDICE B – Sumário descritivo das espécies utilizadas nas análises morfológicas.....	89
APÊNDICE C – Imagens de alguns dos caracteres morfológicos de <i>Didemnum</i>	113
APÊNDICE D – Comparação dos caracteres morfológicos para diagnose dos gêneros.....	117

Filogenia de Didemnidae Giard, 1872 (Tunicata: Ascidiacea)

PREFÁCIO

Esta tese é composta por dois capítulos que abordam os aspectos filogenéticos das ascídias coloniais da família Didemnidae (Tunicata: Ascidiacea). Espécies representantes de seis gêneros de Didemnidae foram utilizados para inferir a filogenia molecular com base em evidências dos genes mitocondrial COI e nuclear 18SrDNA (Capítulo 1). Os dados moleculares permitiram inferir a monofilia dos gêneros de Didemnidae e a relação de parentesco entre eles. No decorrer das análises foram verificados dois clados dentro do gênero *Didemnum*, separados por características como: presença de lingueta atrial, um ou dois folículos testiculares e larva com múltiplas ampolas ectodérmicas. Dessa forma, uma análise filogenética foi realizada com base em evidências morfológicas e moleculares (gene-COI) para avaliar os caracteres taxonômicos tradicionais e inferir a relação entre as espécies de *Didemnum* (Capítulo 2). Baseado em evidências morfológicas e moleculares, propomos um novo gênero de Didemnidae (Capítulo 2).

1 – INTRODUÇÃO GERAL

O subfilo Tunicata compreende três classes: Thaliacea, Larvacea e Ascidiacea, com essa última representando o grupo mais diverso, reunindo aproximadamente 3.000 espécies descritas (LAMBERT, 2005). Essas espécies estão presentes desde regiões polares até os trópicos, na zona entremarés até mais de 8.000 m de profundidade, contudo a maior abundância ocorre em regiões costeiras rasas (BERRILL, 1950; RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998).

As ascídias são invertebrados exclusivamente marinhos, sésseis e geralmente de hábito filtrador (BERRILL, 1950; MILLAR, 1971). Estes animais são encontrados nas formas solitárias e coloniais (Figuras 1A e 1B) (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991). As formas solitárias consistem de apenas um indivíduo, recoberto pela túnica, característica do subfilo. Já as formas coloniais apresentam vários indivíduos, recobertos por uma túnica comum.

Os representantes de Ascidiacea podem se reproduzir de duas formas, reprodução assexuada (brotamento e fissão da colônia) e sexuada, sendo essa última comum através do grupo (MILLAR, 1971). As ascídias são hermafroditas, com fecundação externa ou interna (RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998). Suas larvas são lecitotróficas, com um curto período de vida que pode ser de minutos a poucas horas, o que reduz a sua capacidade de dispersão (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991). Apesar disso, esses organismos têm a possibilidade de se fixarem em uma ampla variedade de substratos, o que têm permitido sua ampla dispersão (RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998; ROCHA; DIAS; LOTUFO, 2011).

As ascídias são consideradas como um grupo ecologicamente importante devido à sua capacidade de sobreviver em locais eutrofizados e por serem potencialmente invasoras (SHENKAR; SWALLA, 2011). Outro aspecto ecológico relevante é a bioincrustação, que têm prejudicado substancialmente os cultivos de mariscos (ROCHA *et al.*, 2009).

Apesar da alta diversidade e relevância ecológica, os Ascidiacea permanecem pouco estudados, ou mesmo ignorados, em muitas regiões do mundo. Assim como acontece para outros táxons animais, o número de especialistas dedicados ao estudo desse grupo é que dita o passo dos inventários e descobertas sobre a biodiversidade.

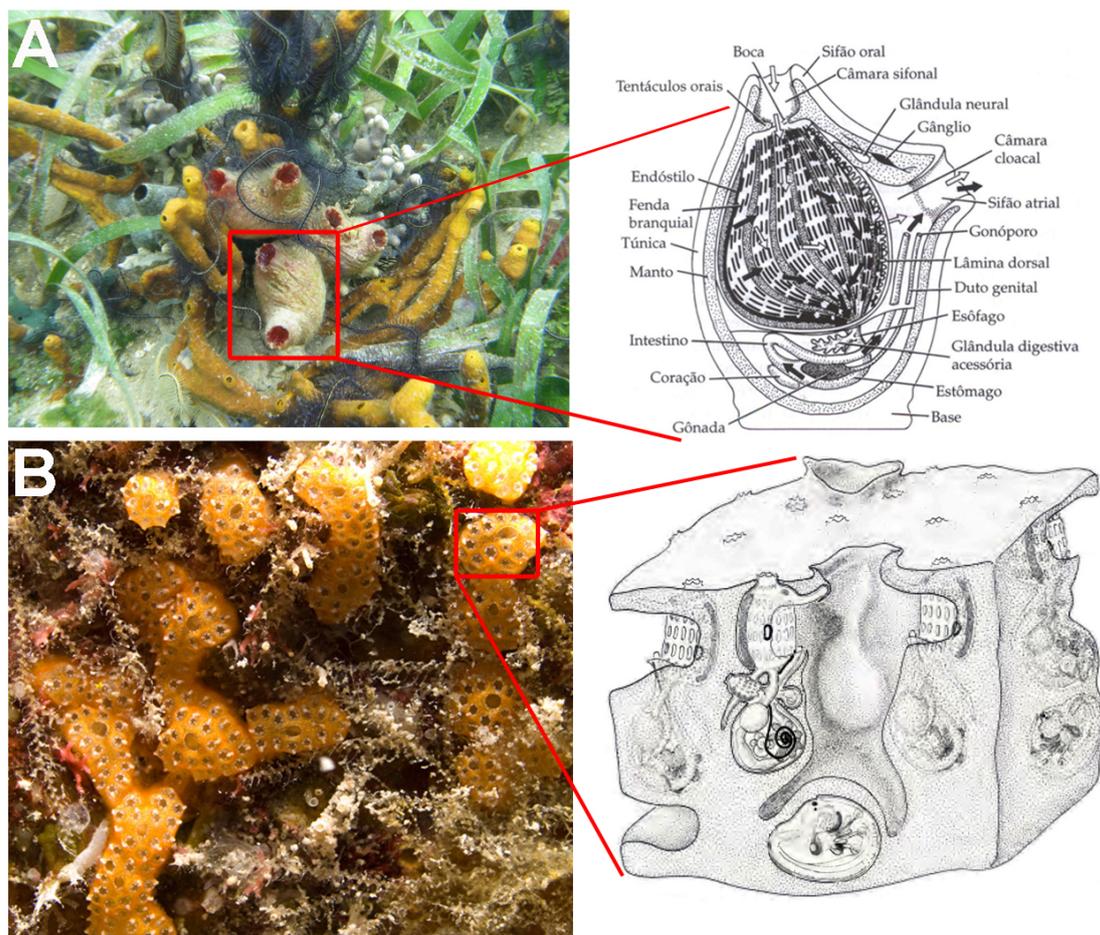


Figura 1 – Aspecto externo das ascídias; A) Ascídia solitária *Herdmania pallida*; B) ascídia colonial *Didemnum sordidum*. Fotos: A) Nadia Bonnet, B) Gustav Paulay, respectivamente. Desenho esquemático da organização interna de uma ascídia; A) Anatomia de uma ascídia solitária, B) Anatomia de uma ascídia colonial. Fonte: A) Brusca & Brusca, 2003; B) Monniot, Monniot & Laboute, 1991, respectivamente.

Segundo a classificação tradicional, Ascidiacea é dividida em três ou duas ordens, baseada nos caracteres morfológicos como a estrutura da faringe e a posição das gônadas (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991; SHENKAR; SWALLA, 2011). Segundo a estrutura da faringe, Ascidiacea é dividida em três ordens: Aplousobranchia (estrutura lisa e sem vasos longitudinais) (Figura 2A), Phlebobranchia (estrutura lisa e com vasos longitudinais) (Figura 2B) e Stolidobranchia (estrutura com pregas e vasos longitudinais) (Figura 2C) (LAHILLE, 1887 apud KOTT, 1969).

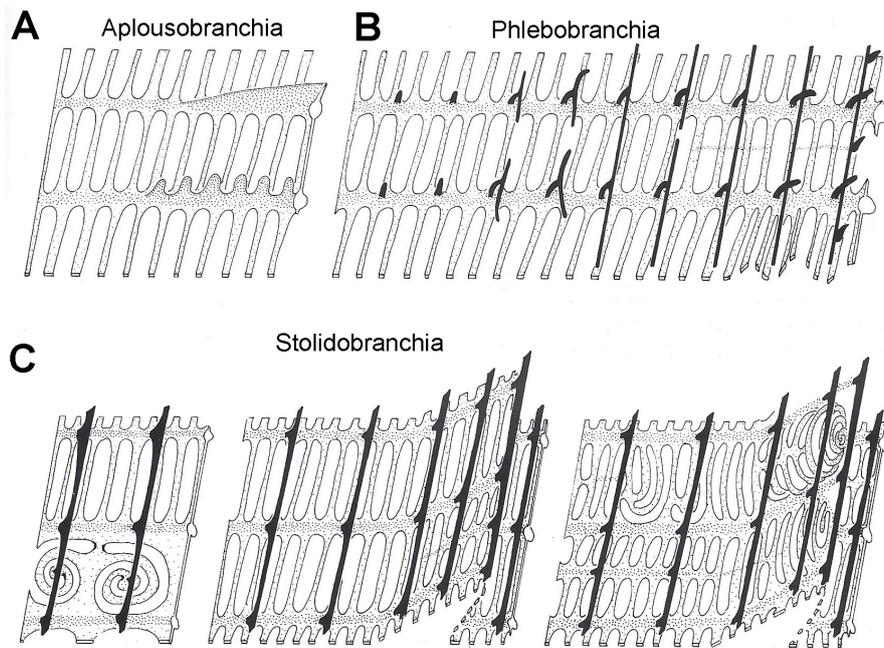


Figura 2 – Estrutura da faringe; A) Lisa e sem vasos longitudinais, B) Lisa e com vasos longitudinais e C) Com pregas e vasos longitudinais. Fonte: Monniot, Monniot & Laboute, 1991.

Já a classificação de acordo com a posição das gônadas divide Ascidiacea em duas ordens: Enterogona (Aplousobranchia e Phlebobranchia) (gônadas associadas ao tubo digestório) (Figura 3A) e Pleurogona (Stolidobranchia) (gônadas nos dois lados, associadas a parede do corpo) (Figura 3B) (PERRIER, 1898 apud KOTT, 1969). A divisão em três ou duas ordens não é incongruente, levando à proposição de Enterogona e Pleurogona como superordens.

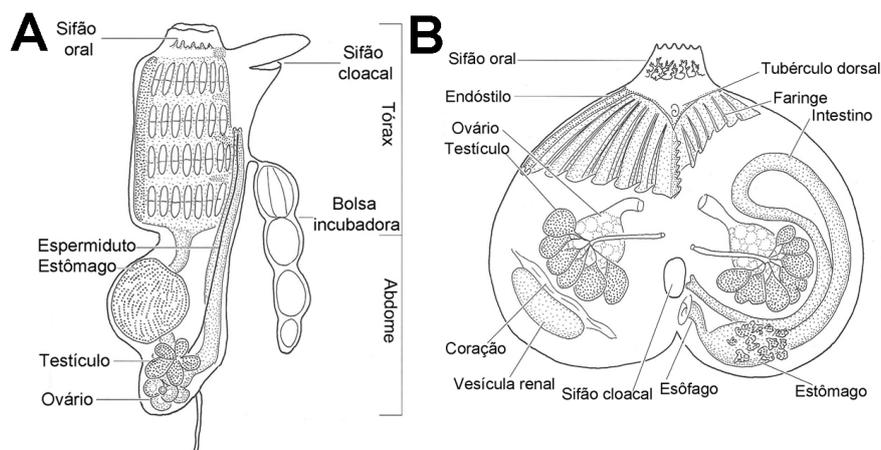


Figura 3 – Posição das gônadas; A) Gônadas associadas ao tubo digestório e B) Gônadas na parede do corpo. Fonte: Monniot, Monniot & Laboute, 1991.

A ordem Aplousobranchia é a mais diversa em número de espécies e famílias (Figura 4) (SHENKAR; SWALLA, 2011). Esta ordem tradicionalmente compreende apenas ascídias coloniais, cujos indivíduos (zooides) encontram-se inseridos em uma túnica comum e possuem o corpo dividido em tórax e abdome, sendo que em alguns casos há também um pós abdome.

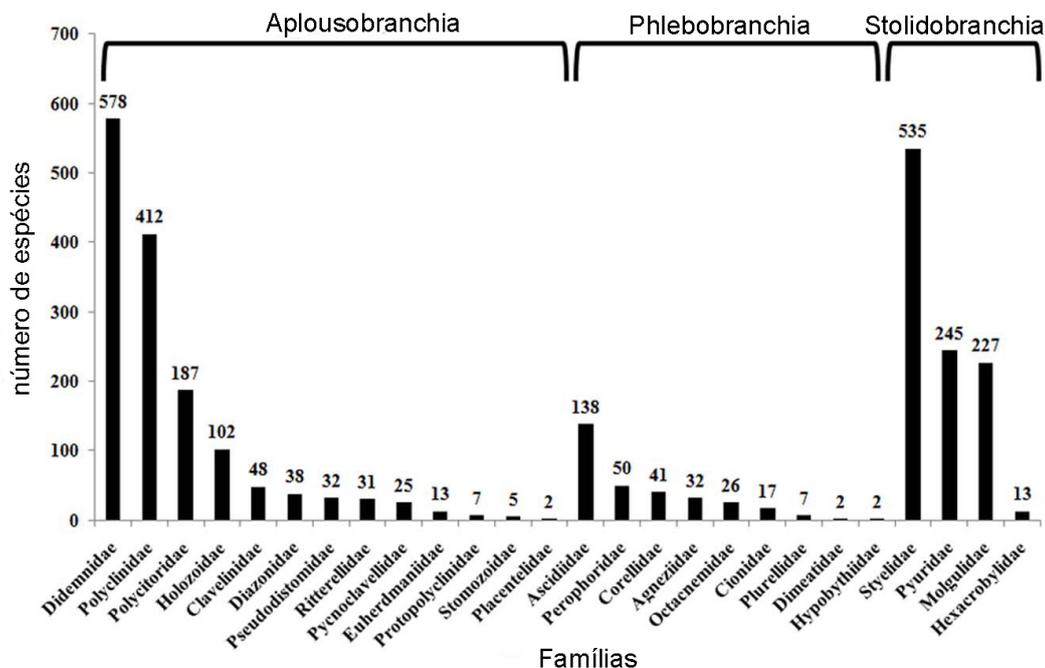


Figura 4 – Cenário da diversidade de ascídias em número de espécies e famílias. Fonte: Shenkar & Swalla, 2011.

Dentro de Aplousobranchia, a família Didemnidae Giard, 1872 é a mais diversa, representando cerca de 20% das espécies de ascídias descritas (SHENKAR; SWALLA, 2011).

A atual classificação reconhece oito gêneros dentro de Didemnidae: *Atriolum* Kott, 1983, *Clitella* Kott, 2001, *Didemnum* Savigny, 1816, *Diplosoma* Macdonald, 1859, *Leptoclinides* Bjerkan, 1905, *Lissoclinum* Verrill, 1871, *Polysyncraton* Nott, 1892 e *Trididemnum* Della Valle, 1881 (KOTT, 2001). Os dois primeiros gêneros contam com apenas 10 espécies válidas, enquanto a maior diversidade é representada nos demais táxons (Figura 5).

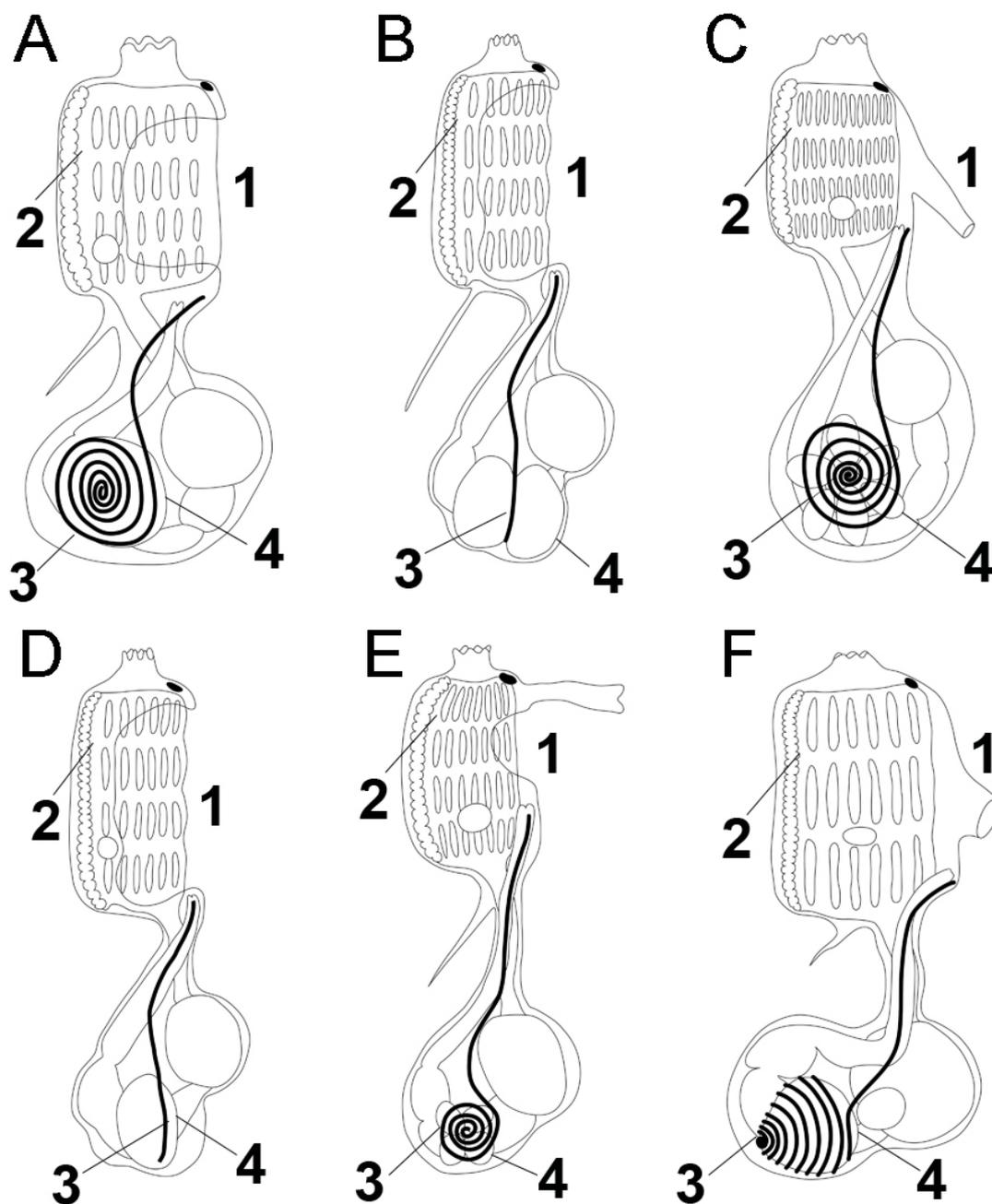


Figura 5 – Desenho esquemático dos gêneros mais diversos de Didemnidae; A) *Didemnum*, B) *Diplosoma*, C) *Leptoclinides*, D) *Lissoclinum*, E) *Polysyncraton* e F) *Trididemnum*. Fonte: Adaptado de Monniot, Monniot & Laboute, 1991; Moreno & Rocha, 2008. Caracteres morfológicos: 1 – Sifão atrial (aberto ou tubular), 2 – Número de fileiras de fendas (três ou quatro), 3 – Forma do espermiduto (espiral ou reto) e 4 – Número de lobos testiculares (único ou dividido ou mais que 2 folículos).

Todas as classificações propostas até o presente momento para Didemnidae (Tabela 1) foram baseadas em um reduzido número de caracteres

morfológicos, gerando assim conflitos quanto à validade taxonômica dos gêneros (VAN NAME, 1945; KOTT, 1962, 2001; MONNIOT; MONNIOT, 1972).

Tabela 1 – Breve histórico da classificação dos gêneros de Didemnidae.

Van Name (1945)	Kott (1962)	Monniot & Monniot (1972)	Kott (2001)
<i>Coelocormus</i> Herdman, 1886	<i>Askonides</i> gen. nov.	<i>Coelocormus</i> Herdman, 1886	? <i>Atriolum</i> Kott, 1983 ? <i>Leptoclinides</i> Bjerkan, 1905
		<i>Askonides</i> Kott, 1962	
<i>Leptoclinides</i> Bjerkan, 1905	<i>Leptoclinides</i> Bjerkan, 1905	<i>Leptoclinides</i> Bjerkan, 1905	<i>Leptoclinides</i> Bjerkan, 1905
	<i>Sinecloaca</i> Carlisle & Carlisle, 1954	<i>Sinecloaca</i> (Michaelsen, 1930)	
<i>Didemnum</i> Savigny, 1816 ^a	<i>Didemnum</i> Savigny, 1816	<i>Didemnum</i> Savigny, 1816	<i>Didemnum</i> Savigny, 1816
	<i>Polysyncraton</i> Nott, 1892	<i>Polysyncraton</i> Nott, 1892	<i>Polysyncraton</i> Nott, 1892
<i>Diplosoma</i> Macdonald, 1859	<i>Leptoclinum</i> Milne Edwards, 1841	<i>Diplosoma</i> Macdonald, 1859 ^b	<i>Diplosoma</i> Macdonald, 1859
<i>Lissoclinum</i> Verrill, 1871			<i>Lissoclinum</i> Verrill, 1871
<i>Echinoclinum</i> Van Name, 1902	<i>Echinoclinum</i> Van Name, 1902		
<i>Trididemnum</i> Della Valle, 1881	<i>Trididemnum</i> Della Valle, 1881	<i>Trididemnum</i> Della Valle, 1881	<i>Trididemnum</i> DellaValle, 1881
		<i>Botydemnum</i> Oka, 1933 ^c	
			<i>Atriolum</i> Kott, 1983
			<i>Clitella</i> Kott, 2001

^a*Polysyncraton* (subgênero de *Didemnum*), ^b*Lissoclinum* e *Echinoclinum* (subgênero de *Diplosoma*) e ^c*Botydemnum* (extinto).

Van Name (1945), em sua proposta de classificação para os gêneros de Didemnidae, classificou *Polysyncraton* como subgênero de *Didemnum* devido aos limites morfológicos utilizados na diferenciação dos grupos. Isso também foi apresentando por Monniot (1993), em sua proposição acerca da validade sistemática do gênero *Polysyncraton*, apesar da autora considerá-lo em suas classificações (MONNIOT; MONNIOT, 1972, MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991). Já para Kott (2001) a validade de *Polysyncraton* não deveria ser questionada e tanto *Didemnum* quanto *Polysyncraton* seriam gêneros naturais legitimados por diferenças morfológicas suficientes para reconhecer os dois grupos.

O gênero *Echinoclinum*, descrito por Van Name (1902), foi mantido nas classificações propostas por Van Name (1945) e Monniot & Monniot (1972). Esse gênero foi criado para abrigar espécies que apresentavam espículas de forma tetraédrica. *Echinoclinum* foi sinonimizado com *Lissoclinum* (ELDREDGE, 1966) devido à similaridade morfológica entre ambos, tais como faringe com quatro fileiras de fendas, testículo com um ou dois folículos e espermiduto reto, não constituindo a forma tetraédrica das espículas um caractere relevante para separar os gêneros (KOTT, 2001).

Coelocormus é um gênero monotípico, representado pela espécie de profundidade *Coelocormus huxleyi* Herdman, 1886. Este gênero continua aceito como integrante da família Didemnidae (WoRMS 2015, acesso em 3 de julho de 2015). Para Kott (2001), *Coelocormus* pode ser incluído em *Leptoclinides* ou *Atriolum*, por apresentar os mesmos caracteres morfológicos, não considerando *Coelocormus* como um gênero válido em sua proposta mais recente de classificação.

A espécie *Leptoclinides glauerti* Michaelsen (1930), foi colocada no gênero *Sinecloaca* proposto por Carlisle & Carlisle, 1954, sendo denominada então de *Sinecloaca glauerti* (Michaelsen, 1930). Este gênero monotípico foi considerado na classificação proposta por Monniot & Monniot (1972). O mesmo foi distinguido de *Leptoclinides* apenas pela ausência de um canal cloacal comum (KOTT, 1962; ELDREDGE, 1966). Kott (2001) apontou várias semelhanças da espécie *Leptoclinides glauerti* com o gênero *Atriolum*, embora a tenha considerado como uma provável espécie de *Leptoclinides*.

Askonides Kott, 1962 foi caracterizado pelos amplos canais cloacais e sifão oral com cinco lobos; contudo esses caracteres também são encontrados em *Leptoclinides*, sendo sugerido então sua sinonímia com *Leptoclinides* (KOTT, 2001).

Diante disso, observa-se que muitos gêneros foram descritos e mantidos até os dias atuais, enquanto que em outros casos os mesmos foram descritos e posteriormente sinonimizados com gêneros já existentes.

As primeiras inferências evolutivas para Didemnidae foram baseadas na similaridade de caracteres morfológicos em análises puramente gradistas (KOTT, 1962; LAFARGUE, 1983; MONNIOT, 1984; LAFARGUE & WAHL, 1987). Poucos estudos baseados em análises cladísticas para a família foram propostos. A monofilia de Didemnidae foi confirmada a partir de dados morfológicos e moleculares (TURON; LOPEZ-LEGENTIL, 2004; YOKOBORI *et al.*, 2006; MORENO; ROCHA, 2008). No entanto a validade dos gêneros permanece pouco esclarecida e a relação de parentesco entre eles não resolvida (YOKOBORI *et al.*, 2006). Dessa forma, são necessários mais estudos com o objetivo de esclarecer as relações entre os gêneros, propondo hipóteses sobre a evolução de Didemnidae.

Para propor essas hipóteses foi utilizado o método da análise cladística ou sistemática filogenética. Esse é um método que descreve e determina a diversidade biológica por meio das relações de parentesco entre os táxons (RIDLEY, 2006). Este método foi proposto pelo entomólogo alemão Willi Henning e tem como aspecto mais relevante o reconhecimento de grupos monofiléticos, ou seja, táxons que apresentam um ancestral comum e todos os seus descendentes (WILEY; LIEBERMAN, 2011).

As reconstruções filogenéticas tem sido feitas por meio de análise de caracteres comportamentais, reprodutivos, morfológicos, moleculares, entre outros (MATIOLI; FERNANDES, 2012). Por muito tempo as reconstruções filogenéticas foram inferidas, principalmente, por evidências morfológicas; contudo, o uso de evidências moleculares tem se tornado cada vez mais frequente (RIDLEY, 2006) e são hoje mais comum que a morfologia. As reconstruções filogenéticas por meio de sequências de DNA têm contribuído para a compreensão dos processos evolutivos de organismos que possuem caracteres morfológicos simplificados (FUTUYMA, 2002), como ocorre em Ascidiacea.

Até o presente momento, as reconstruções filogenéticas para Ascidiacea tem sido inferidas principalmente por meio do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) e o gene nuclear que codifica o rRNA da subunidade pequena do ribossomo (18S rDNA) (TURON; LOPEZ-LEGENTIL, 2004; YOKOBORI *et al.*, 2006; PÉREZ-PORTELA; TURON, 2008; PÉREZ-PORTELA *et al.*, 2009).

O COI compõe o genoma mitocondrial e é o gene mais sequenciado entre os 13 que codificam proteínas (BELINKY *et al.*, 2012). Essa propagação no uso do gene COI se deu por meio de seu emprego na identificação molecular de espécies (HEBERT *et al.*, 2003), promovido pela existência de iniciadores universais e degenerados que abrangem uma ampla diversidade de filos animais (FOLMER *et al.*, 1994; GELLER *et al.*, 2013). Este gene ainda apresenta um amplo sinal filogenético quando comparados com os demais genes mitocondriais, além de um elevado grau de polimorfismo que permite diferenciação entre as espécies (HEBERT *et al.*, 2003; HEBERT; RATNASINGHAM; deWAARD, 2003).

Já o gene 18S apresenta um alto número de cópias no genoma, além de ser o mais utilizado em inferências filogenéticas devido ao seu grau de conservação (VOIGT; ERPENBECK; WÖRHEIDE, 2008). Essas particularidades fazem do gene 18S eficiente para análises evolutivas de grupos em diferentes níveis taxonômicos dentro de Tunicata (WADA *et al.*, 1992; WADA, 1998; STACH; TURBEVILLE, 2002; YOKOBORI *et al.*, 2006; TSAGKOGEOGA *et al.*, 2009).

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo principal propor uma hipótese sobre a evolução de Didemnidae, baseado em evidências moleculares. Além disso, testar a monofilia dos gêneros e a relação de parentesco entre eles. E por último inferir a filogenia das espécies do gênero *Didemnum*, verificando a relação entre elas.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Geral:

Formular uma hipótese sobre a evolução de Didemnidae (Tunicata: Ascidiacea).

2.2 – Específicos

Mapear os caracteres e estados de caracteres taxonômicos que são informativos para a classificação dentro de Didemnidae.

Estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies de *Didemnum*.

Revisar a classificação tradicional dos gêneros de Didemnidae.

CAPÍTULO 1 – Filogenia molecular de Didemnidae Giard, 1872 (Tunicata: Ascidiacea).

RESUMO

Didemnidae é a maior família de tunicados, com cerca de 578 espécies descritas. A família compreende oito gêneros: *Atriolum*, *Clitella*, *Didemnum*, *Diplosoma*, *Leptoclinides*, *Lissoclinum*, *Polysyncraton* e *Trididemnum*. Dados morfológicos e moleculares sugerem a monofilia de Didemnidae, mas a monofilia de cada gênero e as relações filogenéticas entre eles ainda permanece pouco compreendida. Através de análises filogenéticas, utilizando sequências dos genes mitocondrial COI e nuclear 18S rDNA, foi observada a monofilia de cinco dos seis gêneros estudados. *Didemnum* é composto por dois clados, distinguidos pela lingueta atrial, número de folículos testiculares e número de ampolas na larva. Essa divergência morfológica sugere uma divisão de *Didemnum* em dois táxons. Com base nos dados obtidos com dados concatenados, o gene 18S e caracteres morfológicos foram discutidas as relações filogenéticas entre *Didemnum* e *Polysyncraton* e entre *Diplosoma* e *Lissoclinum*.

Palavras-chave: Didemnidae, filogenia, gêneros, monofilia.

CHAPTER 1 – Molecular phylogeny of Didemnidae Giard, 1872 (Tunicata: Ascidiacea).

ABSTRACT

Didemnidae is the largest family of tunicates with about 578 species described. This family comprises eight genera: *Atriolum*, *Clitella*, *Didemnum*, *Diplosoma*, *Leptoclinides*, *Lissoclinum*, *Polysyncraton* and *Trididemnum*. Morphological and molecular data suggest that the Didemnidae are monophyletic, but the monophyly of each didemnid genera and their phylogenetic relationships are still poorly understood. Through phylogenetic analysis using sequences of mitochondrial COI and nuclear genes 18S, we recovered the monophyly of five of the six studied genera. *Didemnum* is comprised of two clades, distinguished by the presence of an atrial lip, number of testicular lobes and number of larval ampullae. This morphological divergence supports the division of *Didemnum* in two taxa. Based primarily on concatenated data, the 18S gene and morphological features we discuss the relationships between *Didemnum* and *Polysyncraton*, and also between *Diplosoma* and *Lissoclinum*.

Keywords: Didemnidae, phylogeny, genera, monophyly.

CAPÍTULO 1 – Filogenia molecular de Didemnidae Giard, 1872 (Tunicata: Ascidiacea)

1 – INTRODUÇÃO

A família Didemnidae Giard, 1872 compreende cerca de 578 espécies descritas (SHENKAR; SWALLA, 2011), distribuídas em todos os oceanos, embora a maior diversidade ocorra em águas tropicais (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991). Esta família abriga oito gêneros: *Atrium* Kott, 1983, *Clitella* Kott, 2001, *Didemnum* Savigny, 1816, *Diplosoma* Macdonald, 1859, *Leptoclinides* Bjerkan, 1905, *Lissoclinum* Verrill, 1871 *Polysyncraton* Nott, 1892 e *Trididemnum* Della Valle, 1881 (KOTT, 2001). Os dois primeiros gêneros contam com apenas 10 espécies válidas, enquanto *Polysyncraton* e *Didemnum* representam os gêneros mais diversos (SHENKAR; SWALLA, 2011).

Todos os didemnídeos apresentam zooides divididos em tórax e abdome, tamanho reduzido em torno de 1,0 mm, com poucos caracteres morfológicos utilizados na diagnose, o que torna difícil a sua identificação.

Os gêneros de Didemnidae são diferenciados principalmente pelas seguintes características (BERRILL, 1950; KOTT, 2001):

1. Forma da abertura atrial (tubular ou aberta);
2. Número de fileiras de fendas (três ou quatro);
3. Forma do espermiduto (reto ou espiralado);
4. Número de folículos testiculares;
5. Presença ou ausência de espículas.

Estas poucas características, juntamente com o diminuto tamanho do zooide, faz de Didemnidae um grupo difícil de se trabalhar (KOTT, 2001). Essas peculiaridades dentro de Didemnidae se refletem no conhecimento acerca da evolução do grupo.

A família Didemnidae tem sido validada como monofilética por meio de evidências tanto morfológicas, quanto moleculares (MORENO; ROCHA, 2008; TURON; LOPEZ-LEGENTIL, 2004; YOKOBORI *et al.*, 2006). Apesar destes

estudos, as relações filogenéticas dentro de Didemnidae são controversas e as relações de parentesco entre os gêneros não estão esclarecidas (YOKOBORI *et al.*, 2006).

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a monofilia dos gêneros de Didemnidae e suas relações de parentesco, utilizando marcadores mitocondrial (COI) e nuclear (18S), assim como examinar a evolução dos caracteres morfológicos à luz desses dados.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Obtenção do material biológico

Para este estudo foram examinados espécimes pertencentes às seguintes instituições: Coleção Biológica Prof. Edmundo Nonato (ColBIO), Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil) e coleção Zoológica de Invertebrados do *Florida Museum of Natural History* (FLMNH), *University of Florida* (UF) (Gainesville, FL, EUA).

Os materiais biológicos pertencentes à ColBIO foram coletados ao longo da costa e ilhas brasileiras (Ceará, Fernando de Noronha, Atol das Rocas, Arquipélago São Pedro e São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo) entre 2011 e 2012. Já no FLMNH os espécimes foram coletados no Golfo do México (EUA) em 2012 e Moorea (Polinésia Francesa) em 2009 e 2012 por meio do projeto Moorea Biocode (mooreabiocode.org). Todos os espécimes coletados foram anestesiados com metanosulfonato de tricaina ou cristais de mentol. De cada um dos espécimes foi extraída uma porção da colônia para o estudo molecular, sendo a outra parte mantida para os estudos morfológicos. A parte sub-amostrada para o estudo molecular foi preservada em etanol 96% e estocada em freezer a -20°C, enquanto a porção da colônia para os estudos taxonômicos foi preservada em formaldeído (4% ou 10%) e posteriormente mantida em álcool etílico (70% ou 75%).

Foram analisadas espécies representando seis dos oito gêneros atualmente aceitos: *Didemnum*, *Diplosoma*, *Leptoclinides*, *Lissoclinum*, *Polysyncraton* e *Trididemnum*. Os gêneros *Atriolum* e *Clitella* foram os únicos que não puderam ser incluídos nessa análise pois não havia material disponível. Na tabela 1 são listadas as espécies utilizadas, localidade de coleta e seus números de identificação. Algumas das sequências utilizadas nesse estudo foram obtidas do Smithsonian Institution (Washington, DC), como parte do projeto Moorea Biocode.

Tabela 1 – Lista de espécies e número de acesso das sequências obtidas no presente estudo.

Espécies	Localidade	Número de identificação do DNA	Número de acesso	
			COI	18S
<i>Didemnum apuroto</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF813; UF814	KU221211.1; KU221212.1	–
<i>Didemnum cineraceum</i>	Ceará, Brasil ;São Paulo, Brasil	TL230; TL839	KU221193.1; KU221192.1	–
<i>Didemnum cuculliferum</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF676; UF724	KU221199.1; KU221219.1	–
<i>Didemnum fragile</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF746; UF839	KU221209.1; KU221201.1	–
<i>Didemnum granulatum</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF573; UF601; UF1408	KU221196.1; KU221204.1; KU221215.1	–
<i>Didemnum granulatum</i>	Fernando de Noronha, Brasil	TL671; TL686	KU221190.1; KU221191.1	–
<i>Didemnum ligulum</i>	Espírito Santo, Brasil; Moorea, Polinésia Francesa	TL796; UF613; UF694; UF1387	KU221210.1; KU221198.1; KU221200.1; KU221202.1	–
<i>Didemnum cf. ligulum</i>	Fernando de Noronha, Brasil	TL649	–	KU170205.1
<i>Didemnum cf. membranaceum</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF526; UF720; UF1389	KU221216.1; KU221225.1; KU221213.1	–
<i>Didemnum mutabile</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF689; UF691	KU221207.1; KU221223.1	–
<i>Didemnum psammatodes</i>	Ceará, Brasil	TL27	KU221189.1	–
<i>Didemnum sp.1</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF597; UF612; UF734	KU221195.1; KU221197.1; KU221208.1	–
<i>Diplosoma listerianum</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF649	KU221221.1	–
<i>Diplosoma simile</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF697	KU221218.1	–
<i>Diplosoma sp.</i>	Espírito Santo, Brasil	TL817	KU221188.1	KU170204.1
<i>Diplosoma sp.1</i>	Moorea, Polinésia Francesa	TL729	KU221184.1	–
<i>Diplosoma sp.2</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF644	KU221220.1	–
<i>Diplosoma sp.3</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF680; UF759	KU221228.1; KU221226.1	–

Espécies	Localidade	Número de identificação do DNA	Número de acesso	
			COI	18S
<i>Lissoclinum ravarava</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF1398	KU221214.1	–
<i>Lissoclinum patella</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF781	–	KU174393.1
<i>Lissoclinum vareau</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF606	KU221205.1	–
<i>Lissoclinum verrilli</i>	Golfo do México, USA	UF1244	KU221194.1	–
<i>Polysyncraton poro</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF664; UF682	KU221217.1; KU221222.1	–
<i>Polysyncraton</i> sp.	Ceará, Brasil; Espírito Santo, Brasil	TL432; TL810	KU221187.1; KU221186.1	KU170203.1; KU170202.1
<i>Trididemnum maragogi</i>	São Pedro e São Paulo, Brasil	TL234	KU221183.1	–
<i>Trididemnum maragogi</i>	Atol das Rocas, Brasil	TL449	–	KU170201.1
<i>Trididemnum fetia</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF629	KU221206.1	KU174392.1
<i>Trididemnum</i> cf. <i>pigmentatum</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF696	KU221224.1	–
<i>Trididemnum tomarahi</i>	Moorea, Polinésia Francesa	UF1424	KU221203.1	KU174391.1
<i>Trididemnum</i> sp.	Fernando de Noronha, Brasil	TL538	KU221185.1	–

Sequências adicionais para os genes COI e 18S rDNA da família Didemnidae foram obtidas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e incluídas nas análises (Tabela 2). As espécies *Cystodytes dellechiajei* (Della Valle, 1877) (números de acesso: AY523068.1; AY523072.1) e *Cystodytes* sp. (número de acesso: FM244842.1), família Polycitoridae, foram escolhidas como grupo externo para as análises separadas (genes COI e 18S), respectivamente. *Distaplia* sp. (presente estudo-TL02, KU221227.1; KU174394.1), família Holozoidae, foi utilizada como grupo externo na análise combinada (COI +18S).

Tabela 2 – Lista de espécies e número de acesso do COI e 18S rDNA das sequências do GenBank.

Espécies	COI	18S
<i>Didemnum albidum</i>	EU419432.1	EU337058.1
<i>Didemnum granulatum</i>	JQ780685.1; JQ780688.1	–
<i>Didemnum molle</i>	–	AB211071.1
<i>Didemnum multispirale</i>	KCO17430.1	–
<i>Didemnum psammatodes</i>	EU742661.1	–
<i>Didemnum vexillum</i>	JQ663512.1	JF738070.1
<i>Didemnum</i> sp	–	AJ579862.1
<i>Didemnum</i> sp.B	–	EU337061.1
<i>Diplosoma listerianum</i>	KF309664.1; KF309605.1	–
<i>Diplosoma ooru</i>	–	AB211100.1
<i>Diplosoma spongiforme</i>	AY600972.1	–
<i>Diplosoma simile</i>	AB723718.1	AB211106.1
<i>Diplosoma simileguwa</i>	–	AB211107.1
<i>Diplosoma virens</i>	–	AB211114.1
<i>Leptoclinides madara</i>	KC017427.1	AB211070.1
<i>Lissoclinum bistratum</i>	–	AB211081.1
<i>Lissoclinum fragile</i>	JF506180.1	–
<i>Lissoclinum patella</i>	KJ009374.1; KJ009371.1	–
<i>Lissoclinum punctatum</i>	–	AB211091.1
<i>Lissoclinum timorense</i>	–	AB211094.1
<i>Lissoclinum verrilli</i>	JX099361.1	–
<i>Polysyncraton lacazei</i>	AY600986.1	–
<i>Trididemnum cyanophorum</i>	JF506187.1; KJ632947.1	–
<i>Trididemnum maragogi</i>	KR604728.1	–
<i>Trididemnum paracyclops</i>	–	AB211077.1
<i>Trididemnum solidum</i>	JF506186.1	–

2.2 – Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Os procedimentos de extração e amplificação do DNA foram realizados no Laboratório de Ecologia Animal (LECA) do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará (UFC) e no Laboratório de Biologia Molecular do *Florida Museum of Natural History* (FLMNH), *University of Florida* (UF),

(Gainesville, Flórida, EUA). Para a extração do DNA genômico foram utilizados dois protocolos distintos. Um protocolo foi baseado na utilização de kits (Dneasy Blood & Tissue kit e QIAamp DNA mini kit – Qiagen), onde cerca de 20-40 tórax foram dissecados da colônia e o DNA extraído, seguindo as instruções do fabricante. Os tórax foram incubados com Proteinase K *overnight* em banho seco a 56°C. Após a extração, o DNA isolado foi quantificado em espectrofotômetro de micro volume da marca Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e até 100 ng de DNA utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR). No outro protocolo, o reagente Chelex 100 (Bio-Rad) (WALSH; METZGER; HIGUCHI, 1991) foi utilizado para extrair DNA das colônias de ascídias. Um pedaço da colônia foi removido, cortado em pequenos pedaços e incubado a 55°C *overnight* em 150 µL de uma solução aquosa de Chelex a 10% mais 10 µL de proteinase K. Para o PCR foi utilizado 1 µL do sobrenadante.

Os genes COI e 18S rDNA foram amplificados utilizando os iniciadores (*primers*) listados na Tabela 3 e protocolos de amplificação indicados na Tabela 4.

Tabela 3 – Iniciadores para os genes mitocondrial e nuclear.

Marcador	Iniciadores	Referência
COI	LCO1490 - 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3' HCO2198 – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3'	Folmer <i>et al.</i> , 1994
COI	TunF - 5'TCGACTAATCATAAAGATATTAG3' TunR - 5'AACTTGTATTTAAATTACGATC3'	Stefaniak <i>et al.</i> , 2009
COI	DidF - 5'TATCIACIAATCATAAAGATATTG G3' DidR - 5'CTTCTYCYGRWGGRTCAAAAARCT3'	Presente estudo
18S rDNA	18S1 - 5'CCTGGTTGATCCTGCCAG3' 18S4 - 5'GATTAAGAAAACATTCTTGGC3'	Tsagkogeorga <i>et al.</i> , 2009

Tabela 4 – Protocolo do programa de amplificação para os genes mitocondrial e nuclear.

Iniciadores	Desnaturação inicial	Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
LCO1490 e HCO2198	94°C/2 min	35	94°C/1 min	39°C/1 min	72°C/1.5min	72°C/7 min
TunF e TunR	95°C/4 min	40	94°C/1 min	39°C/1 min	72°C/1.5min	72°C/10min
DidF e Did R	95°C/2.5 min	40	94°C/40seg	44°C/40seg	72°C/1 min	72°C/10min
18S1 e 18S4	94°C/1 min	35	94°C/30seg	52°C/30seg	72°C/2 min	72°C/5 min

Além dos iniciadores de Folmer e Tun utilizados no presente estudo, foi elaborado um conjunto de iniciadores que melhoraram o sucesso de amplificação, especialmente para os gêneros *Didemnum*, *Lissoclinum* e *Trididemnum*. Estes foram baseados nos iniciadores de Folmer modificados por Geller *et al.*, (2013), e em genomas mitocondriais completos disponíveis no GenBank para *Didemnum vexillum* (KM259616.1) e *Diplosoma listerianum* (FN313539.1).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) tiveram um volume final de 25 μ L, contendo: 12,5 μ L de solução comercial para reações de PCR (Amplitaq-Applied Biosystems ou Gotaq-Promega), 1 μ L (0,4 μ M) de cada iniciador (*forward* e *reverse*), DNA e água para completar 25 μ L de reação. O controle da reação foi formado por todos os constituintes citados acima, exceto DNA. A amplificação foi realizada em termocicladores C1000 Thermal cycler (Bio-Rad) ou PTC-100 (MJ Research).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2%. Após a formação do gel, foi aplicado 5 μ L do produto de PCR mais 2 μ L de SYBR Safe DNA gel stain (Life Technologies) 100 X para observação das bandas. O marcador de massa molecular de DNA de 1 Kb (Invitrogen) ou 100 pb (Biolabs-New England) foi aplicado para se saber o tamanho dos fragmentos amplificados. A corrida da eletroforese aconteceu a uma voltagem de 80 V e uma corrente de 40 mA, utilizando como tampão de corrida o Tris Borato EDTA (TBE) 0,5 X. As bandas da eletroforese foram visualizadas em fotodocumentador ultravioleta Gel DocTM (Bio-Rad). As bandas foram quantificadas utilizando o software Image LabTM 2.0 (Bio-Rad). Os produtos de PCR com boa qualidade foram mantidos a -20°C até o momento da purificação e sequenciamento. Esses produtos de PCR foram purificados com endonuclease ExoSAP-IT (USB), seguindo as indicações do fabricante. Todas as amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger. Para as amostras com procedimento realizado no LECA, o sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen (Coréia), utilizando o sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems). As amostras amplificadas no FLMNH foram sequenciadas no *Interdisciplinary Center for Biotechnology Research* (University of Florida).

2.3 – Análises filogenéticas

Os eletroferogramas foram visualizados e as sequências de nucleotídeos editadas manualmente e verificadas por meio do programa Geneious v.7-Biomatter. As sequências de nucleotídeos obtidas no presente estudo e selecionadas do GenBank foram alinhadas usando o programa MAFFT 7 (KATOHI; STANDLEY, 2013) com o algoritmo L-INS-i. As análises foram realizadas usando dados separados e dados concatenados. Para cada dado foi selecionado o melhor modelo de evolução de nucleotídeos, usando o *Akaike Information Criterion* (AIC), implementado no JModelTest 2.1.4 (DARRIBA *et al.*, 2012). O melhor modelo de evolução para os dados separados (COI e 18S) e os dados concatenados (COI+18S) foi GTR com parâmetros gamma de 0.3150, 0.6320 e 0.5340, respectivamente. As árvores filogenéticas foram construídas por máxima verossimilhança (ML) no programa PhyML (GUIDON *et al.*, 2010) e inferência Bayesiana (BI) no programa MrBayes 3.2.2 (RONQUIST *et al.*, 2012). O suporte estatístico das árvores de ML e BI foram realizados usando 1000 réplicas de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. A BI foi baseada em quatro cadeias *Markov-Monte Carlo* (MCMC) com cinco milhões de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações e um total de 25% das árvores foram descartadas em *burn-in*. Todos os programas utilizados nas análises estão implementados no programa Geneious R7, com exceção do JModelTest 2.1.4. As árvores obtidas foram visualizadas e editadas no programa Figtree 1.4.0 disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (RAMBAUT, 2012).

3 – RESULTADOS

Foram obtidas topologias similares das árvores baseadas nos algoritmos de máxima verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (BI) para todos os conjuntos de dados (COI, 18S e COI+18S). Dessa forma, apenas a topologia da árvore de ML foi mostrada para cada gene (dados separados e concatenados) (Figuras 1, 2 e 3). Tanto as análises com COI, como com o 18S, validaram como monofiléticos cinco dos gêneros analisados. A exceção foi o gênero *Trididemnum*, cuja monofilia não foi validada pelo COI (Figura 1).

O gênero *Didemnum* foi recuperado como monofilético em todas as reconstruções, com alto suporte de *bootstrap* e probabilidade posterior (76%/0.99 com gene COI, 97%/1 com gene 18S; e 99%/1 com dados concatenados, respectivamente) (Figuras 1, 2 e 3). Dois clados foram observados para *Didemnum*; um clado compreendendo as espécies *Didemnum albidum* (Verrill, 1871), *D. multispirale* Kott, 2001 e *D. ligulum* Monniot, 1983; e outro abrigando todas as outras espécies de *Didemnum* incluídas no estudo (Figura 1). Dentro de Didemnidae, esse foi o gênero mais bem resolvido, ou seja, com o maior valor de suporte em todas as análises.

Diplosoma foi mostrado como monofilético nas análises de máxima verossimilhança e inferência Bayesiana. Para os dados com o COI, o suporte de *bootstrap* foi moderado (92%), enquanto para o 18S esse foi muito forte (98%). Já para os dados concatenados o valor de *bootstrap* foi alto (100%). Na inferência Bayesiana, o valor de probabilidade posterior foi alto (1) para ambos os genes (Figuras 1, 2 e 3).

O gênero *Lissoclinum* também foi validado como monofilético, apesar de não totalmente confirmado devido ao suporte das análises. A monofilia foi validada na análise de inferência Bayesiana para ambos os marcadores (0.96 para os genes COI, 1 para o 18S e dados concatenados, respectivamente) (Figuras 1, 2 e 3). Essa monofilia também foi recuperada pela análise de máxima verossimilhança para ambos os genes (99% para o 18S e 81% dados concatenados), contudo o valor do suporte de *bootstrap* foi fraco para o gene COI (33%, valor não mostrado, Figura 1). Dois clados em *Lissoclinum* foram identificados com alto suporte pelo COI. O primeiro clado inclui três espécies: *Lissoclinum ravarava* Monniot & Monniot, 1987, *L. vareau*

Monniot & Monniot, 1987 e *L. fragile* (Van Name, 1902), com um forte valor de suporte (97%, 1). O segundo clado compreende duas espécies: *L. patella* (Gottschaldt, 1989) e *L. verrilli* (Van Name, 1902), com alto valor de suporte para probabilidade posterior (0.97) (Figura 1).

A monofilia de *Polysyncraton* foi recuperada pelo COI, com valor de suporte moderado para a ML (69%), e alto na BI (1) (Figura 1). Os resultados relativos a monofilia de *Trididemnum* foram conflitantes. Esse gênero foi recuperado como monofilético usando o 18S e os dados concatenados, com um forte suporte em ambas as análises (ML=100%, BI=1, Figuras 2 e 3). Contudo, a monofilia de *Trididemnum* não foi recuperada com o COI, onde um arranjo politômico foi obtido (Figura 1).

Os resultados mostraram a espécie *Leptoclinides madara* Tokioka, 1953, como táxon irmão dos demais gêneros de Didemnidae nas filogenias com o COI, 18S e dados concatenados (Figuras 1, 2 e 3).

Nossos resultados mostraram um único clado incluindo os gêneros *Didemnum*, *Lissoclinum*, *Diplosoma* e *Polysyncraton* para o COI. Para esse clado, o valor de suporte de *bootstrap* foi moderado (76%) e a probabilidade posterior forte (1) (Figura 1). A mesma topologia foi mostrada com os dados de 18S e dados concatenados, mas incluiu também o gênero *Trididemnum* (Figuras 2 e 3). Os valores de suporte de *bootstrap* para o gene 18S foi moderado para ML (74%) e probabilidade posterior forte na BI (1) (Figura 2). Já para os dados concatenados o suporte de *bootstrap* e probabilidade posterior foi alto para ambos (91%/1) (Figura 3).

Os resultados sobre as relações filogenéticas dentro de Didemnidae tiveram um baixo valor de *bootstrap* e probabilidade posterior com o gene 18S (valores não mostrados), embora uma relação entre *Didemnum* e *Polysyncraton* tenha sido recuperada com moderado valor de *bootstrap* (62%) e alta probabilidade posterior (0.97) para os dados concatenados. Apesar desse baixo valor, observado nas análises do gene 18S, a topologia das árvores foi a mesma e esses resultados sugerem uma relação próxima entre *Didemnum* e *Polysyncraton*, assim como entre *Diplosoma* e *Lissoclinum*.

Já a relação dentro de Didemnidae pelo gene COI mostrou a mesma topologia das árvores em ambas as análises (ML e BI). Contudo, os valores de suporte

foram incongruentes. Na análise da inferência Bayesiana, a relação foi muito forte, com (*Diplosoma* (*Polysyncraton* (*Didemnum* + *Lissoclinum*))). Já os resultados para a análise de máxima verossimilhança tiveram um baixo valor de suporte e a relação evolutiva entre os gêneros de Didemnidae não foi recuperada.

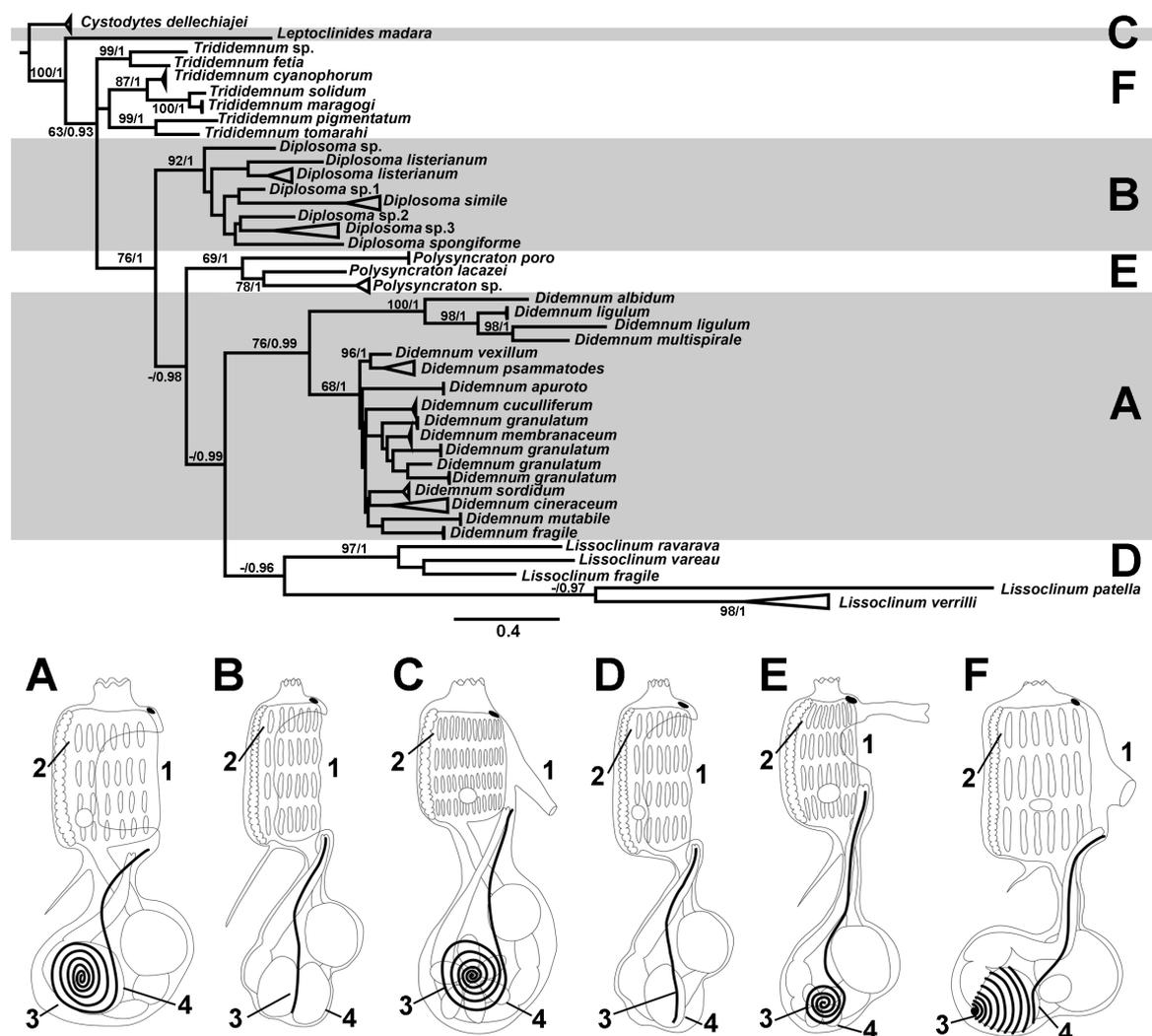


Figura 1 – Hipótese da filogenia da família Didemnidae baseada em sequências do gene mitocondrial COI. Os números nos ramos e abaixo representam os valores de *bootstrap* para a máxima verossimilhança (>60%) e probabilidade posterior para a inferência Bayesiana (>0.9), respectivamente. Gêneros de Didemnidae representados nesse estudo: A) *Didemnum*, B) *Diplosoma*, C) *Leptoclinides*, D) *Lissoclinum*, E) *Polysyncraton* e F) *Trididemnum*. Caracteres morfológicos: 1 – Sifão (aberto ou tubular), 2 – Número de fileiras de fendas (três ou quatro), 3 – Forma do espermiduto (espiral ou reto) e 4 – Número de lobos testiculares (único ou dividido ou mais que 2 folículos).

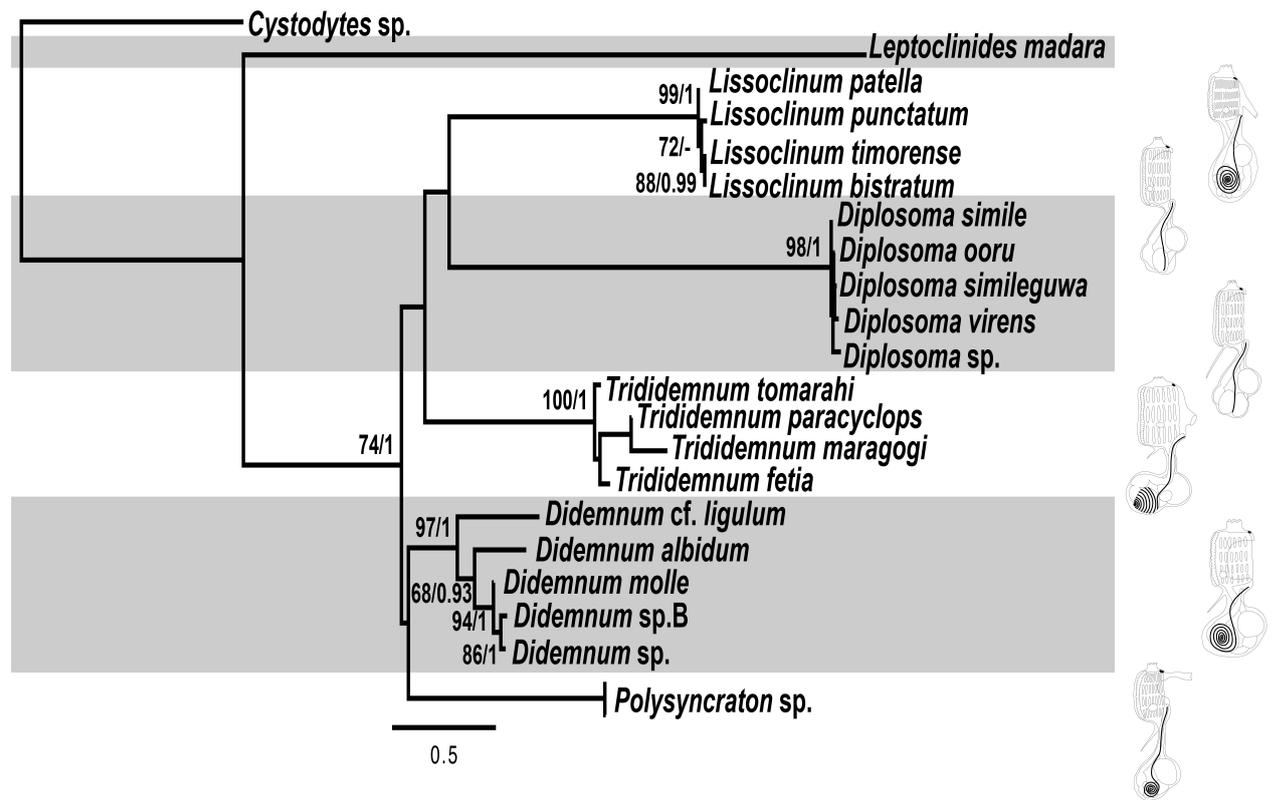


Figura 2 – Hipótese da filogenia da família Didemnidae baseada em sequências do gene nuclear 18S. Número no ramo representa o valor de *bootstrap* para a máxima verossimilhança (>60%) e probabilidade posterior para a Inferência Bayesiana (>0.9), respectivamente.

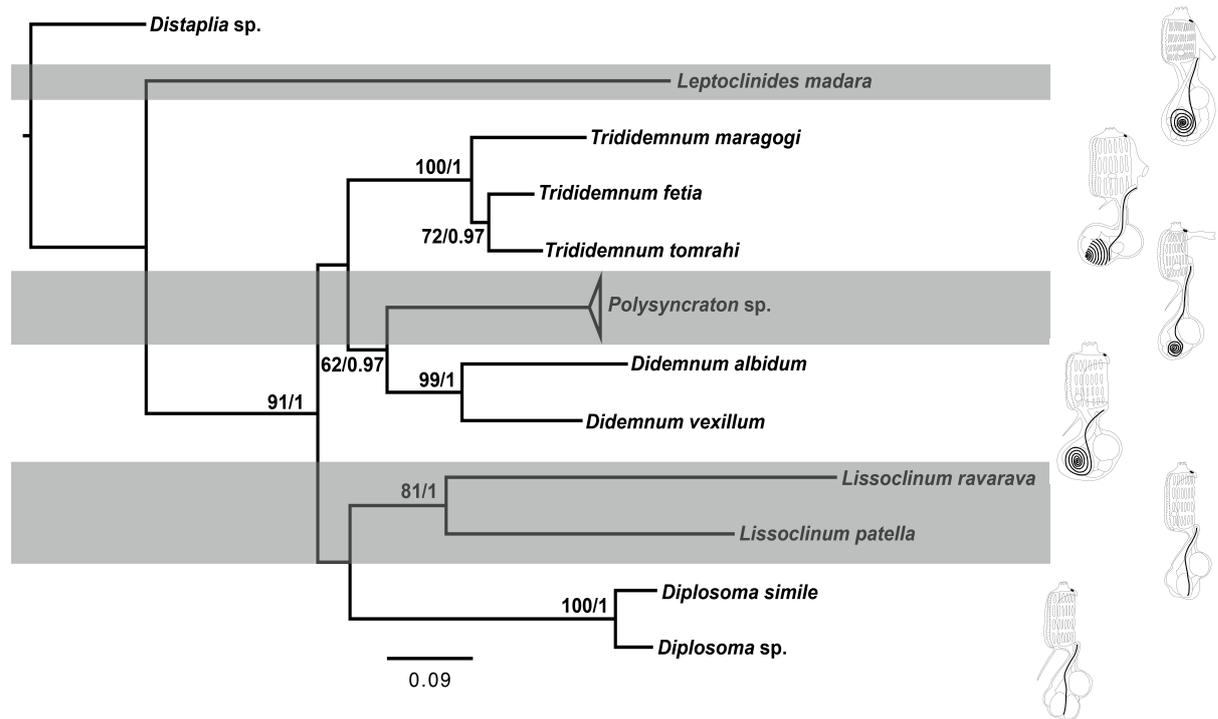


Figura 3 – Hipótese da filogenia da família Didemnidae baseada em seqüências dos genes (COI e 18S) concatenados. Número no ramo representa o valor de *bootstrap* para a máxima verossimilhança (>60%) e probabilidade posterior para a Inferência Bayesiana (>0.9), respectivamente.

4 – DISCUSSÃO

O presente estudo é a primeira análise filogenética molecular de ascídias, incluindo seis gêneros de Didemnidae, os mais ricos em número de espécies (KOTT, 2001). De acordo com ambas as topologias observadas nas árvores, o espermiduto em espiral e as espículas globulares ou estreladas permanecem como sinapomorfias para Didemnidae, juntamente com o brotamento na região do pedúnculo esofágico retal e o dobramento da alça intestinal. Romanov (1989 apud Kott, 2001) propôs um ancestral para Didemnidae desprovido de espículas e com espermiduto reto, colocando o gênero *Diplosoma* como o táxon de derivação mais basal. Contudo a maioria das evidências não confirma essa hipótese. Lafargue (1983), por exemplo, colocou *Cystodytes* como táxon irmão de Didemnidae, apontando uma origem comum das espículas em ambos os táxons. De fato, a maioria das espécies de *Cystodytes* apresenta espículas globulares arredondadas. Considerando uma evolução a partir das espículas, caractere típico em Didemnidae, essa parece ser a situação mais plausível. *Cystodytes* também apresenta uma camada de células *bladder* na túnica, assim como a maioria dos didemnídeos. Entretanto, essa característica encontra-se ausente nos outros táxons de Aplousobranchia (VAN NAME, 1945). Algumas espécies desse gênero também têm associações com a cianobactéria *Prochloron*, uma característica típica dos didemnídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2013)

Os resultados do presente estudo confirmaram a monofilia dos gêneros analisados em quase todas as abordagens. Os resultados moleculares são consistentes com a taxonomia tradicional para os gêneros de Didemnidae. De acordo com os caracteres morfológicos, os gêneros são distinguidos principalmente pela presença ou ausência do sifão atrial, pelo número de fileiras de fendas, pela forma do espermiduto, pelo número de folículos testiculares e pela presença ou ausência de espículas (MONNIOT; MONNIOT; LABOUE, 1991; KOTT, 2001).

Mapeando esses caracteres nas árvores filogenéticas para os genes COI, 18S e dados concatenados (COI + 18S), foram observados diferentes cenários em algumas topologias (Figuras 1, 2 e 3). Em todas as análises, *Leptoclinides* foi validado como grupo irmão dos outros gêneros de Didemnidae. Esse resultado é consistente com a taxonomia tradicional, considerando a morfologia do sifão tubular e o número de folículos testiculares. A presença desses caracteres em *Leptoclinides* é

possivelmente uma condição basal mantida de um ancestral de Aplousobranchia. A derivação basal de *Leptoclinides* também foi proposta por Hawkins *et al.* (1983), seguindo um estudo sobre os teores do metal vanádio e o estágio de oxidação do mesmo em ascídias. Segundo esse estudo, as espécies pertencentes a *Leptoclinides* mostraram altos teores de vanádio, contrastando com todos os outros gêneros de Didemnidae. Dessa forma, se *Leptoclinides* é o táxon irmão de todos os demais gêneros de Didemnidae, a evolução dos mesmos a partir deste estaria relacionada à perda do sifão atrial e redução do tamanho do zooide (KOTT, 2001).

Trididemnum foi validado como monofilético a partir dos dados do 18S e concatenados, mas não com o gene mitocondrial COI. O conjunto de dados para o gene 18S e concatenados tem menos espécies, mas possui as espécies que surgiram em diferentes clados na análise do COI, como *T. fetia*, *T. maragogi* e *T. tomarahi*. Apesar desse fato, a posição de *Trididemnum* na filogenia permaneceu incerta, sem um bom suporte em ambos os conjuntos de dados. Morfologicamente, *Trididemnum* difere dos outros gêneros de Didemnidae pela redução da faringe, que apresenta apenas três fileiras de fendas. Esse gênero retém caracteres como sifão atrial tubular dirigido posteriormente, semelhante a *Leptoclinides*, embora esse não seja um caractere universal para o grupo, uma vez que o sifão atrial aberto é encontrado em algumas espécies. Como a miniaturização do zooide pode ser vista como uma "tendência" em Didemnidae, seria esperado uma posição mais derivada para *Trididemnum*.

Por outro lado, resultados incongruentes entre dados de 18S e COI foram mostrados em outros estudos, em níveis taxonômicos mais abrangentes, como subfilo e famílias (STACH; TURBEVILLE, 2002; PÉREZ-ORTELA *et al.*, 2009). Os genes mitocondriais em diferentes espécies de Ascidiacea evoluem em diferentes taxas passando por intensos rearranjos gênicos (GISSI *et al.*, 2010; RUBINSTEIN *et al.*, 2013). O gene COI é conhecido por não ser eficiente para inferir relações filogenéticas em níveis mais amplos, mas pode ser usado para resolver divergências mais recentes em nível de gênero e espécie (STACH; TURBEVILLE, 2002; IANNELLI *et al.*, 2007; PÉREZ-ORTELA *et al.*, 2009). Diante disso, seria prematuro fazer afirmações sobre a posição de *Trididemnum* na filogenia, sendo necessária uma revisão taxonômica acompanhada de estudos com outros marcadores moleculares para esclarecer essas relações.

O gênero *Didemnum*, o maior e mais comum dentro de Didemnidae, foi evidenciado como monofilético com um bom suporte em todas as análises (Figuras 1, 2 e 3). A topologia da árvore com os dados de COI retratou dois clados bem suportados para o gênero *Didemnum* (Figura 1). O clado 1, composto pelas espécies *Didemnum albidum*, *D. multispirale* e *D. ligulum* é caracterizado pela presença de lingueta atrial, um ou dois folículos testiculares e larva com muitas ampolas, caracteres não observados nas espécies do clado 2. Seguindo essas observações, Monniot (1993) já havia proposto um grupo dentro do gênero *Didemnum*, incluindo espécies com lingueta atrial e dois folículos testiculares. Em 1984, a mesma autora também havia reconhecido o valor taxonômico do número de ampolas presentes na larva.

Didemnum candidum Savigny, 1816, a espécie tipo do gênero, tem um único testículo, larva com três papilas adesivas e quatro ampolas, assim como ausência de lingueta atrial (Lafargue, 1974). Essas características juntamente com os presentes resultados da filogenia molecular sugerem a proposição de um novo gênero para acomodar espécies de *Didemnum* com lingueta atrial, com um ou dois folículos testiculares, larva com múltiplas ampolas, ou qualquer combinação desses caracteres. Como o gênero é muito diverso, uma cisão e reorganização de *Didemnum* pode ser apropriada, embora os caracteres aqui mencionados não pareçam ser universais em ambos os clados, e alguma confusão possa surgir a partir de um ponto de vista puramente morfológico.

A monofilia de *Polysyncraton* é fortemente confirmada pelos dados de COI. A validade desse gênero sempre foi discutida por muitos autores, baseada em argumentos puramente teóricos para distinguir *Polysyncraton* do gênero *Didemnum* (VAN NAME, 1921, 1945; BERRILL, 1950; MONNIOT, 1984; 1993; 1995). *Polysyncraton* e *Didemnum* sempre foram considerados estreitamente relacionados (ELDREDGE, 1966; LAFARGUE, 1975), uma vez que poucos caracteres morfológicos são utilizados para distingui-los. Além disso, a ausência de gônadas e larvas torna difícil separá-los (KOTT, 2001). Curiosamente, o suporte do clado *Didemnum* + *Polysyncraton* para os dados do gene 18S foi baixo (Figura 2), embora essa relação tenha sido confirmada por meio da análise com os dados concatenados (Figura 3). Já para o gene COI, *Didemnum* apareceu como grupo irmão de *Lissoclinum* (Figura 1). Assim, os resultados desse estudo confirmaram a validade de

Polysyncraton, tão firmemente afirmado por outros taxonomistas (ELDREDGE, 1966; KOTT, 2001), mas suas relações com outros gêneros ainda não estão totalmente esclarecidas. Morfologicamente, os caracteres de diagnóstico para o gênero se baseiam em testículo com três ou mais lóbulos e estrutura da abertura atrial, geralmente com uma lingueta. Eldredge (1966) também observou a tendência para um maior número de ampolas nas larvas em comparação com *Didemnum*.

Diplosoma e *Lissoclinum* são os únicos gêneros dentro de Didemnidae que apresentam espermiduto reto, sem o típico espermiduto espiralado presente nos outros didemnídeos. A monofilia de cada um dos gêneros teve um bom suporte na reconstrução filogenética, especialmente com os dados concatenados e do 18S. A relação entre eles e os demais gêneros, por outro lado, não foi totalmente resolvida. Yokobori *et al.* (2006), em uma análise filogenética, não obtiveram suporte para confirmar *Lissoclinum* como monofilético. Contudo, os resultados apresentados pelos autores são semelhantes aos do presente estudo, uma vez que eles também utilizaram 18S. *Diplosoma* e *Lissoclinum* são diferenciados apenas pela presença de espículas (presentes em *Lissoclinum*) (ELDREDGE, 1966; LAFARGUE, 1975). Como mencionado anteriormente, a presença de espículas é um dos caracteres morfológicos quase integralmente presente em Didemnidae. Embora às vezes consideradas como pouco eficientes (LINDQUIST; HAY; FENICAL, 1992), as espículas de didemnídeos parecem ser relevantes para deter predadores. *Diplosoma*, por sua vez, não é só desprovido de espículas, como sua túnica é normalmente macia e mucosa. Assim, esses animais devem certamente depender de outros mecanismos de defesa, tais como compostos químicos tóxicos ou não palatáveis.

Com as análises realizadas no presente estudo não foi possível resolver totalmente as relações dentro de Didemnidae devido a topologias conflitantes e/ou falta de suporte adequado em algumas análises. No entanto, o fraco suporte da relação entre *Didemnum* e *Polysyncraton*, bem como entre *Diplosoma* e *Lissoclinum*, indicado pelos dados do 18S, não foram confirmados com os dados concatenados e morfológicos. Além disso as relações entre esses gêneros já haviam sido observadas em outros estudos com abordagem tipicamente gradista (VAN NAME, 1945; LAFARGUE, 1983; KOTT, 2001). A posição de *Trididemnum* é especialmente complicada, sendo uma pergunta ainda sem resposta definitiva. Avaliações futuras com uma maior amostragem de táxons, aliadas a um conjunto de dados de evidências

moleculares mais abrangente, provavelmente melhorará o conhecimento sobre a evolução desse notável grupo de animais.

5 – CONCLUSÕES

- 1) *Leptoclinides* apresenta divergência mais basal dentre os gêneros de Didemnidae.
- 2) Os gêneros *Didemnum*, *Diplosoma*, *Lissoclinum* e *Polysyncraton* são monofiléticos.
- 3) O gênero *Didemnum* parece incluir dois clados distintos, suportados por caracteres morfológicos e moleculares.
- 4) O gênero *Didemnum* está relacionado com *Polysyncraton*, assim como *Lissoclinum* com *Diplosoma*.

CAPÍTULO 2 – Filogenia do gênero *Didemnum* Savigny, 1816 (Ascidiacea: Didemnidae): uma nova proposta de classificação

Resumo

Didemnidae compreende atualmente oito gêneros segundo a última proposta de classificação. *Didemnum* representa o gênero tipo da família e é o mais diverso dentro de Didemnidae, com cerca de 200 espécies atualmente aceitas. Estudos anteriores para o gênero *Didemnum* focaram na descrição de espécies, enquanto a relação filogenética dentro do gênero permanece pouco esclarecida. Este estudo utilizou sequências do gene mitocondrial COI juntamente com uma avaliação dos caracteres morfológicos tradicionais para determinar as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Didemnum*. As análises com as sequências de COI mostraram dois clados monofiléticos dentro de *Didemnum*. Esses são diferenciados pela presença de lingueta atrial e pelo maior número de ampolas ectodérmicas na larva. Essa divergência morfológica dos caracteres e o resultado da análise molecular sugere uma divisão de *Didemnum* em dois táxons. Com base nessas evidências, propomos um novo gênero de Didemnidae. As análises realizadas não esclareceram totalmente as relações filogenéticas entre as espécies de *Didemnum*. No entanto, uma relação próxima foi revelada entre as espécies de *Didemnum psammatodes* e *Didemnum vexillum*, e entre *Didemnum ahu* e *Didemnum parau*. Possíveis espécies crípticas também foram identificadas.

Palavras-chave: Filogenia, *Didemnum*, morfologia, classificação.

CHAPTER 2 – Phylogeny of *Didemnum* Savigny, 1816 (Ascidiacea: Didemnidae): a new classification proposal

ABSTRACT

Didemnidae comprises eight genera according to the current proposed classification. *Didemnum* is the type genus and is the most diverse in Didemnidae, with about 200 species currently accepted. Previous studies for the genus were focused on descriptions of species, while the phylogenetic relationships within *Didemnum* remains poorly understood. Therefore, this study aims to assess morphological traits and infer the phylogenetic relationships among species of *Didemnum*. This study used sequences of mitochondrial COI gene coupled with an evaluation of traditional morphological characters to assess the phylogenetic relationships within genus *Didemnum*. Analyses with the COI sequences showed two monophyletic clades within *Didemnum*. Those are distinguished by the presence of an atrial lip and larger number of larval ampullae. This morphological divergence and the result of molecular analysis suggested two group of species within *Didemnum*. Based on these evidence, we propose a new genus of Didemnidae. The analysis did not resolve completely the phylogenetic relationships among species of *Didemnum*. However a closer relationship between *Didemnum psammatodes* and *Didemnum vexillum*, and also *Didemnum ahu* and *Didemnum parau* was revealed. Possible cryptic species also were detected.

Keywords: Phylogeny, *Didemnum*, morphology, classification.

CAPÍTULO 2 – Filogenia do gênero *Didemnum* Savigny, 1816 (Ascidiacea: Didemnidae): uma nova proposta de classificação

1 – INTRODUÇÃO

O gênero *Didemnum* Savigny, 1816 é o maior táxon de ascídias coloniais nesta categoria, composto por cerca de 200 espécies (SHENKAR; SWALLA, 2011) amplamente distribuídas desde os trópicos até regiões polares (KOTT, 1969; 2001), sendo considerado cosmopolita. *Didemnum* é o gênero tipo da família Didemnidae e possui como espécie tipo *Didemnum candidum* Savigny, 1816.

Didemnum é diferenciado morfológicamente dos demais gêneros de Didemnidae pela presença de quatro fileiras de fendas, sifão atrial aberto, espermiduto em espiral, um folículo testicular e larva com quatro pares de ampolas ectodérmicas (MONNIOT; MONNIOT; LABOUE, 1991). Todavia, *Didemnum* pode ser representado por espécies que apresentam lingueta atrial, um ou dois folículos testiculares e larva com múltiplas ampolas ectodérmicas (KOTT, 2001).

A validade filogenética de *Didemnum* foi questionada por diversos autores. Esses questionamentos emergiram devido à plasticidade morfológica dos caracteres presentes em *Didemnum* e que também são observados nos outros gêneros de Didemnidae (KOTT, 1962). O compartilhamento dessas características ocorre principalmente com o gênero *Polysyncraton* (MONNIOT, 1993; 1995) que, assim como *Didemnum*, possui lingueta atrial e larva com múltiplas ampolas ectodérmicas, características que são as sinapomorfias de *Polysyncraton* e não de *Didemnum*.

O estudo molecular realizado no capítulo 1 indicou a monofilia dos gêneros *Didemnum* e *Polysyncraton*. No entanto, os resultados com os dados do gene COI revelaram dois grupos dentro de *Didemnum*.

Até o presente momento, a maioria dos estudos realizados com o gênero *Didemnum* foram para descrever espécies, identificar espécies invasoras e diferenciar populações (MONNIOT; MONNIOT, 1987; KOTT, 2001; HIROSE; YOKOBORI; HIROSE, 2008; STEFANIAK *et al.*, 2009; HESS, 2009; LAMBERT, 2009). Estudos sobre a evolução desse grupo ainda são escassos, representando uma lacuna no conhecimento desse táxon.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo estudar a evolução do gênero *Didemnum* por meio de caracteres morfológicos e moleculares (gene COI).

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Material biológico e táxons terminais amostrados

Espécimes do gênero *Didemnum* foram coletados na costa brasileira (Maranhão, Ceará, Espírito Santo e São Paulo) entre 2011 e 2012 e Moorea (Polinésia Francesa) em 2009 e 2012 por meio do projeto Moorea Biocode (mooreabiocode.org).

Todas as colônias coletadas, nas localidades citadas acima, foram anestesiadas com metanosulfonato de tricaina ou cristais de mentol. Cada colônia foi sub-amostrada, preservada em etanol 96% e estocada em freezer a -20°C para o estudo molecular. A outra porção da colônia foi fixada em formaldeído (4% ou 10%) e posteriormente mantida em álcool etílico (70% ou 75%) para os estudos morfológicos. Estas encontram-se depositadas na Coleção Biológica Prof. Edmundo Nonato (ColBIO) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil) e na coleção Zoológica de Invertebrados do *Florida Museum of Natural History* (FLMNH), *University of Florida* (UF) (Gainesville, FL, EUA).

Para a análise filogenética morfológica foram analisados 25 táxons terminais, sendo 23 pertencentes ao grupo-interno e dois ao grupo-externo (*Polysyncraton lacazei* (Giard, 1872) e *Polysyncraton poro* Monniot & Monniot, 1987) (Tabela 1).

Na análise filogenética baseada em dados moleculares foram utilizadas as mesmas espécies da análise morfológica como grupo-interno, com exceção de *Didemnum candidum*. Esta foi a única espécie que não pôde ser incluída nessa análise, pois não havia material para o estudo molecular em nenhuma coleção analisada. Para a análise molecular foram utilizadas as espécies *Polysyncraton* sp.1, *Polysyncraton lacazei* (Giard, 1872), e *Polysyncraton poro* Monniot & Monniot, 1987, como grupo externo. O gênero *Polysyncraton* foi escolhido como grupo externo, no presente estudo, por ser considerado o táxon mais próximo de *Didemnum* (KOTT, 2001). Os códigos de acesso das amostras utilizadas nos estudos molecular, assim como as sequências obtidas do GenBank estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Espécies de *Didemnum* incluídas nas análises morfológicas e moleculares.

Espécie	Localidade de coleta	Material analisado na morfologia	Literatura examinada	Código de acesso (COI)
Grupo externo				
<i>Polysyncraton lacazei</i> (Giard, 1872)	–	–	Lafargue 1968; 1975	AY600986
<i>Polysyncraton poro</i> Monniot & Monniot, 1987	Polinésia Francesa (Moorea)	FLMNH UF 664, UF682 e UF669		UF664 e UF682
<i>Polysyncraton</i> sp.1	–	–	–	TL432
Grupo interno				
<i>Didemnum ahu</i> Monniot & Monniot, 1987	Polinésia Francesa (Moorea)	FLMNH UF574, UF575 e 584	Monniot & Monniot, 1987; 2008	UF584
<i>Didemnum albidum*</i> (Verrill, 1871)	EUA (Golfo de Maine)	–	Marks, 1996	EU419432 e EU419456
<i>Didemnum apuroto</i> Monniot & Monniot, 1987	Polinésia Francesa (Moorea)	FLMNH UF731, UF 813, UF814 e UF815	Monniot & Monniot, 1987	UF731, UF813 e UF814
<i>Didemnum cineraceum</i> (Sluiter, 1898)	São Paulo	ColBio TL839	Monniot F., 1983	TL230, TL839 e UF1250
<i>Didemnum cuculliferum</i> (Sluiter, 1909)	Polinésia Francesa, Moorea	FLMNH UF676, UF724 e UF745	Monniot & Monniot, 1987	UF676 e UF724
<i>Didemnum duplicatum</i> Monniot F., 1983	Brasil (Ceará e Espírito Santo)	ColBio TL15, TL16 e TL811	Monniot F., 1983	TL15, TL16 e TL811
<i>Didemnum fragile</i> Sluiter, 1909	Polinésia Francesa (Moorea)	FLMNH UF693, UF746 e UF839	Kott, 2001	UF693, UF746 e UF839
<i>Didemnum fulgens*</i> (Milne-Edwards, 1841)	–	–	Lafargue, 1968, 1976	JX846617
<i>Didemnum galacteum</i> Lotufo & Dias, 2007	Brasil (Maranhão)	ColBio TL280 e TL332	Lotufo & Dias, 2007	TL280
<i>Didemnum granulatum</i> Tokioka, 1954	Polinésia Francesa, (Moorea) e	FLMNH UF573, UF577, UF771, UF1408 e UF1409	Tokioka, 1954 e Kott, 2001	UF534, UF573, UF601, UF679, UF1408, TL671 e TL686
<i>Didemnum incanum*</i> (Herdman, 1899)	–	–	Kott, 2001	JQ692626 e JQ692628
<i>Didemnum ligulum</i> Monniot F., 1983	Polinésia Francesa, (Moorea)	FLMNH UF568, UF578, UF589, UF591, UF600, UF613, UF694 e UF1387	Monniot, 1983 e Monniot & Monniot, 1987	UF568, UF578, UF589, UF591, UF600, UF613, UF694, UF1387 e TL796
<i>Didemnum membranaceum</i> Sluiter, 1909	Polinésia Francesa, (Moorea)	FLMNH UF526 e UF665	Kott, 2001	UF526, UF549, UF665, UF677, UF720 e UF1389
<i>Didemnum multispirale*</i> Kott, 2001	–	–	Kott, 2001	KC017430
<i>Didemnum mutabile</i> Monniot & Monniot, 1987	Polinésia Francesa, (Moorea)	FLMNH UF689, UF691 e UF692	Monniot & Monniot, 1987; Kott, 2001	UF689, UF691 e UF692,

Espécie	Localidade de coleta	Material analisado na morfologia	Literatura examinada	Código de acesso (COI)
<i>Didemnum nekozita</i> Tokioka, 1967	Polinésia Francesa, (Moorea)	FLMNHUF570, UF571,UF572,UF 585,UF594,UF59 5,UF619, UF725, UF779, UF 1402 e UF1420	Tokioka, 1967; Monniot & Monniot, 1987 e Kott, 2004	UF570, UF571, UF572, UF585, UF594 e UF595
<i>Didemnum parau</i> Monniot & Monniot, 1987	Polinésia Francesa, (Moorea)	FLMNH UF 552 e UF 553	Monniot & Monniot, 1987	UF553
<i>Didemnum patulum</i> * (Herdman, 1899)	–	–	Kott, 2001; 2004	JQ731736
<i>Didemnum perlucidum</i> Monniot, 1983	Brasil (Ceará)	FLMNH UF1023, UF1089, ColBio TL 945 e TL948	Monniot, 1983	TL227 e JQ731740
<i>Didemnum psammatoedes</i> (Sluiter, 1895)	Polinésia Francesa, (Moorea) e Brasil (Ceará)	FLMNH UF538, UF540, UF541, UF542, UF770, UF1071, UF1487, UF1564; ColBio TL799 e TL949	Kott, 2001	UF542 e TL27
<i>Didemnum sordidum</i> Kott, 2001	Polinésia Francesa, (Moorea)	FLMNH UF 597, UF612, UF622, UF718 e UF734	Kott, 2001	UF597, UF612 e UF734
<i>Didemnum vexillum</i> * Kott, 2002	Japão	–	Kott, 2002	JQ663516 e JQ663512

* Espécies com informações taxonômicas obtida apenas da literatura.

2.2 – Dados morfológicos

A taxonomia tradicional tem considerado a presença ou ausência da lingueta atrial, o número de fendas por fileiras, número de folículos testiculares, a forma e diâmetro das espículas e o número de ampolas na larva como caracteres diagnósticos para as espécies dentro de *Didemnum*. Dessa forma, para investigar a variação morfológica das espécies de *Didemnum*, foram observados os caracteres externos e internos de cada espécie em microscópio estereoscópio Nikon, modelo SMZ1500 e SMZ1000. Aspectos da morfologia externa das colônias e informações dos locais de coleta foram obtidos por meio de fotografias e das etiquetas de identificação de cada espécime (Tabela 1). Para analisar a morfologia interna de cada colônia, uma porção da mesma foi obtida por meio de cortes transversais. Esse cortes ou porções das colônias foram imersos na solução de EDTA 10% para a dissolução das espículas, permanecendo apenas a parte orgânica. Após esse processo, zooides e larvas foram dissecados e corados com corante Hemalum de Masson para

visualização de suas estruturas. Quando necessário, foram também imersos em glicerina para diminuir a opacidade dos mesmos.

As espículas foram analisadas a partir de imagens geradas através do microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo Inspect F50, na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. As amostras foram preparadas por meio da retirada de um pedaço da túnica, que foi incinerado para a remoção da parte orgânica. As espículas foram lavadas em etanol e colocadas em uma fita adesiva de carbono dupla face aderida a *stubs*. As amostras foram metalizadas com partículas de ouro (20 nm). A partir da análise desses elementos e de informações da literatura, os dados foram compilados em uma matriz totalizando 29 caracteres, sendo 20 binários e nove multiestado (Tabela 2). Os caracteres foram codificados como não ordenados.

Os caracteres morfológicos foram polarizados seguindo o critério do grupo externo com (0) para o estado plesiomórfico e (1) ou (2) para o estado apomórfico (Apêndice A). Os caracteres morfológicos não aplicados foram indicados com hífen (-) e os não observados com interrogação (?). Um sumário descritivo das espécies utilizadas na sistemática filogenética, comentários e distribuição geográfica sobre essas espécies foi apresentado (Apêndice B).

A matriz de caracteres foi construída no programa Mesquite 2.75 (MADDISON; MADDISON, 2011) e a análise de parcimônia realizada no programa T.N.T v.1.1 (Tree analysis using New Technology) (GOLOBOFF; FARRIS; NIXON, 2003). A busca heurística foi executada utilizando o método de rearranjo de ramos *Tree-Bisection Reconnection* (TBR) com 1000 réplicas e 10 árvores por repetição com um máximo de 10.000 árvores. Após a obtenção das árvores mais parcimoniosas foi gerada a árvore de consenso estrito. O índices de consistência e de retenção da matriz e dos caracteres foram o índice de Bremer e *bootstrap*, calculados no T.N.T v.1.1 para analisar o suporte dos ramos.

2.2.1 – Descrição dos caracteres

A lista de caracteres a seguir é referente aos dados morfológicos usados para produzir a matriz de caracteres.

Caractere 1 – Superfície da colônia;

Lisa (0)

Papilas (1)

Reentrâncias (2)

A superfície da colônia desse grupo pode apresentar diferentes características, podendo ser lisa, com papilas ou reentrâncias (KOTT, 2001).

Caractere 2 – Espessura da colônia (mm)

Maior que 1 (0)

Menor que 1 (1)

A espessura da colônia pode estar diretamente ligada ao tipo de crescimento da mesma. Geralmente essa espessura não ultrapassa 1 mm, apesar de exceções serem encontradas.

Caractere 3 – Forma do sistema da cavidade cloacal.

Horizontal torácico (0)

Profundo (1)

O sistema de cavidade cloacal pode ser categorizado em dois tipos: nível torácico, que abrange apenas o tórax, ou profundo, em um nível que abrange o abdome (Apêndice C – Figuras 1A e 1B) (KOTT, 1962).

Caractere 4 – Consistência da túnica.

Firme (0)

Mole (1)

As ascídias são recobertas por uma túnica que envolve o indivíduo, e no caso de Didemnidae é comum a todos os zooides. A túnica pode apresentar consistência firme ou mole, e isso representa uma particularidade de cada espécie, embora a concentração de espículas possa influenciar na consistência da mesma.

Caractere 5 – Células *bladder*.

Presente (0)

Ausente (1)

Essas células estão presentes dentro da túnica de muitos Didemnidae (KOTT, 1962) e contém ácido sulfúrico em seus vacúolos (HIROSE, 2001). Formam uma camada superficial translúcida, visível em corte.

Caractere 6 – Algas simbiotes

Ausente (0)

Presente (1)

A simbiose é observada nas famílias Polycitoridae e Didemnidae (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essa simbiose ocorre predominantemente com a cianobactéria *Procholoron* Lewin, 1975. Em Didemnidae, existem cerca de 30 espécies incluídas nos gêneros *Didemnum*, *Diplosoma*, *Lissoclinum* e *Trididemnum*, que abrigam células de simbiotes na túnica, cavidade cloacal e da matriz, em uma interação que pode ser facultativa ou obrigatória (Apêndice C – Figuras 2A, 2B e 2C) (HIROSE, 2015).

Caractere 7 – Forma das espículas.

Globular (0)

Estrelada (1)

As espículas são estruturas de carbonato de cálcio (aragonita), encontradas em ascídias coloniais da família Didemnidae, Polycitoridae e em ascídias solitárias da família Pyuridae (LOWENSTAM, 1989). As espículas podem apresentar forma globular (Apêndice C – Figura 3A) e estrelada (Apêndice C – Figura 3B). A densidade e distribuição das espículas é um caractere variável entre as espécies.

Caractere 8 – Diâmetro das espículas (µm).

Menor ou igual a 40 (0)

Maior que 40 e menor ou igual a 80 (1)

Maior que 80 (2)

Caractere 9 – Número de raios na secção transversal.

Maior que 10 (0)

Até 10 (1)

Caractere 10 – Forma dos raios.

Cilíndrico (0)

Cônico (1)

Rombudo (2)

As espículas são consideradas uma importante característica na identificação das ascídias e caracteres como seu diâmetro (**8**), número de raios (**9**) e forma dos mesmos (**10**) são geralmente considerados como critérios de diagnóstico primário (VAROL; HOUGHTON, 1996).

Caractere 11 – Comprimento total do zooide (mm).

Maior que 1 (0)

Menor que 1(1)

Nas ascídias coloniais, os zooides são denominados de indivíduos (RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998). Os zooides em Didemnidae são usualmente pequenos, cerca de 1mm, divididos em tórax e abdome (KOTT, 2001).

12 – Número de fendas na faringe (primeira fileira)

Acima de 8 fendas (0)

Até 8 fendas (1)

O número de fendas em cada fileira na faringe é utilizado como um caractere taxonômico na identificação das espécies de Didemnidae (NAGAYA; HIROSE, 2013).

Caractere 13 – Posição (tórax/abdome).

Linear – 180° (0)

Perpendicular – 90° (1)

Dentro da túnica, o tórax está posicionado em relação ao abdome linearmente ou perpendicularmente.

Caractere 14 – Forma da abertura atrial.

Ampla (expondo mais de 50% da faringe)

Estreita (menor ou igual a 50%)

Estrutura também conhecida como sifão exalante ou abertura cloacal, é o local por onde a água é expelida após passar pela faringe. Nos didemnídeos, essa abertura pode ser encontrada na forma aberta ou em forma de tubo (KOTT, 2001). Em *Didemnum*, *Diplosoma*, *Lissoclinum* e *Polysyncraton* essa estrutura é sempre aberta, contudo em dimensões diferentes (Apêndice C – Figuras 4A e 4B).

Caractere 15 – Lingueta atrial.

Presente (0)

Ausente (1)

Dentro de Didemnidae, a lingueta atrial é encontrada exclusivamente em *Polysyncraton* e em algumas espécies de *Didemnum*, *Diplosoma* e *Lissoclinum* (KOTT, 2001). Esse caractere é uma extensão na porção da parede superior do sifão atrial (Apêndice C – Figura 5) (RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998).

Caractere 16 – Posição do órgão torácico lateral.

Próximo ao endóstilo (0)

Próximo ao sifão atrial (1)

Meio do tórax (2)

Caractere 17 – Forma do órgão torácico lateral.

Circula/oval (0)

Alongado/irregular (1)

Caractere 18 – Projeção do órgão torácico lateral.

Séssil (0)

Saliente (1)

O órgão torácico lateral é uma estrutura localizada no tórax, próximo ao endóstilo ou sifão atrial (16). Essa estrutura pode apresentar diferentes formas (17), e projeções (18), e está relacionada com a produção de espículas (Apêndice C – Figuras 6A, 6B e 6C) (VAN NAME, 1945; LAFARGUE; KNIPRATH, 1978).

Caractere 19 – Comprimento do apêndice fixador.

Ausente (0)

Não ultrapassa o abdome (1)

Ultrapassa o abdome (2)

Caractere 20 – Local de inserção do apêndice fixador.

Fim do tórax (0)

Pedúnculo esofágico retal (1)

O apêndice fixador é uma estrutura muscular, de tamanho variado, com comprimento menor ou maior que o abdome, ou em alguns casos ausente (19). Quando presente, essa estrutura pode estar inserida na porção da base do tórax ou na metade do pedúnculo esofágico retal (20) (Apêndice C – Figuras 7A e 7B). Essa estrutura é responsável pela fixação do zooide na colônia (RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998).

Caractere 21 – Alça intestinal.

Fechada (sobrepõe o estômago) (0)

Aberta (1)

A alça intestinal abriga o tubo esofágico, estômago esférico e o duodeno (KOTT, 2001). Essa alça intestinal pode ser fechada na porção do duodeno, sobrepondo o estômago (Apêndice C – Figura 8A), ou aberta, sem sobreposição (Apêndice C – Figura 8B).

Caractere 22 – Número de voltas no espermiduto.

Menor ou igual a 5 (0)

Maior que 5 e menor ou igual a 8 (1)

Maior que 8 (2)

O espermiduto tem a função de levar o esperma por meio de dutos dos testículos até próximo da abertura atrial (RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998). Os didemnídeos possuem duas formas de espermiduto: reto (Apêndice C – Figura 9A) e em espiral (Apêndice C – Figura 9B). Apenas *Clitella*, *Diplosoma* e *Lissoclinum* dispõem de espermiduto reto. Nos outros gêneros essa estrutura é em espiral, com número de voltas variadas (22), dependendo da espécie. O espermiduto reto representa um caractere plesiomórfico, enquanto espermiduto em espiral é uma apomorfia em Didemnidae. O gênero *Didemnum* apresenta espermiduto em espiral (Apêndice C – Figura 9B).

Caractere 23 – Número de folículos testiculares.

Múltiplos (0)

Bilobado (1)

Único (2)

O gênero *Polysyncraton* pode conter três folículos ou mais (Apêndice C – Figura 10A). O gênero *Didemnum* apresenta sempre folículos bilobados (Apêndice C – Figura 10B) ou globulares (Apêndice C – Figura 10C). No presente estudo, os múltiplos folículos foram considerados como um estado plesiomórfico, com folículos bilobados ou único representando estados apomórficos.

Caractere 24 – Comprimento do tronco da larva (mm).

Maior que 1 (0)

Menor que 1 e maior que 0.5 (1)

Menor ou igual a 0.5 (2)

Caractere 25 – Tamanho da cauda na larva incubada.

Mais da metade do tronco da larva (0)

Até metade do tronco da larva (1)

Caractere 26 – Número de ampolas ectodérmicas (pares).

Maior que 8 (0)

Menor ou igual a 8 e maior que 4 (1)

Até 4 (2)

Caractere 27 – Número de papilas adesivas

Três (0)

Duas (1)

Os caracteres presentes na larva (Apêndice C – Figura 11), como comprimento do tronco na larva incubada (24), tamanho da cauda da larva (25), número de ampolas ectodérmicas (26) e o número de papilas adesivas (27), são importantes na identificação das espécies sendo considerados elementos de diagnóstico primário (ELDREDGE, 1966; KOTT, 2001).

Caractere 28 – Número de fileiras de fendas no oozooide.

Quatro (0)

Três (1)

As larvas apresentam um oozooide que é conhecido como o primeiro zooide da colônia (RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998). O oozooide apresenta três fileiras de fendas nos gêneros *Didemnum* e *Trididemnum* e quatro nos demais gêneros da família Didemnidae (KOTT, 2001).

Caractere 29 – Blastozooides

Presente (0)

Ausente (1)

Quando as larvas apresentam blastozooides são denominadas de gemíparas. Nas espécies de quase todos os gêneros estão presentes quatro fileiras de fendas, exceção apenas para *Trididemnum*, em que esse número é de três fileiras de fendas (KOTT, 2001).

Tabela 2 – Lista de caracteres morfológicos para as espécies de *Didemnum* (Ascidiacea: Didemnidae).

Caráter	Estados de caráter
1 – Superfície da colônia	Lisa (0) Papilas (1) Reentrâncias (2)
2 – Espessura da colônia (mm)	Maior que 1 (0) Menor que 1 (1)
3 – Forma do sistema de cavidade cloacal	Horizontal torácico (0) Profundo (1)
4 – Consistência da túnica	Rígida (0) Quebradiça (1)
5 – Células <i>bladder</i>	Presente (0) Ausente (1)
6 – Algas simbiontes	Ausente (0) Presente (1)
7 – Formas das espículas	Globular (0) Estrelada (1)
8 – Diâmetro das espículas (μm)	Menor ou igual a 40 (0) Maior que 40 e menor ou igual a 80 (1) Maior que 80 (2)
9 – Número de raios na secção transversal	Maior que 10 (0) Até 10 (1)
10 – Forma dos raios	Cilíndrico (0) Cônico (1) Rombudo (2)
11 – Comprimento total do zooide (mm)	Maior que 1 (0) Menor ou igual a 1 (1)
12 – Número de fendas na faringe (primeira fileira)	Acima de 8 (0) Até 8 (1)
13 – Posição (tórax/abdome)	Linear-180° (0) Perpendicular-90° (1)
14 – Forma da abertura atrial	Ampla (0) Estreita (1)
15 – Lingueta atrial	Presente (0) Ausente (1)
16 – Posição do órgão torácico lateral	Próximo ao endóstilo (0) Próximo ao sifão atrial (1) Meio do tórax (2)
17 – Forma do órgão torácico lateral	Circular/oval (0) Alongado/irregular (1)
18 – Projeção do órgão torácico lateral	Séssil (0) Saliente (1)
19 – Comprimento total do apêndice fixador	Ausente (0) Menor que o abdome (1) Maior que o abdome (2)
20 – Local de inserção do apêndice fixador	Fim do tórax (0) Pedúnculo esofágico retal (1)
21 – Alça intestinal	Fechada (sobrepõe o estômago) (0) Aberta (1)
22 – Número de voltas do espermiduto	Menor ou igual a 5 (0) Maior que 5 e menor ou igual a 8 (1) Maior que 8 (2)
23 – Número de folículos testiculares	Múltiplos (0) Bilobado (1) Único (2)
24 – Comprimento do tronco da larva (mm)	Maior que 1 (0) Menor que 1 e maior que 0.5 (1) Menor ou igual a 0.5 (2)
25 – Tamanho da cauda na larva incubada (mm)	Mais da metade do tronco (0) Até metade do tronco (1)
26 – Ampolas ectodérmicas-pares	Maior que 8 (0) Menor ou igual a 8 e maior que 4 (1) Até 4 (2)
27 – Numero de papilas adesivas	Três (0) Duas (1)
28 – Número de fileiras de fendas no oozooide	Quatro (0) Três (1)
29 – Blastozoides	Presente (0) Ausente (1)

2.4 – Dados moleculares

Todos os procedimentos de extrações e ampliações do DNA foram realizados no Laboratório de Ecologia Animal (LECA) do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará (UFC) e no Laboratório de Biologia Molecular do *Florida Museum of Natural History* (FLMNH), *University of Florida* (UF) (Gainesville, Flórida, EUA). O DNA total foi extraído utilizando dois protocolos distintos, baseado no uso de Kit de extração (Dneasy Blood & Tissue kit ou QIAamp DNA mini kit – Qiagen) ou do reagente Chelex 100 (WALSH; METZGER; HIGUCHI, 1991). Para a extração por meio de kit foram dissecados cerca de 20-40 tórax. Estes foram incubados *overnight* em banho seco a 56°C, com tampão de lise e proteinase K, seguindo as instruções dos fabricantes. Após a extração, o DNA isolado foi quantificado em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e até 100 ng utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR). Já para a extração do DNA utilizando Chelex foi removido um pedaço da colônia. Este foi cortado em pequenos pedaços e incubado a 55°C *overnight* em 150 µL de uma solução aquosa de Chelex a 10% mais 10 µL de proteinase K. Para o PCR foi utilizado 1 µL do sobrenadante. O gene COI foi amplificado utilizando os iniciadores (*primers*) listados na Tabela 3.

O DNA foi amplificado em um volume final de reação de 25 µL, contendo 12,5 µL de Amplitaq (Applied Biosystems) ou Gotaq (Promega), 1 µL (0,4 µM) de cada iniciador (*forward* e *reverse*), DNA e água para completar 25 µL de reação. As condições de ciclo da PCR estão listadas na Tabela 4. A amplificação foi realizada em termocicladores C1000 Thermal cycler (Bio-Rad) ou PTC-100.

Tabela 3 – Iniciadores para o gene mitocondrial COI.

Marcador	Iniciadores	Referência
COI	TunF - 5'TCGACTAATCATAAAGATATTAG3' TunR - 5'AACTTGTATTTAAATTACGATC3'	Stefaniak <i>et al.</i> , 2009
COI	DidF - 5'TATCIACIAATCATAAAGATATTG G3' DidR - 5'CTTCTYCYGRWGGRTCAAAAARCT3'	Presente estudo

Tabela 4 – Protocolo de amplificação para o gene COI.

Iniciadores	Desnaturação inicial	Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
TunF e TunR	95°C/4 min	40	94°C/1 min	39°C/1 min	72°C/1.5min	72°C/10min
DidF e Did R	95°C/2.5 min	40	94°C/40seg	44°C/40seg	72°C/1 min	72°C/10min

Os produtos de PCR foram corados com SYBR Safe DNA gel Stain (Life Technologies) (100 X) e visualizados em gel de agarose a 2% preparado com tampão Tris borato EDTA (TBE 0,5 X). O marcador de massa molecular de DNA de 1 Kb foi utilizado para se saber o tamanho do fragmento amplificado. A corrida da eletroforese ocorreu a uma voltagem de 80 V e corrente de 40 mA, utilizando como tampão de corrida o TBE 0,5 X. As bandas da eletroforese foram visualizadas em fotodocumentador ultravioleta Gel DocTM (Bio-Rad).

As bandas foram quantificadas utilizando o software Image LabTM 2.0 (Bio-Rad). Os produtos de PCR foram purificados com endonuclease ExoSAP-IT (Affymetrix-USB), seguindo as indicações do fabricante.

Para as amostras com procedimento realizado no LECA, o sequenciamento aconteceu de duas formas: pela empresa Macrogen (Korea), utilizando o sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems) e no Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM) no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará (UFC), utilizando o sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems). Para a reação de sequenciamento realizada no CEDECAM foram utilizados os seguintes reagentes: 2 µL de Big Dye, 1 µL de tampão 5X, 0,32 µL de iniciador a 10 µM, DNA e água para um volume de reação de 10 µL. Os iniciadores utilizados nessa etapa foram os mesmos utilizados na PCR. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador Veriti (Applied Biosystems) utilizando o programa de termociclagem universal com desnaturação inicial a 96 °C a 1 minuto, seguindo desnaturação inicial a 96°C por 10 segundos, hibridização a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C a 4 minutos (25 ciclos). Após essa etapa os amplicons passaram pelos processos de precipitação e purificação utilizando isopropanol (65%) e etanol (60%), respectivamente. Os amplicons foram ressuspensos em formamida (Applied

Biosystems). Após esse processo, as amostras foram colocadas no sequenciador. As amostras amplificadas no FLMNH foram sequenciadas no *Interdisciplinary Center for Biotechnology Research (University of Florida)*.

2.5 – Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos obtidas no presente estudo foram editadas no programa Geneious v.7-Biomatter. Estas e as obtidas do GenBank foram alinhadas no programa MAFFT (KATO;STANDLEY, 2013) utilizando o algoritmo L-INS-i. O conjunto de dados para o gene COI constitui de 65 sequências com 512 pb para 22 espécies de *Didemnum*. O modelo de evolução GTR com gamma parâmetros de 0.2850 foi escolhido usando *Akaike Information Criterion (AIC)* pelo o programa JModelTest (DARRIBA *et al.*, 2012). Todas as árvores filogenéticas foram construídas através do programa Geneious. A árvore por máxima verossimilhança (ML) foi construída no programa PhyML (GUIDON *et al.*, 2010), enquanto a inferência Bayesiana (BI) no programa MrBayes 3.2.2 (RONQUIST *et al.*, 2012). Como suporte estatístico foi utilizado *bootstrap* com 1000 réplicas e probabilidade posterior para as análises de ML e BI, respectivamente. A BI foi realizada com quatro cadeias *Markov-Monte Carlo (MCMC)* em cinco milhões de gerações. A cada 1000 gerações as árvores foram amostradas e um total de 25% destas descartadas em *burn-in*.

3 – RESULTADOS

3.1 – Análise dos dados morfológicos

A busca tradicional com pesos iguais dos caracteres resultou em oito árvores igualmente parcimoniosas, com comprimento de 95 passos, índices de consistência IC=0,400 e de retenção IR=0,593. A árvore consenso teve comprimento de 114 passos e índices de consistência IC=0,33 e retenção IR=0,45 (Figura 12). Os valores de suporte de Bremer e de *bootstrap* não foram significativos, dessa forma não foram apresentados. As séries de transformações dos caracteres apomórficos foram apresentadas na Tabela 5. Para a árvore obtida foi calculado o número de transformações de cada caractere e os índices de consistência (IC) e retenção (IR) dos mesmos (Tabela 6).

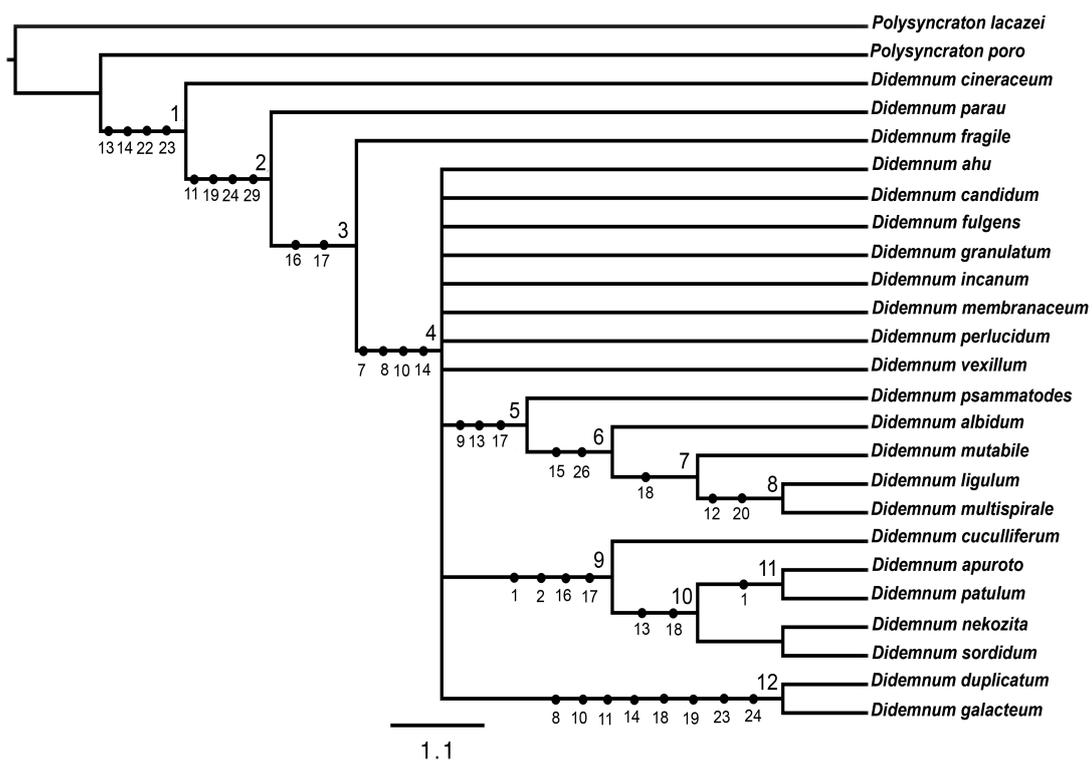


Figura 12 – Consenso estrito das oito árvores mais parcimoniosas, com comprimento de 114 passos, índices de consistência 0,33 e retenção 0,45. Os números acima dos nós indicam sua posição e abaixo os caracteres.

Tabela 5 – Nós e transformação dos caracteres apomórficos.

Nós	Transformação dos caracteres
1	13* (0-1); 14* (0-1); 22 (0-1) e 23 (0-1)
2	11* (0-1); 19* (2-1); 24* (0-1) e 29 (0-1)
3	16* (0-1) e 17* (0-1)
4	7 (0-1); 8* (0-1); 10 (0-1) e 14* (1-0)
5	9 (1-0); 13* (1-0) e 17* (1-0)
6	15 (1-0) e 26 (2-0)
7	18* (0-1)
8	12 (1-0) e 20* (0-1)
9	1 (0-1); 2 (0-1); 16* (1-0) e 17* (1-0)
10	13* (1-0) e 18* (0-1)
11	1 (1-2)
12	8* (1-0); 10 (1-2); 11* (1-0); 14* (0-1); 18* (0-1); 19* (1-2); 23 (2-1) e 24* (2-1)

* Apomorfia homoplásica.

Tabela 6 – Número de passos, índices de consistência e retenção para cada caractere analisado.

Caracteres	Número de passos	Índice de consistência	Índice de retenção
1 – Superfície da colônia	1	0,67	0,84
2 – Espessura da colônia (mm)	1	1,00	1,00
3 – Forma do sistema de cavidade cloacal	4	0,25	0
4 – Consistência da túnica	2	0,50	0,85
5 – Células <i>bladder</i>	4	0,25	0
6 – Algas simbiontes	3	0,33	0
7 – Forma das espículas	2	0,50	0,67
8 – Diâmetro das espículas (μm)	7	0,33	0,55
9 – Número de raios na secção transversal	1	0,67	0,75
10 – Forma dos raios	3	0,67	0,75
11 – Comprimento total do zooide (mm)	5	0,20	0,55
12 – Número de fendas na faringe (primeira fileira)	3	0,33	0,60
13 – Posição (tórax/abdome)	5	0,20	0,43
14 – Forma da abertura atrial	5	0,20	0,56
15 – Lingueta atrial	1	1,00	1,00
16 – Posição do órgão torácico lateral	6	0,33	0,50
17 – Forma do órgão torácico lateral	4	0,25	0,70
18 – Projeção do órgão torácico lateral	6	0,16	0,50
19 – Comprimento total do apêndice fixador	7	0,28	0,28
20 – Local de inserção do apêndice fixador	2	0,50	0
21 – Alça intestinal	4	0,25	0

Caracteres	Número de passos	Índice de consistencia	Índice de retenção
22 – Número de voltas do espermiduto	3	0,66	0,66
23 – Número de folículos testiculares	2	1,00	1,00
24 – Comprimento do tronco da larva (mm)	7	0,28	0,16
25 – Tamanho da cauda na larva incubada (mm)	1	1,00	1,00
26 – Número de ampolas ectodérmicas (pares)	4	0,50	0,60
27 – Número de papilas adesivas	1	1,00	0
28 – Número de fileiras de fendas no oozooide	1	1,00	0
29 – Blastozooide	2	0,50	0,50

O resultado apresentado pelo cladograma de consenso estrito não resolveu as relações filogenéticas dentro de *Didemnum*. Os caracteres utilizados no presente estudo revelaram muitas transformações, indicando que os mesmos surgiram várias vezes na evolução do grupo, sendo portanto considerados como homoplásicos. Após essa análise, percebeu-se que dos 29 caracteres utilizados para inferir a relação evolutiva dentro de *Didemnum*, apenas 11 deles foram informativos para sustentar os clados formados.

O caractere (29:1), referente ao blastozooide, sustentou o clado formado por *Didemnum parau* e todos os outros *Didemnum*. A forma das espículas (7) e raios (10) sustentaram o clado formado por todos os *Didemnum*, excluindo *Didemnum cineraceum*, *Didemnum parau* e *Didemnum fragile*. O número de raios na secção transversal (9) suportou o clado formado por *Didemnum psammatores* (*Didemnum albidum* (*Didemnum mutabile* (*Didemnum multispirale* + *Didemnum ligulum*))). Já o clado formado por *Didemnum albidum* (*Didemnum mutabile* (*Didemnum multispirale* + *Didemnum ligulum*)) foi suportado pela lingueta atrial (15) e pelo número de ampolas ectodérmicas (26); enquanto (*Didemnum ligulum* + *Didemnum multispirale*) é suportado pelo número de fileiras de fendas (12) (Figura 12). O grupo formado por (*Didemnum cuculliferum* (*Didemnum sordidum* + *Didemnum nekozita*) + (*Didemnum patulum* + *Didemnum apuroto*))) foi suportado pelos caracteres: (1:1) superfície da colônia e (2:1) espessura da colônia; contudo, o clado (*Didemnum patulum* + *Didemnum apuroto*) sofreu reversão do caractere (1:2). O clado (*Didemnum*

duplicatum + *Didemnum galacteum*) foi suportado pela forma do raio (10:2) e o número de folículos testiculares (23:1) (Figura 12).

3.2 – Análise dos dados moleculares

Foram utilizadas 65 sequências do gene COI de 22 espécies de *Didemnum*, sendo 55 obtidas no presente estudo e 10 obtidas do GenBank. As análises de máxima verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (BI) obtiveram árvores com topologias semelhantes (Figuras 13 e 14). *Didemnum* foi dividido em dois clados, indicados por ambas as análises. Para o clado A, representado pelas espécies *Didemnum albidum*, *D. multispirale* e *D. ligulum* o valor de *bootstrap* foi alto (99) e a probabilidade posterior alta (1) (Figuras 13 e 14). Já para o clado B, contendo todas as outras espécies de *Didemnum*, o valor de *bootstrap* foi moderado (78) e a probabilidade posterior também alta (1) (Figuras 13 e 14). A topologia de dois clados (observada na análise entre os gêneros de Didemnidae, Capítulo 1) dentro de *Didemnum* foi mantida, apesar da inclusão de mais táxons terminais.

As relações filogenéticas entre as espécies dentro de *Didemnum* não foram totalmente esclarecidas para o conjunto de espécies analisadas. Contudo a árvore de ML e BI sugerem uma relação próxima entre as espécies *Didemnum vexillum* e *Didemnum psammatores* com alto valor de *bootstrap* (98) e probabilidade posterior (1).

O espécime de *Didemnum ligulum* oriundo do Brasil (BRA) está mais próximo filogeneticamente da espécie *Didemnum multispirale* (Austrália, AUS) que dos espécimes oriundos da Polinésia Francesa (PYF). Nas análises de máxima verossimilhança e inferência Bayesiana, a relação entre essas espécies apresentou suportes muito altos, com valores de *bootstrap* (98/97) e probabilidade posterior (1/1) para o clado (*Didemnum ligulum*-PYF (*Didemnum ligulum*-BRA + *Didemnum multispirale*-AUS)) e (*Didemnum ligulum*-BRA + *Didemnum multispirale*-AUS), respectivamente (Figuras 13 e 14).

Os resultados também sugerem uma relação próxima entre (*Didemnum ahu* (*Didemnum galacteum* + *Didemnum parau*), apesar dos valores de suporte

controversos nas análises de ML e BI. A análise da inferência Bayesiana apresentou uma relação forte para esse clado com probabilidade posterior 0.93. Porém, o resultado para a análise de máxima verossimilhança teve um baixo valor de suporte. Outros clados dentro de *Didemnum* foram formados pelas análises de máxima verossimilhança e Inferência Bayesiana, contudo com baixos valores de suporte.

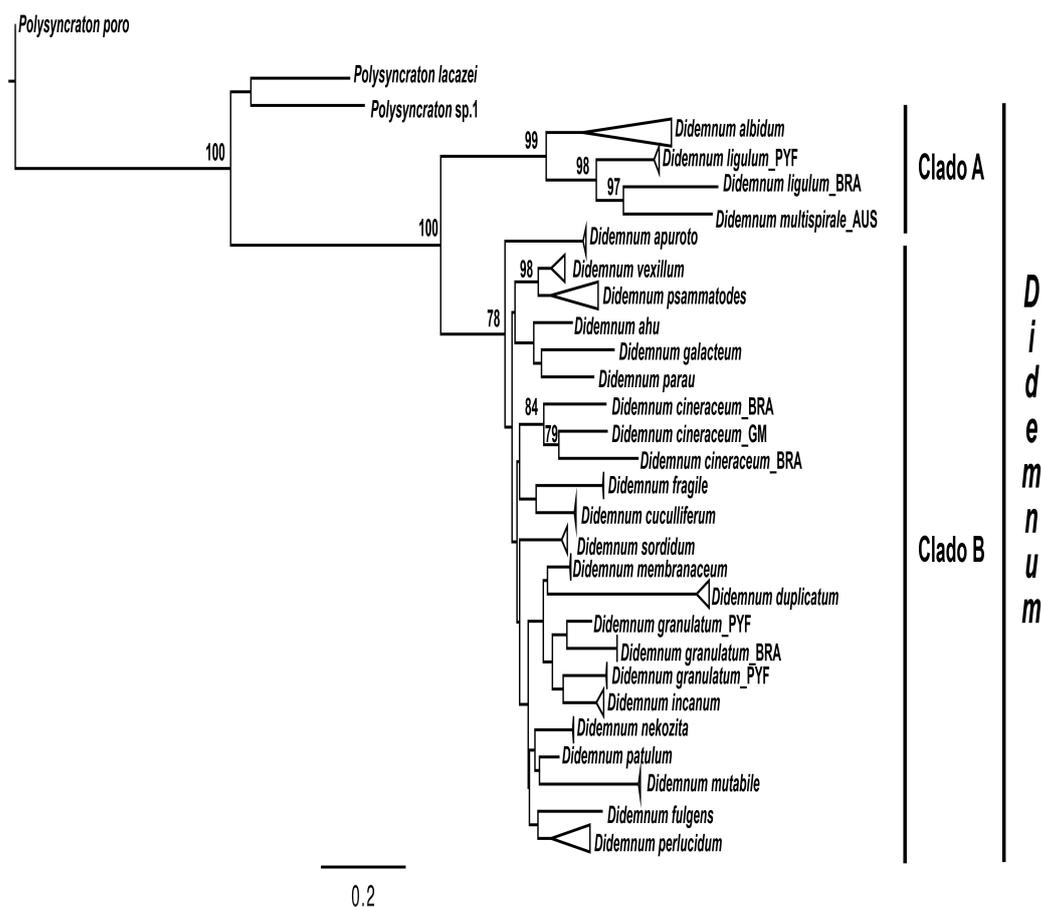


Figura 13 – Hipótese filogenética molecular do gênero *Didemnum* baseada no gene mitocondrial COI. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap* maior que 60% para a análise de máxima verossimilhança (ML). Legendas: GM – Golfo do México, BRA – Brasil, PYF – Polinésia Francesa, e AUS – Austrália.

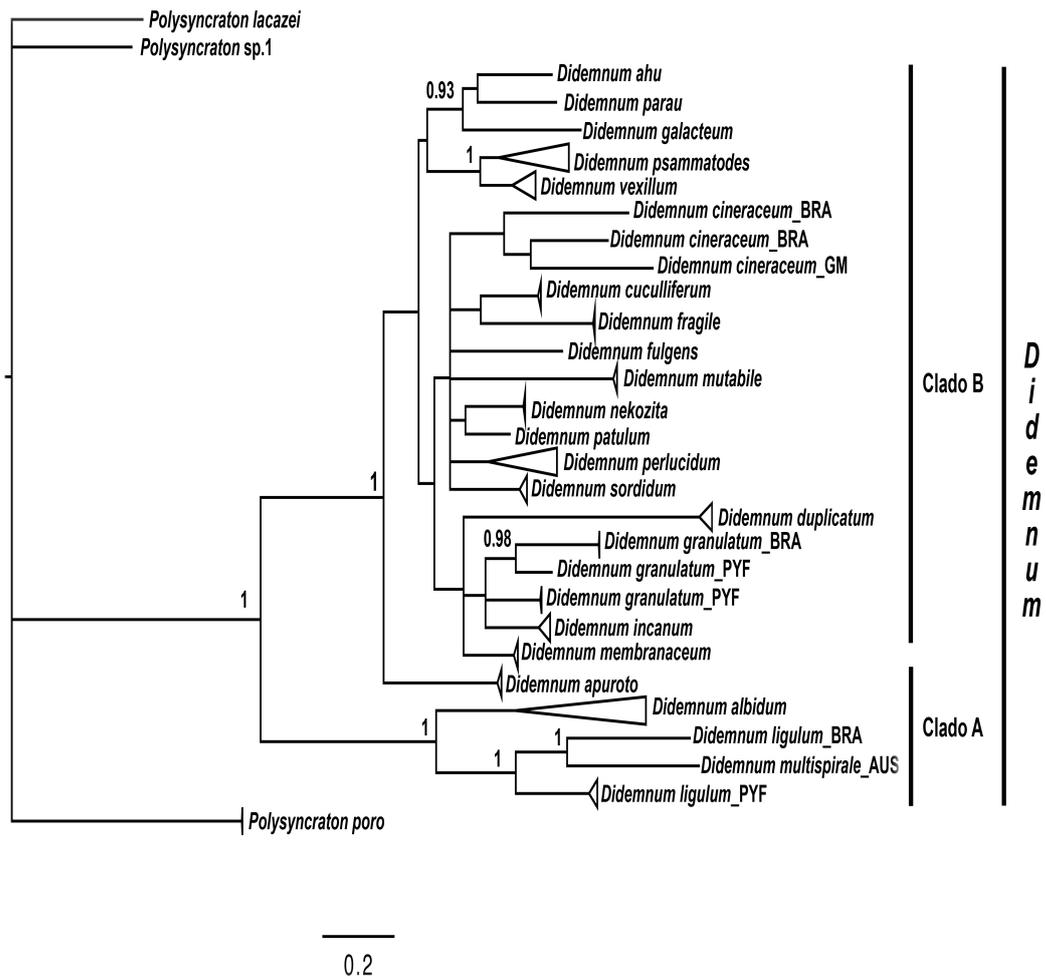


Figura 14 – Hipótese filogenética molecular do gênero *Didemnum* baseada no gene mitocondrial COI. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap* maior que 0.9 para a inferência Bayesiana. Legendas: GM – Golfo do México, BRA – Brasil, PYF – Polinésia Francesa, e AUS – Austrália.

4 – DISCUSSÃO

Esse estudo representa a primeira análise filogenética para as espécies do gênero *Didemnum*, incluindo a amostragem mais ampla do grupo até o momento. Como a análise baseada em dados morfológicos não apresentou suporte, as relações filogenéticas entre as espécies não foram esclarecidas. Todos os caracteres morfológicos que validam os clados formados em *Didemnum* são homoplásicos dentro da família Didemnidae, ou seja, surgiram diversas vezes dentro da evolução desse táxon. Esse fato indica a dificuldade no estabelecimento de hipóteses de homologia primária em caracteres morfológicos para se estabelecer as relações evolutivas dentro de Didemnidae.

A verificação disso pode ser exemplificada pelas sinapomorfias que suportam o gênero *Didemnum*: número de voltas no espermiduto (maior que 5) e número de folículos testiculares (um ou dois). Esse primeiro caractere encontra-se presente em *Leptoclinides* e *Trididemnum* no mesmo estado de transformação; já o segundo está em todos os outros gêneros de Didemnidae (KOTT, 2001).

Segundo Kott (2001) os caracteres que efetivamente distinguem *Didemnum* dos outros gêneros de Didemnidae são a forma do espermiduto reto em *Lissoclinum* e *Diplosoma*; o largo zooide, ausência do apêndice fixador e sifão atrial tubular em *Leptoclinides*; três fileiras de fendas em *Trididemnum* e zooide amplo, com poucas voltas no espermiduto e múltiplos folículos testiculares em *Polysyncraton*.

O resultado molecular com o gene COI foi congruente com resultados mostrados anteriormente (capítulo 1) para *Didemnum*, mesmo com a inclusão de mais espécies. A topologia das árvores de ML e BI com os dados de COI confirmam dois grupos monofiléticos dentro de *Didemnum* (Figuras 13 e 14). Morfológicamente, o gênero *Didemnum* pode ser dividido dentro de dois grupos de espécies: um grupo com características da espécie *Didemnum albidum* (Verrill, 1871) e outro grupo representado pela espécie tipo do gênero *Didemnum candidum* Savigny, 1816 (MARKS, 1996; LAFARGUE, 1974). O grupo de espécies de *Didemnum albidum* foi representado pelo clado A e compreende *D. albidum*, *D. ligulum* e *D. multispirale*. Esse grupo é caracterizado principalmente pela presença de lingueta atrial, um ou dois folículos testiculares e larva com oito ou mais pares de ampolas ectodérmicas. O

mesmo foi evidenciado e validado pelos caracteres morfológicos lingueta atrial (15) e número de ampolas ectodérmicas (26) pela análise com os dados morfológicos, contudo com a inclusão de *Didemnum mutabile*.

O grupo de espécies em que a maioria possui características como *D. candidum* foram representados pelas demais espécies aqui analisadas (clado B). Esse grupo é caracterizado por um único folículo testicular, larva com quatro pares de ampolas e ausência de lingueta atrial (LAFARGUE, 1974), embora algumas exceções sejam observadas (testículo com dois folículos – *Didemnum duplicatum* e *Didemnum galacteum*; algumas vezes, lingueta atrial – *Didemnum mutabile*). Esses são os caracteres utilizados como limites taxonômicos para a diagnose do gênero *Didemnum*.

Os caracteres apontados para a classificação do clado A são confiáveis para distingui-lo dos demais gêneros de Didemnidae, embora confusões sejam apresentadas devido a caracteres morfológicos que são compartilhados principalmente com os gêneros *Polysyncraton* e *Didemnum* (MONNIOT, 1984, 1993, 1995).

A validade sistemática do gênero *Polysyncraton* já foi bastante questionada (VAN NAME, 1921, 1945; MONNIOT, 1984, 1993, 1995). Esse questionamento se deve em função de caracteres que são inerentes a *Polysyncraton*, mas que também são observados em espécies do gênero *Didemnum*, que neste estudo foi o grupo de espécies do clado A. Mesmo lembrando o gênero *Polysyncraton*, as espécies do clado A são diferenciadas pelo número de folículos testiculares, três ou mais em *Polysyncraton*. Para Monniot (1984) esse é o único caractere que justifica *Polysyncraton* como um grupo natural. Já para Kott (2001) a presença de características de *Polysyncraton* em *Didemnum* (clado A) apresenta uma convergência ou mesmo uma afinidade entre ambos, no entanto não pode ser caracterizada como uma analogia. Contudo, apesar desses questionamentos quando à validade de *Polysyncraton*, os resultados apresentados no capítulo 1 confirmam sua monofilia.

As espécies do grupo *Didemnum albidum* (clado A) formam um grupo irmão das outras espécies representadas pelo clado B. Quanto a morfologia tradicional, os cladogramas A e B apresentam em comum o número de folículos testiculares (um ou dois), a quantidade superior a cinco voltas no espermiduto, número de fendas no oozooide e número de papilas adesivas (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE,

1991; MARKS, 1996; KOTT, 2001). No entanto, são diferenciados pela presença de lingueta atrial e larva com múltiplas ampolas ectodérmicas observada apenas no clado A (KOTT, 2001).

Marks (1996), analisando três espécies de *Didemnum*, inclusive *Didemnum albidum*, apontou que o grupo representado por essa espécie é um grupo em transição entre os gêneros *Polysyncraton* e *Didemnum*, contudo baseado em evidências apenas morfológicas.

Dessa forma, considerando os aspectos da taxonomia tradicional e os dados moleculares, o presente estudo sugere a divisão das espécies representadas no clado A e no clado B, com a manutenção do gênero *Didemnum* (clado B) e a constituição de um novo gênero de Didemnidae para acomodar as espécies do clado A. Além disso, sugerimos uma revisão taxonômica e reorganização dos gêneros *Didemnum* e *Polysyncraton*. Uma comparação morfológica dos caracteres diagnósticos entre *Didemnum*, *Polysyncraton* e o novo gênero proposto é apresentada (Apêndice D).

Os resultados moleculares mostraram que as relações filogenéticas dentro de *Didemnum* não estão esclarecidas, apesar de algumas relações serem evidenciadas. Na análise BI, *Didemnum galacteum* foi táxon irmão de (*Didemnum parau* + *Didemnum ahu*), com probabilidade posterior moderada 0.93. Morfologicamente, *Didemnum parau* tem espículas de forma globular, com diâmetro de 30 µm, raios tipo agulha, lembrando as espículas de *Lissoclinum*. Essa espécie apresenta também outra característica marcante: o órgão torácico lateral saliente (MONNIOT; MONNIOT, 1987). Já a espécie *Didemnum ahu* se diferencia de *D. parau* pela forma estrelada das espículas e o número de 10 voltas no espermiduto, sendo que em *D. parau* esse número é de sete voltas (MONNIOT; MONNIOT, 1987; LOTUFO; DIAS, 2007). *Didemnum galacteum* se separa das outras espécies pela forma e raios das espículas, embora o caractere mais marcante seja o número de folículos testiculares, dois em *D. galacteum* (LOTUFO; DIAS, 2007) e um nas demais espécies (MONNIOT; MONNIOT, 1987). Todas essas espécies possuem larvas simples, com três papilas adesivas e quatro pares de ampolas ectodérmicas.

Os resultados moleculares mostraram uma relação próxima entre *Didemnum vexillum* e *Didemnum psammatores* pelas análises de ML e BI, com um

alto suporte de *bootstrap* (98) e probabilidade posterior (1). Morfologicamente, essas espécies são distintas e a principal característica para diferenciá-las é o número de ampolas ectodérmicas - quatro em *D. psammatodes* e seis em *D. vexillum* (KOTT, 2001, 2002). Essas duas espécies apresentam ampla distribuição ao redor do mundo, sendo consideradas cosmopolitas.

Os dados morfológicos e moleculares foram conflitantes quanto à relação filogenética entre as espécies *Didemnum duplicatum* e *Didemnum galacteum*. A topologia da árvore filogenética baseada na morfologia indica uma relação próxima dessas espécies, suportado pela forma dos raios das espículas (10:2) e o número de folículos testiculares (23:1). Já os dados com o gene COI nas análises de ML e BI não confirmaram essa hipótese, indicando que essas espécies não são proximamente relacionadas (Figuras 13 e 14). Taxonomicamente, a espécie *Didemnum galacteum* se assemelha a *D. duplicatum* na forma e diâmetro das espículas, faringe e gônadas com dois folículos testiculares (MONNIOT, 1983; LOTUFO; DIAS, 2007). Essas espécies são diferenciadas principalmente pela presença de quatro pares de ampolas na larva de *D. galacteum* (LOTUFO; DIAS, 2007), enquanto *D. duplicatum* apresenta 8 pares (MONNIOT, 1983). Dessa forma, o resultado apresentado pelo gene COI revela que *D. duplicatum* e *D. galacteum* são de fato distintas e encontradas em simpatria.

Os espécimes de *Didemnum ligulum* oriundos do Brasil e Polinésia Francesa apresentam divergência pela análise de ML e BI com os dados do gene COI. Essa espécie possui ampla distribuição, com registro em Guadalupe (MONNIOT, 1983), Brasil (ROCHA *et al.*, 2011) e Polinésia Francesa (MONNIOT; MONNIOT, 1987). Segundo a descrição original essa espécie possui coloração cinza, enquanto o material da Polinésia Francesa e Brasil é laranja. Contudo os mesmos apresentam a mesma morfologia do zooide e larva.

O resultado molecular revela uma diversidade críptica para a espécie *Didemnum granulatum* com três clados formados pela análise de ML e BI. Segundo a taxonomia tradicional, *D. granulatum* tem como características papilas na superfície, espículas estreladas, faringe com 6, 6, 5 e 4 fendas por fileiras, espermiduto em espiral com seis voltas e larva com três papilas e quatro ampolas ectodérmicas, além da ampla variação de cor (KOTT, 2001). As espécies dos três clados são distintas de acordo com gene COI, apesar de morfolologicamente muito similares, indicando um

possível complexo de espécies crípticas. Resultados similares já haviam sido apresentados para a espécie *D. granulatum* de coloração laranja e bege oriundas do Brasil (BOUZON *et al.*, 2014).

O uso do gene COI tem se mostrado eficiente na detecção de espécies crípticas em Didemnidae (HIROSE *et al.*, 2008; PÉREZ-ORTELA *et al.*, 2013; BOUZON *et al.*, 2014). Isto sugere que mais estudos moleculares são necessários para a identificação e detecção dessas espécies. Estudos posteriores com diferentes marcadores moleculares podem reforçar as relações filogenéticas aqui discutidas, além de esclarecer outras que não foram reveladas.

5 – CONCLUSÕES

- 1) O gênero *Didemnum* inclui pelo menos dois clados distintos, sendo desta forma proposto um novo gênero de Didemnidae.
- 2) Esse novo gênero têm como características diagnósticas a presença de lingueta atrial e o número de ampolas ectodérmicas (igual ao maior que 8) na larva.
- 3) Os caracteres morfológicos são em sua maioria homoplásicos, não sendo suficientemente informativos para determinar relações filogenéticas robustas dentro de Didemnidae. Os dados moleculares por sua vez se mostraram eficientes na determinação dessas relações.
- 4) O gene COI é eficiente na detecção de espécies crípticas, para o gênero *Didemnum*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As ascídias da família Didemnidae apresentam uma alta diversidade, estando presentes em diversos ecossistemas e em diferentes profundidades. Didemnidae é considerado pela maioria dos especialistas como um grupo cuja taxonomia e filogenia são mais complicadas de se estabelecer. Isto se deve ao reduzido número de caracteres morfológicos utilizados em sua diagnose, juntamente com a difícil caracterização das espécies devido ao diminuto tamanho do zooide (cerca de 1 mm). Essas limitações do grupo se refletem diretamente no conhecimento sobre sua evolução.

Antes do presente estudo as inferências evolutivas de Didemnidae haviam sido propostas apenas pela similaridade de caracteres morfológicos. Este representa o primeiro estudo que buscou uma hipótese de evolução para Didemnidae utilizando dados moleculares. Aqui as relações filogenéticas dentro de Didemnidae foram esclarecidas e a validade dos gêneros avaliada.

Para se realizar um estudo filogenético de um amplo grupo como Didemnidae e com as limitações observadas para o mesmo, é necessário um conhecimento refinado sobre sua morfologia, seja por meio da literatura ou através da análise direta, para que se possa obter diagnose segura, uma vez que, muitas espécies são diferenciadas por poucos caracteres morfológicos, favorecendo assim identificações errôneas.

Para uma diagnose e identificação segura das espécies é necessário uma combinação de muitos caracteres morfológicos que reúnam os aspectos externos (coloração, forma das colônias, projeções na superfície da túnica, presença de simbiontes e presença ou ausência de espículas) e internos da colônia (forma da abertura atrial, número de fileiras de fendas - três ou quatro, forma do espermiduto - reto ou espiralado e número de folículos testiculares). O levantamento de outros caracteres é necessário para se obter diagnoses mais completas, facilitando assim a identificação das espécies.

O conhecimento dos caracteres morfológicos dentro de Didemnidae é de suma importância para o entendimento do grupo e identificação de espécies, contudo as relações filogenéticas por meio da morfologia não puderam ser esclarecidas. Isto

ocorreu porque há clara dificuldade no estabelecimento das hipóteses de homologia primária, levando a um grande número de caracteres homoplásicos no resultado das reconstruções. Por sua vez, os dados moleculares se mostraram bastante eficientes na determinação dessas relações, além de auxiliar na identificação e detecção de espécies crípticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Belinky, F., Szitenberg, A., Goldfard, I., Feldstein, T., Wörheide, G., Ilan, M. & Huchon, D. 2012. ALG 11 - A new variable DNA marker for sponge phylogeny: Comparison of phylogenetic performances with the 18S rDNA and the COI gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, p. 702–713.

Berrill, NJ. 1950. The Tunicata. **The Ray Society**, London, p. 1–354.

Bouzon, JL., Vargas, SM., Oliveira Neto, JF., Stoco, PH. & Brandini, FP. 2014. Cryptic species and genetic structure in *Didemnum granulatum* Tokioka, 1954 (Tunicata: Ascidiacea) from the southern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 923–32.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772.

Eldredge, LG. 1966. A Taxonomic Review of Indo-Pacific Didemnid Ascidiaceans and Descriptions of Twenty-three Central Pacific Species. **Micronesica**, v. 2, n. 254, p. 161–261.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–9.

Futuyma, DJ. 2002. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto, FUNCEP-RP, 2.ed., p. 1–631.

Geller, J., Meyer, C. & Parker, M. 2013. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. **Molecular Ecology**, p. 1–11.

Gissi C., Pesole G., Mastrototaro F., Iannelli F., Guida V. & Griggio F. 2010. Hypervariability of ascidian mitochondrial gene order: exposing the myth of deuterostome organelle genome stability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, p. 211–215.

Goloboff, PA., Farris, JS. & Nixon, K. 2003. **TNT: tree analysis using new technology**.

Guidon S., Dufayard JF., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W. & Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, p. 307–321.

Hawkins CJ., Kott P., Parry DL. & Swinehart JH. 1983. Vanadium content and oxidation state related to ascidian phylogeny. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76B, p. 555–558.

- Hebert, PDN., Cywinska, A., Ball, SL. & deWaard, JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 270, n. 1512, p. 313-321.
- Hebert, PDN., Ratnasingham, S. & deWaard, JR. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 270, p. S96-9.
- Hess, J. 2009. New molecular markers to genetically differentiate populations of *Didemnum vexillum* (Kott, 2002) - an invasive ascidian species. **Aquatic Invasions**, v. 4, n. 2, p. 299-310.
- Hirose, E. 2001. Acid Containers and Cellular Networks in the Ascidian Tunic with Special Remarks on Ascidian Phylogeny. **Zoological Science**, v. 18, n. 5, p. 723-731.
- Hirose, E. 2015. Ascidian photosymbiosis: diversity of cyanobacterial transmission during embryogenesis. **Genesis (New York, N.Y. : 2000)**, v. 53, n. 1, p. 121-31.
- Hirose, M.; Yokobori, S.; Hirose, E. 2008. Potential speciation of morphotypes in the photosymbiotic ascidian *Didemnum molle* in the Ryukyu Archipelago, Japan. **Coral Reefs**, v. 28, n. 1, p. 119-126.
- Iannelli F., Griggio F., Pesole G. & Gissi C. 2007. The mitochondrial genome of *Phallusia mammillata* and *Phallusia fumigata* (Tunicata, Ascidiacea): high genome plasticity at intra-genus level. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 155.
- Katoh K. & Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, p. 772-780.
- Kott, P. 1962. The ascidians of Australia III. Aplousobranchiata Lahille: Didemnidae Giard. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 13, p. 265-334.
- Kott, P. 1969. Antarctic Ascidiacea. A monographic account of the known species based on specimens collected under U.S. government auspices. 1947-1963. **Antarctic Research Series**, p. 1-239.
- Kott, P. 2001. The Australian Ascidiacea part 4, Aplousobranchia (3), Didemnidae. **Memoirs of the Queensland Museum**, v. 47, n. 1, p. 1-410.
- Kott, P. 2002. A complex didemnid ascidian from Whangamata, New Zealand. **J. Mar. Biol Ass U.K.**, v. 82, p. 625-628.
- Lafargue F. 1974. Description d'un néotype de *Didemnum candidum* Savigny, 1816 espèce-type de Mer Rouge (ascidies composées). **Vie Milieu**, v. 24, p. 341-356.
- Lafargue F. 1975a. Révision taxonomique des Didemnidae des côtes de France (ascidies composées). Description des espèces de Banyuls-Sur-Mer. Genre *Lissoclinum*. Genre *Diplosoma*. **Vie Milieu**, v. 25, p. 289-309.

Lafargue F. 1975b. Révision taxonomique des Didemnidae des Côtes de France (ascidies Composées). Les espèces de Banyuls-Sur-Mer. Genre *Didemnum*, **Ann. Inst. océanogr.**, v. 51, p. 173–194.

Lafargue F. 1975c. Révision taxonomique des Didemnidae des côtes de France (ascidies composées). Description des espèces de Banyuls-Sur-Mer. Genre *Polysyncraton*. **Vie Milieu**, v.25, p.133-164.

Lafargue F. 1983. Évolution des ascidies Didemnidae I: cas des espèces françaises. **Vie Milieu**, v. 33, p. 1–15.

Lafargue, F. & Kniprath, E. 1978. Formation des spicules de Didemnidae (ascidies composées). I . L'apparition des spicules chez l'oozoïde après la métamorphose. **Marine Biology**, v. 45, p. 175–184.

Lafargue F. & Wahl M. 1987. The didemnid ascidian fauna of France. **Ann. Inst. océanogr.**, v. 63, p. 1–46.

Lambert, G. 2005. Ecology and natural history of the protochordates. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, n. 1, p. 34–50.

Lambert, G. 2009. Adventures of a sea squirt sleuth: unraveling the identity of *Didemnum vexillum*, a global ascidian invader. **Aquatic Invasions**, v. 4, n. 1, p. 5–28.

Lindquist N., Hay ME. & Fenical W. 1992. Defense of ascidians and their conspicuous larvae: Adult vs. larval chemical defenses. **Ecological Monographs**, v. 62, p. 547–568.

Lotufo, TMC. & Dias, GM. 2007. *Didemnum galacteum* , a new species of white didemnid (Chordata: Ascidiacea: Didemnidae) from Brazil. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 120, n. 2, p. 137–142.

Lowenstam, H. A. 1989. Spicular morphology and mineralogy pyuridae (ascidiacea). **Bulletin of Marine Science**, v. 45, n. 2, p. 243–252.

Maddison, WP. & Maddison, DR. 2011. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis**.

Marks, JA. Three sibling species of didemnid ascidians from northern Norway: *Didemnum albidum* (Verrill, 1871), *Didemnum polare* (Hartmeyer, 1903), and *Didemnum romssae* sp.nov. 1996. **Canadian Journal of Zoology**, v. 74, p. 357–379.

Matioli, SR. & Fernandes, FMC. 2012. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto, Holos Editora, 2.ed., p.1–250.

Millar, RH. 1971. The biology of ascidians. *Advances in Marine Biology*, p. 1 – 100.

Monniot, C. & Monniot, F. 1972. Clé Mondiale des genres d'Ascidies. **Archives de Zoologie Expérimentale & Générale**, v. 113, n. 3, p. 311–367.

Monniot, C. & Monniot, F. 1987. Les Ascidies de Polynésie française. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. Sér A, Zoo, n. 136, p. 1–143.

Monniot, F. 1984. Ascidies littorales de Guadeloupe VIII. Questions de systématique évolutive posées par les Didemnidae. **Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, Ser 4**, v. 4, p. 885–905.

Monniot, C., Monniot, F. & Laboute P. 1991. **Coral Reef Ascidiaceans of New Caledonia**. Paris, Orstom, p. 1–248.

Monniot, F. 1993. Ascidies de Nouvelle-Calédonie XIII. Le genre *Polysyncrator* (Didemnidae). **Bulletin Muséum National d'Histoire Naturelle**, v.15, p. 3–17.

Monniot F. 1995. Ascidies de Nouvelle-Calédonie. XV. Le genre *Didemnum*. **Bulletin Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. 16, p. 299–344.

Moreno, TR. & Rocha, RM. 2008. Phylogeny of the Aplousobranchia (Tunicata : Ascidiacea). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 2, p. 269–298.

Nagaya, K. & Hirose, E. 2013. Pattern of stigma numbers as a taxonomic character in some didemnid ascidians (Aplousobranchia: Didemnidae). **Zootaxa**, v. 3608, n. 1, p. 87–93.

Oliveira FAS., Colares GB., Hissa DC., Angelim AL., Melo VMM. & Lotufo TMC. 2013. Microbial epibionts of the colonial ascidians *Didemnum galacteum* and *Cystodytes* sp. **Symbiosis**, v. 59, p. 57-68.

Pérez-Portela, R. & Turon, X. 2008. Phylogenetic relationships of the Clavelinidae and Pycnoclavellidae (Ascidiacea) inferred from mtDNA data. **Invertebrate Biology**, v.127, n.1, p.108–120.

Pérez-Portela, R., Bishop, JDD., Davis, AR. & Turon, X. 2009. Phylogeny of the families Pyuridae and Styelidae (Stolidobranchiata, Ascidiacea) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 50, n. 3, p. 560–570.

Pérez-Portela, R., Arranz, V., Rius, M. & Turon, X. 2013. Cryptic speciation or global spread? The case of a cosmopolitan marine invertebrate with limited dispersal capabilities. **Scientific Reports**, p. 1–10.

Rambaut A. 2012. FigTree v 1.4.0. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Ridley, M. 2006. **Evolução**. Porto Alegre, Artmed, 3.ed., p. 1–752.

Rocha, RM., Kremer, LP., Baptista, MS. & Metri, R. 2009. Bivalve cultures provide habitat for exotic tunicates in southern Brazil. **Aquatic Invasions**, v.4, p. 195 – 205.

Rocha, RM., Dias, GM. & Lotufo, TMC. 2011. Checklist das ascídias (Tunicata, Ascidiacea) do estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, p. 1-11.

- Rodrigues, SA., Rocha, RM. & Lotufo, TMC. 1998. **Guia ilustrado para identificação das ascídias do Estado de São Paulo**. São Paulo, IBUSP/FAPESP, p. 1–190.
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA. & Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Syst.Biol.**, v. 61, p. 539–542.
- Rubinstein ND., Feldstein T., Shenkar N., Botero-Castro F., Griggio F., Mastrototaro F., Delsuc F., Douzery EJP., Gissi C. & Huchon D. 2013. Deep sequencing of mixed total DNA without barcodes allows efficient assembly of highly plastic ascidian mitochondrial genomes. **Genome Biol. Evol.**, v. 5, p. 1185–1199.
- Shenkar, N. & Swalla, BJ. 2011. Global Diversity of Ascidiacea. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1–12.
- Stach, T. & Turbeville, JM. 2002. Phylogeny of Tunicata inferred from molecular and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 408–428.
- Stefaniak L., Lambert G., Gittenberger A., Zhang H., Lin S. & Whitlatch RB. 2009. Genetic conspecificity of the worldwide populations of *Didemnum vexillum* Kott, 2002. **Aquatic Invasions**, v. 4, p. 29–44.
- Tsagkogeorga, G., Turon, X., Hopcroft, RR., Tilak, MK, Feldstein, T., SHENKAR, N., Loya, Y., Huchon, D., Douzery, EJP. & Delsuc, F. 2009. An updated 18S rRNA phylogeny of tunicates based on mixture and secondary structure models. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 187.
- Turon, X. & López-Legentil, S. 2004. Ascidian molecular phylogeny inferred from mtDNA data with emphasis on the Aplousobranchiata. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, p. 309–320.
- Van Name, WG. 1921. Ascidians of the West Indian region and Southeastern United states. **Bulletin American Museum of Natural History**, v. 44, p. 283 – 494.
- Van Name, WG. 1945. The North and South American ascidians. **Bulletin American Museum of Natural History**, v. 84, p.1–476.
- Varol, O. & Houghton, SD. 1996. A review and classification of fossil didemnid ascidian spicules. **Journal of Micropalaeontology**, v. 15, p. 135–149.
- Voigt, O., Erpenbeck, D. & Wörheide, G. 2008. Molecular evolution of rDNA in early diverging Metazoa: First comparative analysis and phylogenetic application of complete SSU rRNA secondary structures in Porifera. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 69.

Wada, H. 1998. Evolutionary History of free-swimming and sessile lifestyles in urochordates as deduced from 18S rDNA molecular phylogeny. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 9, p. 1189–1194.

Wada, H., Makabe, KW., Nakauchi, M. & Satoh, N. 1992. Phylogenetic relationships between solitary and colonial ascidians, as inferred from the sequence of the central region of their respective 18s rDNAs. **Biological Bulletin**, v. 183, p. 448–455.

Walsh PS., Metzger DA. & Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques**, v. 10, p. 506–513.

WoRMS. 2015. World Register of Marine Species, *Coelocormus*, em <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=249524>.

Wiley, EO. & Lieberman, BS. 2011 **Phylogenetics: the theory of phylogenetic systematics**. Wiley-Blackwell, 2. ed., p. 1–406.

Yokobori, S., Kurabayashi, A., Neilan, BA., Maruyama, T. & Hirose, E. 2006. Multiple origins of the ascidian-*Prochloron* symbiosis: Molecular phylogeny of photosymbiotic and non-symbiotic colonial ascidians inferred from 18S rDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 1, p. 8–19.

APÊNDICE A – Matriz de caracteres e estados para as espécies do gênero *Didemnum* (Ascidiacea: Didemnidae).

	Caráter																													
Táxons terminais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Grupo externo																														
<i>Polysyncraton lacazei</i>	0	0	?	?	?	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Polysyncraton poro</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	?	?	?	?	?	?
Grupo interno																														
<i>Didemnum ahu</i>	0	1	?	1	0	0	1	1	1	0	1	?	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1/2	2	2	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum albidum</i>	0	?	?	0	?	0	1	2	?	1	1	1	?	0	0	1	0	0	0	-	0	1	1/2	0	0	0	0	1	1	
<i>Didemnum apuroto</i>	2	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	?	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	2	2	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum candidum</i>	0/2	0	?	0	?	0	1	1	0/1	1	0	1	0	0	1	0/1	1	0	1	1	0	1/2	2	2	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum cineraceum</i>	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	1	0	1/2	2	0	0	1	0	1	0	
<i>Didemnum cuculliferum</i>	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1/2	2	1	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum duplicatum</i>	2	0	1	0	0	0	1	0	1	2	0	0	1	1	1	0/1	1	1	2	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	

APÊNDICE A – CONTINUAÇÃO

Táxons terminais	Caráter																													
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<i>Didemnum fulgens</i>	0	0	?	?	?	0	1	1	?	1	0	1	?	0	1	?	1	1	1	1	0	2	2	2	?	1/2	1	1	1	
<i>Didemnum galacteum</i>	0	0	0	0	0	0	0/1	0	1	2	0	0/1	0	1	1	0/1	1	1	2	1	0	1	1	1	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum granulatum</i>	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1/2	1	0	1	2	2	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum incanum</i>	0/1	?	0	?	?	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2	1	0	2	2	2	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum ligulum</i>	0	1	0	0	0	0	0/1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	0	0	0	1	0	
<i>Didemnum membranaceum</i>	1	1	0	1	1	0	1	1	0/1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	2	1	0	1	2	2	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum multispirale</i>	0	0	1	?	1	1	1	1	0	1	0	0	?	0	0	?	?	?	1	1	1	2	2	1	1	0	0	1	1	
<i>Didemnum mutabile</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0/1	1	0	1	1	0	0	1	2	2	0	1	0	1	1	
<i>Didemnum nekozita</i>	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	2	2	0	1/2	0	1	1	
<i>Didemnum parau</i>	0	0	?	1	0	0	0	0	0	0	1	?	?	1	1	0	0	1	1	1	0	1	2	2	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum patulum</i>	2	?	1	?	?	0	1	1	0/1	1	?	1	?	1	1	0	1	1	1	1	0	1	2	?	?	?	?	?	?	

APÊNDICE A – CONTINUAÇÃO

Táxons terminais	Caráter																													
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<i>Didemnum perlucidum</i>	0	0	0	0	?	0	1	0	0/1	1	0	1	?	0	1	1	1	1	1	2	1	0	1	2	2	0	2	0	1	1
<i>Didemnum psammatodes</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	2	2	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum sordidum</i>	1	?	0	1	0	1	1	1	0/1	1	1	1	?	0	1	2	0	1	1	1	1	1	2	2	0	2	0	1	1	
<i>Didemnum vexillum</i>	0/2	?	0	0	?	0	1	1	0/1	1	1	0/1	1	0	1	1	?	?	1	1	0	2	2	1	0	1	0	1	1	

APÊNDICE B – SUMÁRIO DESCRITIVO DAS ESPÉCIES UTILIZADAS NAS ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Lista taxonômica das espécies analisadas

Subfilo Tunicata Lamarck, 1816

Classe Ascidiacea Blainville, 1825

Ordem Aplousobranchia Lahille, 1886

Família Didemnidae Giard, 1872

Gênero *Didemnum* Savigny, 1816

Didemnum ahu Monniot & Monniot, 1987

Didemnum apuroto Monniot & Monniot, 1987

Didemnum cineraceum (Sluiter, 1898)

Didemnum cuculliferum (Sluiter, 1909)

Didemnum duplicatum Monniot F., 1983

Didemnum fragile Sluiter, 1909

Didemnum galacteum Lotufo & Dias, 2007

Didemnum granulatum Tokioka, 1954

Didemnum ligulum Monniot F., 1983

Didemnum membranaceum Sluiter, 1909

Didemnum mutabile Monniot & Monniot, 1987

Didemnum nekozita Tokioka, 1953

Didemnum parau Monniot & Monniot, 1987

Didemnum perlucidum Monniot F., 1983

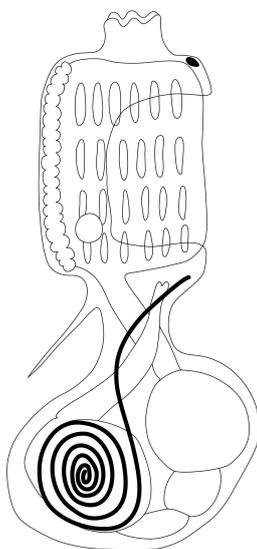
Didemnum psammatodes (Sluiter, 1895)

Didemnum sordidum Kott, 2001

Gênero *Didemnum* Savigny, 1816

Espécie tipo: *Didemnum candidum* Savigny, 1816

Diagnose: Zooides relativamente pequenos (normalmente não ultrapassam 1,0 mm de comprimento total), espículas calcárias presentes. Faringe com quatro fileiras de fendas, abertura atrial expondo a faringe. Presença de lingueta atrial em algumas espécies. Apêndice fixador presente. Testículo único ou com dois folículos e espermiduto em espiral. Larva com três fileiras de fendas no oozooide (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991; KOTT, 2001).



Desenho esquemático representando o gênero *Didemnum*.

Didemnum ahu Monniot & Monniot, 1987

(Pranchas 1A e 4E)

Material examinado: FLMNH UF 574, UF 575 e UF 584, West of Cook's Bay Pass, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4757°; -149,838°, 12-15 m, col. Tito Lotufo e Gustav Paulay, 29.10.2009.

Colônias pequenas, de coloração creme ou branca, e espessura aproximada de 1,0 mm. Túnica macia, camada de células *bladder* presente, densa quantidade de espículas distribuídas por toda a túnica. Espículas estreladas, diâmetro de até 40 µm, com cerca de

9-10 raios cônicos na secção transversal com pontas irregulares. Zooide menor que 1,0 mm de comprimento total. Tórax bastante contraído, não permitindo a completa visualização das fendas. Sifão oral curto, com seis lobos arredondados. Abertura atrial expondo uma pequena porção da faringe. Órgão torácico lateral circular, situado próximo a abertura atrial, na altura da quarta fileira de fendas. Apêndice fixador curto, inserido no pedúnculo esofágico retal. Gônadas não desenvolvidas. Espécimes sem larva.

Comentários: Devido à ausência de gônadas e larvas a identificação desta espécie foi baseada principalmente nos aspectos externos da colônia (MONNIOT F., 2009), forma e diâmetro das espículas, e na morfologia do tórax (MONNIOT; MONNIOT, 1987).

Distribuição: Polinésia Francesa (Moorea e Tahiti) (MONNIOT; MONNIOT, 1987), ?Brasil (ROCHA; MONNIOT F., 1995), Palau (MONNIOT; MONNIOT, 2008), Indonésia (MONNIOT F., 2009) e Nova Caledônia (MONNIOT F., 1995).

***Didemnum apuroto* Monniot & Monniot, 1987**

(Pranchas 1B e 4F)

Material examinado: FLMNH UF 731, West of Motu Hahi in Lagoon, Moorea, Polinésia Francesa, -17,54958°, -149,77907°, 10-30 m, col. Tito Lotufo, Gustav Paulay e Seabird McKeon, 06.11.2009. FLMNH UF 813, UF 814 e UF 815, Lagoon pinnacle South of Afareaitu, Moorea, Polinésia Francesa, -17,56398°, -149,7892°, 5-35 m, col. Sarah McPherson e Tito Lotufo. 12.11.2009.

Colônias incrustantes, com aproximadamente 3,0 cm de extensão e 1,0 mm de espessura, crescendo sobre rochas. Superfície da colônia com reentrâncias. Túnica de coloração laranja em vida; após fixação a mesma torna-se branca. Espículas abundantes por toda a colônia, ausência de células *bladder* e simbiontes. Espículas estreladas, diâmetro não ultrapassando 40 µm, com nove raios cônicos de pontas truncadas na secção transversal. Zooides menores que 1,0 mm, com abdome levemente maior que o tórax; tórax em posição linear ao abdome. Sifão oral curto e abertura atrial expondo uma pequena parte da faringe. Lingueta atrial ausente. Órgão torácico lateral de forma

circular e saliente, localizado próximo ao endóstilo, na altura da terceira fileira de fendas. Apêndice fixador inserido no final do tórax, não ultrapassando o abdome. Alça intestinal fechada. Testículo único e saliente. Espermiduto em espiral, com sete voltas em sentido anti-horário. Larvas não encontradas.

Comentários: Apesar da ausência de larvas nos exemplares analisados, as características do zooide e espículas são idênticas aos caracteres previamente relatados para a espécie (MONNIOT; MONNIOT, 1987) confirmando assim a identidade da mesma. Exceção quanto a coloração, branca para a espécie tipo e laranja para os exemplares do presente estudo.

Distribuição: Polinésia Francesa (Tahiti) (MONNIOT; MONNIOT, 1987), Micronésia (MONNIOT; MONNIOT, 1996) e Nova Caledônia (MONNIOT F., 1995).

Novo registro: Polinésia Francesa (Moorea).

***Didemnum cineraceum* (Sluiter, 1898)**

(Prancha 3B)

Sinonímia: *Leptoclinum cineraceum* Sluiter, 1898

Material examinado: ColBIO TL 839 (ASC 105-Procad); Iate Clube de Ilha Bela, São Sebastião, São Paulo, Brasil, 23°46'43''S, 45°21'30''W, col. Amarílis Brandão, 02.02.2012.

Colônia de túnica transparente permitindo a visualização dos zoides e pelotas fecais. Túnica rígida, com espessura de aproximadamente 2,0 mm. Espículas raras na superfície da colônia, presente em pouca quantidade apenas na camada média, principalmente ao redor do zooide. Os zoides tem cerca de 1,5 mm de comprimento total. Tórax levemente maior que o abdome, posicionado perpendicularmente em relação a este. Sifão oral médio com seis lobos arredondados, abertura atrial expondo uma pequena porção da faringe. Faringe com nove fendas na primeira fileira. Lingueta atrial ausente. Apêndice fixador longo, ultrapassando o abdome e inserido na região do pedúnculo esofágico retal. Presença de vasos estolônicos na região esofágica. Testículo único, recoberto por espermiduto em espiral, com oito voltas em sentido anti-horário.

Larva com comprimento de 1,0 mm e cauda recobrimdo 3/4 do tronco. Larva gemípara, com três papilas adesivas e seis pares de ampolas.

Comentários: As características do zooide e larva são como relatados por Monniot F, (1983) para o material de Guadalupe. *Didemnum cineraceum* é semelhante a *Didemnum vanderhorsti* em muitos caracteres, diferindo principalmente em relação ao tamanho do zooide (1,0 mm) e caracteres da larva (quatro pares de ampolas ectodérmicas) (GOODBODY, 2003; RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998).

Distribuição: Belize (GOODBODY, 2000), Jamaica (GOODBODY, 2003), Guadalupe (MONNIOT F., 1983), Panamá (NEVES, 2015), Brasil (RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998), Serra Leoa (MONNIOT; MONNIOT, 1994) e Nova Caledônia (MONNIOT F., 1995).

Didemnum cuculliferum (Sluiter, 1909)

(Prancha 1C)

Material examinado: FLMNH UF 676, East of Cook's Bay, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4739°, -149,819°, 8-11 m, col. Gustav Paulay, Tito Lotufo e Sarah McPherson, 01/11/2009. FLMNH UF 724, Opunahu Pinnacle, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4945°, -149,8624°, 14-20 m, col. Sarah McPherson e Seabird McKeon, 04.11.2009. FLMNH UF 745, Temae, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4982°, -149,755°, 0,5-1,5 m, Arthur Anker, Tito Lotufo e Nicole Gravier-Bonnet, 07.11.2009.

Em vida as colônias apresentam coloração rosa, porém após a fixação a mesma é perdida e tornam-se brancas. Colônias de formato oval com aproximadamente 2,0 cm de diâmetro e 1,0 mm de espessura. Papilas distribuídas de forma irregular sobre toda a superfície da colônia. Camada de células *bladder* presente. Espículas abundantes por toda a colônia. Espículas estreladas, medindo cerca de 30 µm de diâmetro, com 6-8 raios longos de pontas arredondadas na secção transversal. Zooides com cerca de 1,0 mm de comprimento. Tórax maior que abdome. Sifão oral curto com seis lobos arredondados e abertura atrial expondo uma porção média da faringe. Faringe com seis fendas na primeira e segunda fileiras de fendas. Lingueta atrial ausente. Órgão torácico lateral de forma circular e sésil, localizado próximo ao endóstilo, na altura da quarta fileira de fendas. Apêndice fixador médio (não ultrapassa o abdome) inserido na metade

da região do pedúnculo esofágico retal. Testículo único, circundado por oito voltas no sentido anti-horário do espermiduto. Espécimes sem larvas.

Comentários: A coloração, a forma oval da colônia, o formato das espículas e as papilas na superfície da túnica são características marcantes que permitiram a identificação dos exemplares mesmo sem a presença da larva (MONNIOT; MONNIOT, 1987).

Distribuição: Fiji (KOTT, 1981), Polinésia Francesa (MONNIOT; MONNIOT, 1987), Ilhas Mariana (NISHIKAWA, 1994), Palau (MONNIOT; MONNIOT, 2001) e Nova Caledônia (MONNIOT F., 1995).

***Didemnum duplicatum* Monniot F., 1983**

(Prancha 5A)

Material examinado: ColBIO TL15 e TL16, Praia do Náutico, Fortaleza, Ceará, Brasil, 03°43'S, 038° 29'W, col. Andréa Oliveira, Raquel Almeida e Tarciana Fortaleza, 18.02.2011. ColBIO TL811, Ilhas Rasas, Guarapari, Espírito Santo, Brasil, 20°39'04''S, 40°30'24'', col. Tito Lotufo, 29.03.2012.

Colônias incrustantes com aproximadamente 6,0 cm de comprimento e 3,0 mm de espessura. Coloração branca em vida. Túnica de superfície macia, com leves reentrâncias. Espículas em grande densidade por toda a colônia. Espículas estreladas, com oito raios rombudos de pontas truncadas na secção transversal. Espículas de tamanho variado chegando a 38 µm de diâmetro no máximo. Zooides de coloração esbranquiçada com comprimento total de 1,4 mm. Sifão oral com seis lobos arredondados e abertura atrial expondo uma pequena parte da faringe. Faringe com oito fendas na primeira fileira. Lingueta atrial ausente. Apêndice fixador longo, com aproximadamente 0,9 mm de comprimento, ultrapassando o abdome e inserido na metade do pedúnculo esofágico retal. Testículo com dois folículos testiculares. Espermiduto em espiral, com oito ou nove voltas no sentido anti-horário. Larva com comprimento total de 0,9 mm, três papilas adesivas, oito pares de ampolas ectodérmicas e cauda recobrimdo 3/4 do tronco da larva.

Comentários: A espécie aqui relatada está de acordo com a descrição de Monniot F, (1983) para exemplares de Guadalupe. O número de ampolas na larva foram decisivos para a identificação da espécie. *Didemnum galacteum* Lotufo & Dias, 2007, se assemelha a *D. duplicatum* na forma e diâmetro das espículas, faringe e gônadas com dois folículos testiculares (LOTUFO; DIAS, 2007). A principal diferença é notada no número de ampolas na larva, quatro em *D. galacteum* e oito em *D. duplicatum*. A ausência de larvas torna difícil a distinção destas espécies.

Distribuição: Texas (LAMBERT *et al.*, 2005), Belize (GOODBODY, 2000), Jamaica (GOODBODY, 2003), Guadalupe (MONNIOT F., 1983), Bonaire e Curaçao (GOODBODY, 1984) e Venezuela (ROCHA *et al.*, 2010).

Novo registro: Brasil (Ceará e Espírito Santo).

***Didemnum fragile* Sluiter, 1909**

(Pranchas 1D e 5B)

Sinonímia: *Didemnum fragilis* Sluiter, 1909, página 56

Didemnum proliferum Kott, 1981, página 171

Material examinado: FLMNH UF 693, East of Cook's Bay, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4878°, -149,819°, 5-20 m, col. Sarah McPherson, Seabird McKeon, Allen Collins e Tito Lotufo, 02.11.2009. FLMNH UF 746, Temae, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4982°, -149,755°, 0,5-1,5 m, Arthur Anker Tito Lotufo e Nicole Gravier-Bonnet, 07.11.2009. FLMNH UF839, East of Cook's Bay, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4878°, -149,819°, 5-20 m, col. Sarah McPherson, Seabird McKeon, Allen Collins e Tito Lotufo, 02.11.2009.

Colônias de coloração salmão apresentando crescimento horizontal, margem com borda bem espessa, diferente do observado em outras espécies de *Didemnum*. Poucas cloacas por colônias (cerca de duas), espículas em alta densidade na superfície, matriz e base da colônia. Espículas globulares, com diâmetro máximo de 40 µm, numerosos raios, forma cilíndrica na secção transversal. Zooide pequeno, com cerca de 1,0 mm de comprimento total. Sifão oral alongado, em forma de tubo, com seis lobos levemente pontiagudos. Faringe com oito fendas na primeira fileira. Abertura atrial expondo uma pequena

porção da faringe. Apêndice fixador curto, inserido na base do tórax. Alça intestinal fechada. Testículo formado por um único folículo, circundado por seis voltas do espermiduto em espiral. Espécimes sem larvas.

Comentário: A margem da colônia, forma e diâmetro das espículas, assim como o número de voltas no espermiduto são como relatados por Kott (2001), contudo Monniot & Monniot (1987), registraram espécimes de coloração branca e espermiduto com oito a dez voltas para Polinésia Francesa.

Distribuição: Fiji (KOTT, 1981), Polinésia Francesa (MONNIOT; MONNIOT, 1987), Palau (MONNIOT; MONNIOT, 1996) e Austrália (KOTT, 2001).

***Didemnum galacteum* Lotufo & Dias, 2007**

(Prancha 3C)

Material examinado: ColBIO TL 280, Panaquatira, Maranhão, Brasil, 02°29'27''S, 44°02'15''W, col. Sandra Vieira e Ronaldo Ruy, 30.08.2011. ColBIO TL 332, Araçagy, Maranhão, Brasil, col. Sandra Vieira e Ronaldo Ruy, 01.09.2011.

Colônias incrustantes de coloração branca em vida. Crescimento da colônia horizontal, alcançando 10,0 cm de comprimento e 3,0 mm de espessura. Túnica firme e macia. Células *bladder* presentes. Espículas distribuídas igualmente por toda a túnica. Espículas estreladas e globulares de tamanho variado, cerca de 15 µm de diâmetro, com raios cilíndricos e pontas truncadas na secção transversal. Cavidade cloacal na altura do tórax. Zooides de coloração rosada, medindo cerca de 1,0 mm de comprimento total, tórax e abdome de mesmo tamanho. Tórax posicionado linearmente em relação ao abdome. Não foi possível contar o número de fendas por fileira. Sifão oral com seis lobos arredondados e atrial expondo uma pequena parte da faringe. Órgão torácico lateral alongado, levemente saliente, situado entre a terceira e quarta fileira de fendas, próximo ao endóstilo. Apêndice fixador longo (ultrapassa o abdome), inserido na porção do pedúnculo esofágico retal. Lingueta atrial ausente. Testículo com dois folículos. Espermiduto em espiral, com sete voltas. Larva simples, medindo 0,3 mm, três papilas, quatro pares de ampolas e cauda recobrimdo 3/4 do tronco da larva.

Comentários: Esta espécie é bastante comum na costa brasileira (LOTUFO; DIAS, 2007). As características são as mesmas relatadas por Lotufo & Dias (2007), diferença apenas quanto ao tamanho do zooide (1,3 mm) e larva (0,6-0,8 mm) para o espécime tipo.

Distribuição: Brasil (LOTUFO; DIAS, 2007).

***Didemnum granulatum* Tokioka, 1954**

(Pranchas 1E, 1F, 3D, 5C e 5D)

Sinonímia: *Didemnum (Didemnum) moseleyi f. granulatum* Tokioka, 1954, página 244

Didemnum moseleyi Eldredge, 1966, página 210

Didemnum pele Eldredge, 1966, página 197

Material examinado: FLMNH UF 1408 e UF 1409, ARMS 5 site, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4764°, -149,832°, 13 m, col. Biocode IZ/ARMS team, 01.02.2012. FLMNH UF 771, East side of Opunohu Bay, Moorea, Polinésia Francesa, -17,5097°, -149,851°, 0-2 m, col. Tito Lotufo, Nicole Gravier-Bonnet, Arthur Anker e Jon Norenburg, 08.11.2009. FLMNH UF 573, West of Cook's Bay Pass, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4757°, -149,838°, 12-15 m, col. Tito Lotufo e Gustav Paulay, 29.10.2009. FLMNH UF 577, Gump Cape, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4893°, -149,826°, 1,0-1,5 m, col. Arthur Anker, 24.10.2009.

Colônia de coloração laranja em vida, com maior intensidade de cor ao redor das aberturas das cavidades cloacais. Após fixação, colônia branca com papilas arredondadas ou triangulares na superfície da túnica. Espículas estreladas, com diâmetro de 40 µm e 6-8 raios cônicos na secção transversal. Zooides de coloração branca de tamanho pequeno com comprimento total em torno de 0,75 mm. Tórax formam um ângulo perpendicular em relação ao abdome. Sifão oral com seis lobos pontiagudos; atrial amplo, expondo mais de 50% da faringe. Faringe com 6, 6, 5 e 4 fendas em cada fileira, respectivamente. Órgão torácico lateral na terceira fileira de fendas, situado próximo ao endóstilo. Cavidade cloacal na altura do tórax. Apêndice fixador médio (não ultrapassa o abdome), inserido na região do pedúnculo esofágico retal. Folículo

testicular único. Espermiduto em espiral, com seis voltas. Larva simples com comprimento do tronco de 0,4 mm, três papilas adesivas e quatro pares de ampolas ectodérmicas. Cauda recobrando 3/4 do tronco da larva.

Comentários: Papilas na superfície da colônia, espículas, zooides e larvas dessa espécie lembram *Didemnum incanum* e *Didemnum membranaceum*. A principal diferença apresentada para *D. incanum* é o número de nove voltas no espermiduto, enquanto para *D. membranaceum* a principal diferença está relacionada à presença de espículas gigantes com cerca de 100 µm de diâmetro e 4-6 raios (KOTT, 2001) - apesar de espículas com esse mesmo número de raios terem sido observadas para os espécimes de *D. granulatum* do presente estudo. A confusão quanto à identificação pode ser observada em virtude da sutileza na diferenciação dos caracteres morfológicos e devido à ampla variação de cor em vida, tais como rosa, laranja, vermelha e bege (KOTT, 2001).

Distribuição: Polinésia Francesa (MONNIOT; MONNIOT, 1987), Brasil (MONNIOT F., 1995), Japão (TOKIOKA, 1954), Palau (TOKIOKA, 1967), Austrália (KOTT, 2001), Nova Caledônia (MONNIOT F., 1995) e Fiji (KOTT, 1981).

***Didemnum ligulum* Monniot F., 1983**

(Pranchas 2A, 2B, 3E, 5E e 5F)

Material examinado: FLMNH UF 568, West of Cook's Bay, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4757°, -149,838°, 12-15 m, col. Gustav Paulay e Tito Lotufo, 29.10.2009. FLMNH UF 578, West of Cook's Bay, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4757°, -149,838°, 12-15 m, col. Gustav Paulay e Tito Lotufo, 29.10.2009. FLMNH UF 589, UF 591 e UF 600, Temae, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4784°, -149,764°, 18-23 m, col. Gustav Paulay, Seabird McKeon, Stephanie Bush e Steve Haddock, 29.10.2009. FLMNH UF 613, North of Haapiti Pass, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4886°, -149,826°, 15-21 m, col. Gustav Paulay e Tito Lotufo, 30.10.2009. FLMNH UF 694, Off NW Motus, Moorea, Polinésia Francesa, -17,484°, -149,916°, 19-20 m, col. Gustav Paulay, Seabird McKeon e Tito Lotufo, 03.11.2009. FLMNH UF 1387, ARMS 4 site, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4764°, -149,832°, 13 m, col. Biocode team, 31.01.2012.

Colônias de coloração laranja, aspecto da superfície da colônia como descrito por Monniot & Monniot, 1987. Crescimento da colônia horizontal, alcançando 3,0 cm de comprimento e espessura menor que 1,0 mm. Superfície da colônia lisa, com uma fina camada de células *bladder*. Simbiontes ausentes. Abertura da cavidade cloacal estrelada, com projeções na borda. Zooides de coloração castanha, com comprimento total de cerca de 1,0 mm. Sifão oral com seis lobos pontiagudos e sifão atrial expondo uma ampla porção da faringe. Lingueta atrial presente, pequena, fina e bifurcada. Órgão torácico lateral entre a segunda e terceira fileira de fendas, de formato circular, saliente, situado próximo ao endóstilo. Apêndice fixador inserido no fim do tórax, não ultrapassa o abdome. Testículo único, recoberto por espermiduto em espiral, com sete voltas em sentido anti-horário. Larva com comprimento de 0,5 mm e cauda recobrando 3/4 do tronco. Larva gemípara, com três papilas adesivas e 10 pares de ampolas.

Comentários: Monniot & Monniot (1987) apresentaram dois tipos de colônias para *Didemnum ligulum* que diferiram apenas quanto à coloração (rosa e laranja), sendo a morfologia dos zooides e larvas idêntica, constituindo dessa forma a mesma espécie. Entretanto, para Kott (2001) as espécies da Polinésia Francesa não pertencem a *D. ligulum* e consiste em uma outra espécie, separada tanto pela coloração da colônia, quanto pela forma das espículas. Dessa forma, a autora classificou a espécie de coloração laranja oriunda da Polinésia Francesa como *D. arancium*. Os espécimes aqui analisados apresentam características morfológicas que se assemelham a *D. arancium*, com exceção da forma das espículas, que são idênticas às previamente relatadas para a colônia rosa da Polinésia Francesa (MONNIOT; MONNIOT, 1987) e para os espécimes de Guadalupe (MONNIOT F., 1983). Diante disso a forma das espículas foram decisivas para identificação e a classificação da espécie como *D. ligulum*.

Distribuição: Guadalupe (MONNIOT F., 1983) e Polinésia Francesa (MONNIOT; MONNIOT, 1987).

***Didemnum membranaceum* Sluiter, 1909**

(Pranchas 2C e 6A)

Sinonímia: *Didemnum fraternum* Sluiter, 1909, página 60

Didemnum turritum Sluiter, 1909

Diplosomoides membranaceum Sluiter, 1909

Didemnum tonga Kott & Goodbody, 1982, página 520

Didemnum moseleyi Monniot & Monniot, 1996, página 157

Material examinado: FLMNH UF 665, East of Cook's Bay, Polinésia Francesa, Moorea, -17,4739°, -149,819°, 8-11 m, col. Sarah McPherson, Gustav Paulay e Tito Lotufo, 01.11.2009. FLMNH UF 526, West of Cook's Bay, Polinésia Francesa, Moorea, -17,4757°, -149,838°, 12-15 m, col. Sarah McPherson, Katie Hendrickson, Gustav Paulay e Tito Lotufo, 29.10.2009.

Colônia de coloração rosa em vida, após fixação torna-se branca. Crescimento horizontal, com comprimento de 2,0 cm e espessura com cerca de 1,0 mm. Pequenas papilas distribuídas uniforme na superfície da colônia. Células *bladder* e simbioses ausentes. Espículas distribuídas igualmente por toda a túnica. Espículas com cerca de 35 µm diâmetro, com 6-8 raios de pontas cônicas na secção transversal e acima de 50 µm, com quatro raios. Cavidade cloacal na altura do tórax. Zooides esbranquiçado, medindo de 1,0 mm de comprimento total. Sifão oral curto, com seis lobos levemente pontiagudos. Sifão atrial amplo expondo uma grande parte da faringe. Faringe com 6, 6, 5 e 4 fendas em cada fileira, respectivamente. Órgão torácico lateral alongado e situado próximo ao endóstilo. Apêndice fixador longo (ultrapassa o abdome), inserido no pedúnculo esofágico retal. Testículo único. Espermiduto em espiral, com 6-7 voltas. Larvas não foram observadas.

Comentários: A morfologia dos zooides do espécime analisado é comum a muitas outras espécies de *Didemnum*. Dessa forma, a identificação do espécime foi realizada principalmente pela coloração da colônia (KOTT, 2005) e forma tetraédrica das espículas, apesar de que em *D. membranaceum* essas espículas apresentarem maior tamanho (0,1 mm) (KOTT, 2001).

Distribuição: Austrália (KOTT, 2001) e Ilhas Salomão (KOTT, 2005).

Novo registro: Polinésia Francesa (Moorea).

***Didemnum mutabile* Monniot & Monniot, 1987**

(Pranchas 2D, 3F e 6B)

Material examinado: FLMNH UF 689, UF 691 e UF 692, East side of Cook's Bay, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4878°, -149,8187°, 5-20 m, col. Sarah McPherson, Seabird McKeon, Allen Collins e Tito Lotufo, 02.11.2009.

Colônia de coloração amarela em vida, após fixação torna-se bege. Crescimento da colônia horizontal e irregular, alcançando cerca de 3,0 cm de comprimento e 0,7 mm de espessura. Túnica desprovida de células *bladder* e simbiontes. Espículas distribuídas em todas as camadas da túnica. Espículas estreladas, diâmetro de 40 µm, com cerca de 12-14 raios cônicos. Zooides de coloração marrom, medindo menos de 1,0 mm de comprimento total. Número de fendas por faringe não identificado. Lingueta atrial bifurcada, perceptível em apenas alguns zooides. Sifão oral amplo e com seis lobos pontiagudos. Abertura atrial expõe uma pequena parte da faringe. Órgão torácico lateral circular, saliente e localizado próximo à abertura atrial. Apêndice fixador curto e inserido no fim do tórax. Testículo único. Espermiduto em espiral, com sete voltas. Larva simples, cauda recobrendo 3/4 do tronco. Larva medindo 0,4 mm, três papilas adesivas e cinco pares de ampolas.

Comentários: A morfologia do espécime analisado se assemelha em quase todos os caracteres à descrição previamente relatada por Monniot & Monniot (1987), em que apenas a presença da lingueta atrial não foi mencionada. Kott (2001), analisando espécimes da Austrália, registrou a presença de uma lingueta atrial bifurcada em alguns zooides, e o mesmo foi observado para os espécimes analisados no presente estudo.

Distribuição: Polinésia Francesa (Moorea, Tahiti) (MONNIOT; MONNIOT, 1987) e Austrália (KOTT, 2001).

***Didemnum nekozita* Tokioka, 1953**

(Planchas 2E, 4A e 6C)

Sinonímia: *Didemnum anoi* Monniot & Monniot, 1987, páginas 25, 26 e 27

Não *Didemnum cuculliferum* (Kott, 1981; 2001), ver Kott (2004), páginas 754-755.

Material examinado: FLMNH UF 570, UF 571 e UF 572, West of Cook's Pass, Moorea, Polinésia Francesa -17,4757°, -149,838°, 12-15 m, col. Tito Lotufo e Gustav Paulay, 29.10.2009. FLMNH UF 585, UF 594 e UF 595, Temae, Moorea, Polinésia

Francesa, -17,4784°, -149,764°, 18-23 m, col. Gustav Paulay, Seabird McKeon, Stephanie Bush e Steve Haddock, 29.10.2009. **FLMNH** UF 619, North of Haapiti Pass, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4886°, -149,826°, 15-21 m, col. Tito Lotufo e Gustav Paulay, 30.10.2009. **FLMNH** UF725, East of Cook's Pass Moorea, Polinésia Francesa, -17,4725°, -149,794°, 10-13 m, col. Sarah McPherson, Seabird McKeon e Gustav Paulay, 05.11.2009. **FLMNH** UF 779; Off NW Motus, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4856°, -149,919°, 17-35 m, col. Sarah McPherson e Tito Lotufo, 10.11.2009. **FLMNH** UF 1402; ARMS 4 site, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4764°, -149,832°, 13 m, col. Biocode IZ/ARMS team, 31.10.2012. **FLMNH** UF 1420; ARMS 13 site, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4785°, -149,848°, 13 m, col. Biocode IZ/ARMS team, 07.02.2012.

Colônias de coloração branca em vida, tamanho variado, chegando a aproximadamente 4,0 cm de extensão e cerca de 2,0 mm de espessura. Superfície da colônia com projeções em forma de papilas triangulares associadas a cada sifão oral. Espículas abundantes por toda a colônia, células *bladder* presentes e simbiontes ausentes. Espículas estreladas, diâmetro de 30-80 µm, com cerca de 6-9 raios cônicos. Cavidade cloacal geralmente na altura do tórax. Zooides de coloração branca, com comprimento total de 1,3 mm. Tórax posicionado linearmente em relação ao abdome. Sifão oral com seis lobos pontiagudos e abertura atrial expondo uma ampla porção da faringe. Faringe com 7, 7, 6 e 5 fendas em cada fileira, respectivamente. Órgão torácico lateral de forma circular, situado na quarta fileira de fendas, próximo ao endóstilo. Lingueta atrial ausente. Brotamento na região do pedúnculo esofágico retal. Apêndice fixador inserido na região do pedúnculo esofágico retal. Alça intestinal fechada. Testículo único e espermiduto em espiral, com 6-7 voltas. Larva com comprimento de 0,5 mm e cauda recobrando 3/4 do tronco. Larva simples, com três papilas adesivas e quatro pares de ampolas.

Comentários: As papilas triangulares na superfície da colônia se assemelham bastante às observadas para as espécies *D. apersum*, *D. cuculliferum*, e *D. maculosum*. *Didemnum apersum* tem espículas menores (16-25 µm), com raios mais numerosos (10-12) (TOKIOKA, 1953). *Didemnum cuculliferum* difere quanto ao número de voltas no

espermiduto (8-9) e forma da colônia (oval) (MONNIOT; MONNIOT, 1987), enquanto, *D. maculosum* tem apenas duas papilas adesivas (LAFARGUE, 1976).

Distribuição: Austrália (KOTT, 2004), Palau (TOKIOKA, 1967) e Polinésia Francesa (MONNIOT; MONNIOT, 1987).

***Didemnum parau* Monniot & Monniot, 1987**

(Prancha 6D)

Material examinado: FLMNH UF 552 e UF 553, West of Cook's Bay Pass, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4757°, -149,838°, 12-15 m, col. Tito Lotufo e Gustav Paulay, 29.10.2009.

Colônia de coloração branca em vida, consistência quebradiça, com espessura de 1,5 mm. Células *bladder* presentes e simbiontes ausentes. Espículas distribuídas por toda a túnica. Espículas de forma globular, diâmetro de 30 µm, com numerosos raios finos em forma de agulha. Zooides pequenos, com comprimento total menor que 1,0 mm. Sifão oral curto e levemente pontiagudo. Abertura atrial expondo uma pequena porção da faringe. Órgão torácico lateral circular, saliente e localizado próximo ao endóstilo na altura da terceira fileira de fendas. Apêndice fixador curto, inserido no pedúnculo esofágico retal. Alça intestinal fechada. Testículo único. Espermiduto em espiral, com sete voltas. Larvas não foram observadas.

Comentários: Essa espécie se assemelha a *D. fragile* tanto pela morfologia do zooide, quanto pela forma das espículas (MONNIOT; MONNIOT, 1987). Contudo, *D. fragile* apresenta espículas de maior diâmetro (40 µm) e espermiduto com seis voltas (KOTT, 2001). Outro caractere relevante na distinção entre estas espécies é o órgão torácico lateral saliente observado em *D. parau* (MONNIOT; MONNIOT, 1987).

Distribuição: Polinésia Francesa (MONNIOT; MONNIOT, 1987) e Nova Caledônia (MONNIOT; MONNIOT, 1996).

***Didemnum perlucidum* Monniot F., 1983**

(Pranchas 4B e 6E)

Material examinado: FLMNH UF 1023, Golfo do México, Flórida, EUA, col. Gustav Paulay, Nat Evans, François Michonneau, Cheryl Tracker, Raph Williams e Antônio Baeza. 13.03.2011. FLMNH UF 1089, Florida Keys, Flórida, EUA, 4,6 m, 20.05.2004. USNM 1092872 e USNM 1092893, Atlântico Norte, Mar do Caribe, Belize, col. Goodbody, I, M. 01.08.1995. ColBIO TL945 e TL 948, Marina, Bocas del Toro, Panamá, 9°20'10''N, 82°14'50''W, col. Andréa Oliveira, 27.06.2014.

Colônia incrustante, coloração branca em vida, com extensão de 7,0 cm e 2,0 mm de espessura. Simbiontes ausentes. Espículas distribuídas por toda a túnica, menor densidade nos canais cloacais. Espículas estreladas, com 30 µm de diâmetro e cerca de 9-10 raios cônicos. Cavidade cloacal na altura do tórax. Zooides com comprimento total de 1,0 mm. Faringe com seis fendas na primeira fileira. Sifão oral curto com seis lobos pontiagudos. Abertura atrial ampla expondo parte da faringe. Órgão torácico lateral alongado e saliente, situado próximo à abertura atrial. Apêndice fixador longo, inserido no pedúnculo esofágico retal. Alça intestinal fechada. Testículo único. Espermiduto em espiral, com sete voltas. Larva simples, com cauda recobrimdo 3/4 do tronco. Larva com comprimento do tronco de 0,5 mm, três papilas adesivas e quatro pares de ampolas.

Comentários: *Didemnum perlucidum* apresenta uma ampla distribuição e uma das principais características na identificação dessa espécie é a ausência de espículas sobre os canais cloacais.

Distribuição: Polinésia Francesa (MONNIOT; MONNIOT, 1987), Panamá (ROCHA; FARIA; MORENO, 2005), Belize (GOODBODY, 2000), Venezuela (ROCHA *et al.*, 2010), Brasil (ROCHA; MONNIOT F., 1995), Senegal (MONNIOT; MONNIOT, 1994), Tanzânia (MONNIOT; MONNIOT, 1997), Indonésia (MONNIOT; MONNIOT, 1996), Ilhas Marianas (MONNIOT; MONNIOT, 2001), Guam (LAMBERT, 2003) e Nova Caledônia (MONNIOT; MONNIOT, 1996).

***Didemnum psammatodes* (Sluiter, 1895)**

(Pranchas 2F e 4C)

Sinonímia: Ver Kott (2001), página 229

Material examinado: **FLMNH** UF 538, UF 540, UF 541 e UF 542, Moorea, Polinésia Francesa, -17,4827°, -149,851°, 0-2 m, col. Tito Lotufo, 27.10.2009. **FLMNH** UF 770, East side of Opunohu Bay, Moorea, Polinésia Francesa, 17,5097°, -149,851°, 1 m, col. Tito Lotufo, Nicole Gravier-Bonnet, Arthur Anker e Jon Norenburg, 08.11.2009. **FLMNH** UF 1071, Summerland Key, Florida Key, Estados Unidos da América, 24,6777°, -81,459°, 23.06.2002. **FLMNH** UF 1487, Palm Beach, Flórida, EUA, 26,9481°, -80,0835°, 1,5 m, 09.12.2009. **FLMNH** UF 1564, DRTech, St John's Island, Cingapura, 1,2152°, 103,8513°, 0-5 m, col. Nathaniel Evans, 25.05.2013. **ColBIO** TL 799, Guarapari, Espírito Santo, Brasil, -20,700°, -40,417°, col. Tito Lotufo, 28.03.2012. **ColBIO** TL 949, Marina, Bocas del Toro, Panamá, 9°20'10''N, 82°14'50''W, col. Andréa Oliveira, 27.06.2014.

Colônia de coloração marrom devido à grande quantidade de pelotas fecais na superfície da túnica. Células *bladder* presentes e simbiontes ausentes. Espículas em pouca densidade na superfície da colônia. Espículas estreladas, com diâmetro de até 50 µm, com raios cônicos e numerosos (13-15) na secção transversal. Zooides observados através da superfície da colônia. Zooides de coloração branca, medindo cerca de 1,0 mm de comprimento total. Faringe com sete fendas na primeira fileira. Sifão oral com seis lobos pontiagudos e atrial expondo uma pequena parte da faringe. Órgão torácico lateral circular, localizado próximo à abertura atrial, entre a terceira e quarta fileira de fendas. Apêndice fixador curto, inserido no pedúnculo esofágico retal. Testículo único. Espermiduto em espiral, com sete voltas. Larva simples, medindo 0,3 mm, três papilas adesivas e quatro pares de ampolas. Cauda recobrimdo 3/4 do tronco da larva.

Comentários: Essa espécie é facilmente identificada pelas pelotas fecais na superfície da colônia. Esse é o primeiro registro de *D.psammatodes* para a Polinésia Francesa.

Distribuição: Pantropical, ver Kott (2001), página 229.

Novo registro: Polinésia Francesa (Moorea).

***Didemnum sordidum* Kott, 2001**

(Pranchas 3A, 4D e 6F)

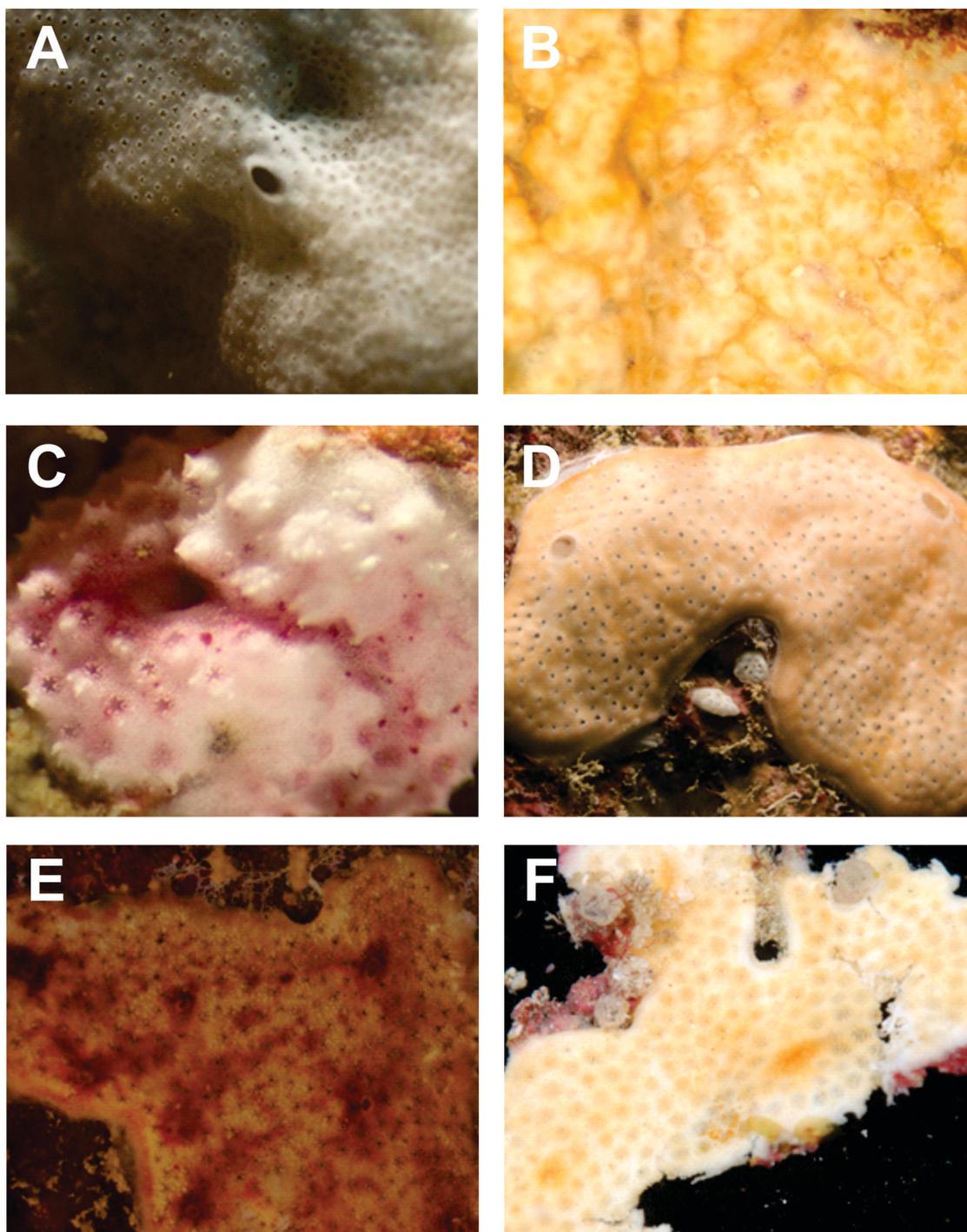
Material examinado: FLMNH UF 597, Temae, Moorea, Polinésia Francesa, -17,47839°, -149,7639°, 18-23 m, col. Gustav Paulay, Seabird McKeon, Stephanie Bush e Steve Haddock, 29.10.2009. FLMNH UF 612 e UF 622, North of Haapiti Pass, Moorea, Polinésia Francesa, -17,48859°, -149,8259°, 15-21 m, col. Tito Lotufo e Gustav Paulay, 30.10.2009. FLMNH UF 718, Opunahu Pinnacle, Moorea, Polinésia Francesa, -17,49446°, -149,8621°, 14-20 m, col. Sarah McPherson Seabird McKeon, 04.11.2009. FLMNH UF 734, West of Motu Hahi in Lagoon, Moorea, Polinésia Francesa, -17,54958°, -149,7791°, 10-30 m, col. Tito Lotufo, Gustav Paulay e Seabird McKeon, 06.11.2009.

Colônias incrustantes, pequenas, com aproximadamente 2,0 cm de extensão e 1,0 mm de espessura. Superfície da colônia com papilas no lobo da abertura oral. Túnica de coloração amarela em vida; após fixação a mesma torna-se marrom, devido ao pigmento presente na túnica. Espículas abundantes em toda a colônia, forma estreladas, com diâmetro de até 65 µm e cerca de 8-9 raios cônicos na secção transversal. Zooides de coloração castanha, com comprimento total de aproximadamente 0,4 mm. Sifão oral longo em alguns indivíduos, com seis lobos arredondados e abertura atrial expondo uma ampla porção da faringe. Faringe com quatro fileiras de fendas. Número de fendas por fileiras não observado. Órgão torácico lateral circular, saliente e situado no meio do tórax. Apêndice fixador médio inserido no fim do tórax. Abertura da cavidade cloacal na altura do tórax. Alça intestinal fechada. Testículo único e espermiduto em espiral com 7-8 voltas. Larva simples, com comprimento do tronco de 0,2 mm. Cauda recobrimdo 3/4 do tronco da larva, três papilas adesivas e quatro pares de ampolas.

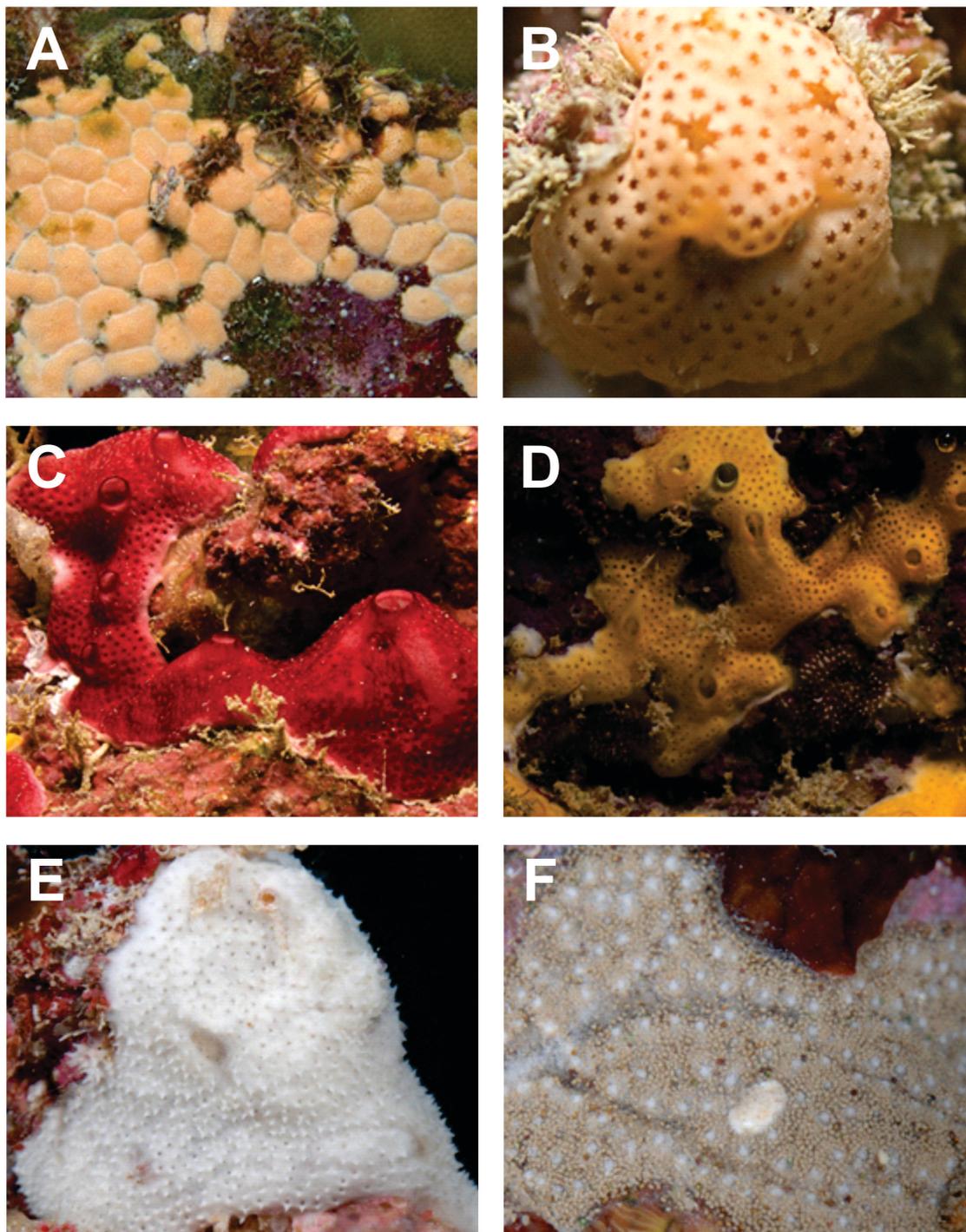
Comentários: A morfologia externa da colônia, dos zooides e das espículas são como relatados por Kott (2001), embora o número de ampolas na larva seja diferente (cinco). Monniot & Monniot (1987) apontam para a presença do órgão torácico lateral saliente, caractere que também foi observado nos exemplares analisados.

Distribuição: Polinésia Francesa (MONNIOT; MONNIOT, 1987) e Austrália (KOTT, 1962; 2001).

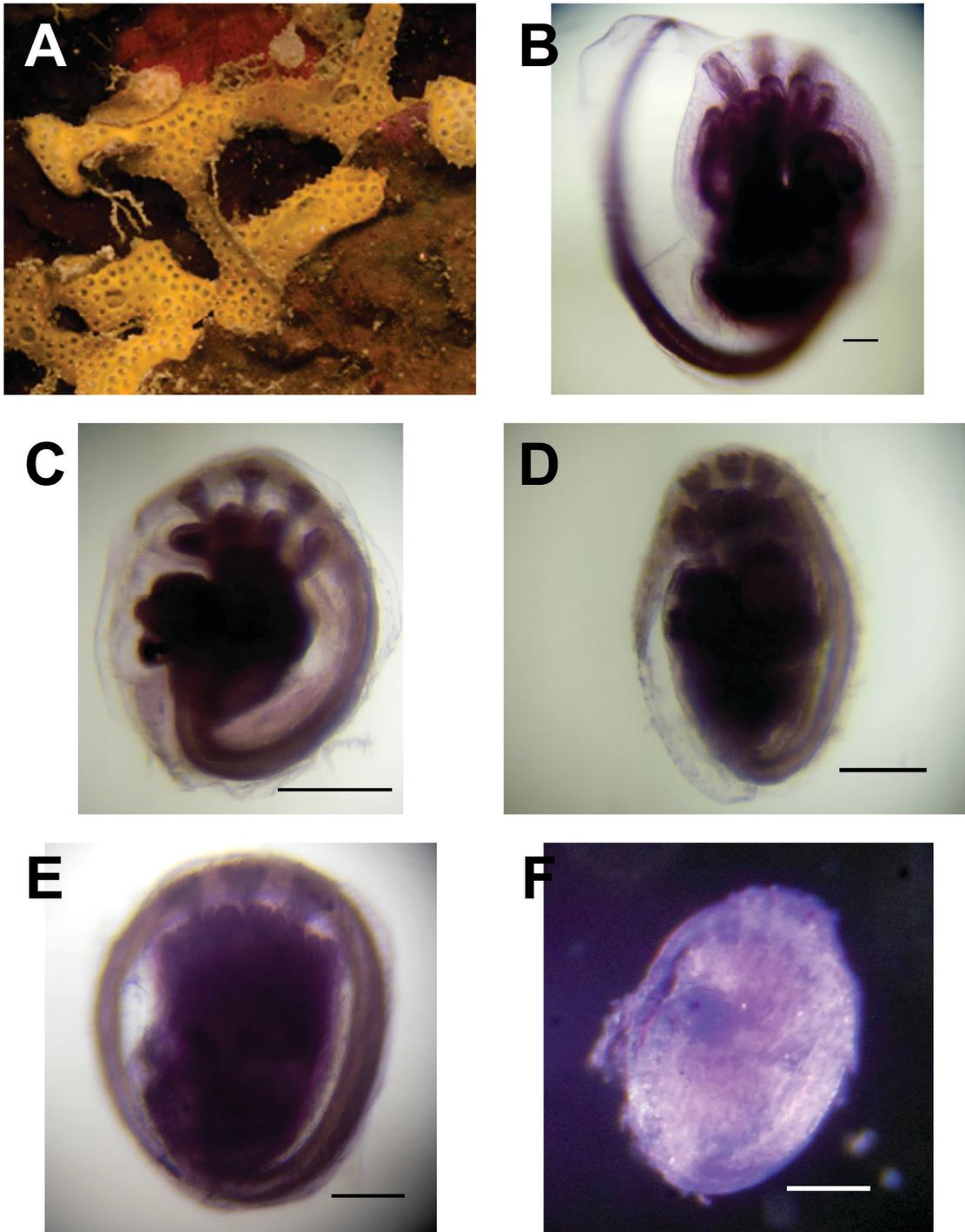
PRANCHAS: Aspecto externo das colônias (Fotos: Gustav Paulay – Projeto Moorea Biocode), larvas e espículas.



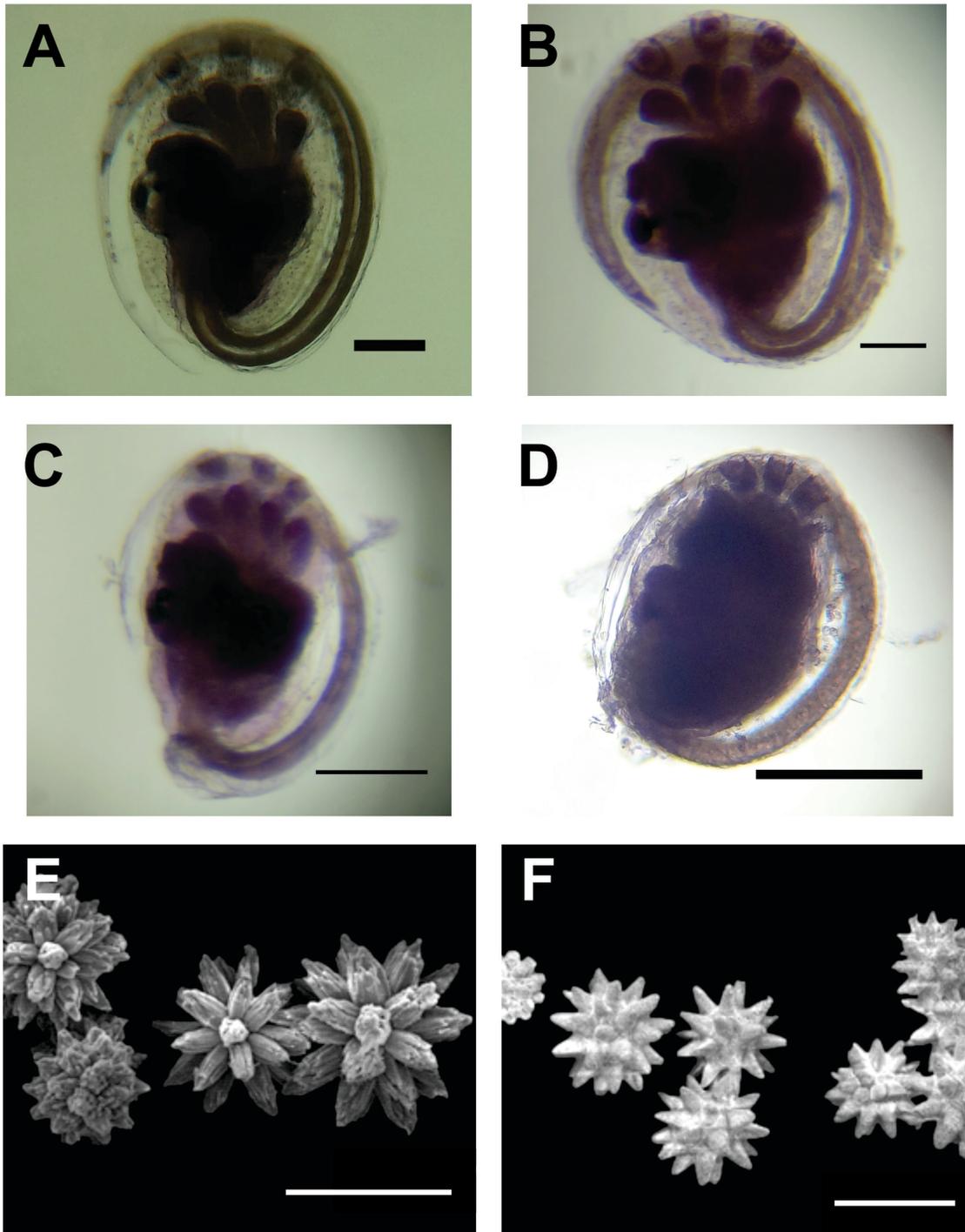
Prancha 1. Aparência externa das colônias; **A**, *Didemnum ahu* (UF574); **B**, *Didemnum apuroto* (UF731); **C**, *Didemnum cuculliferum* (UF676); **D**, *Didemnum fragile* (UF693); **E**, *Didemnum granulatum* (UF1408) e **F** *Didemnum granulatum* (UF577);



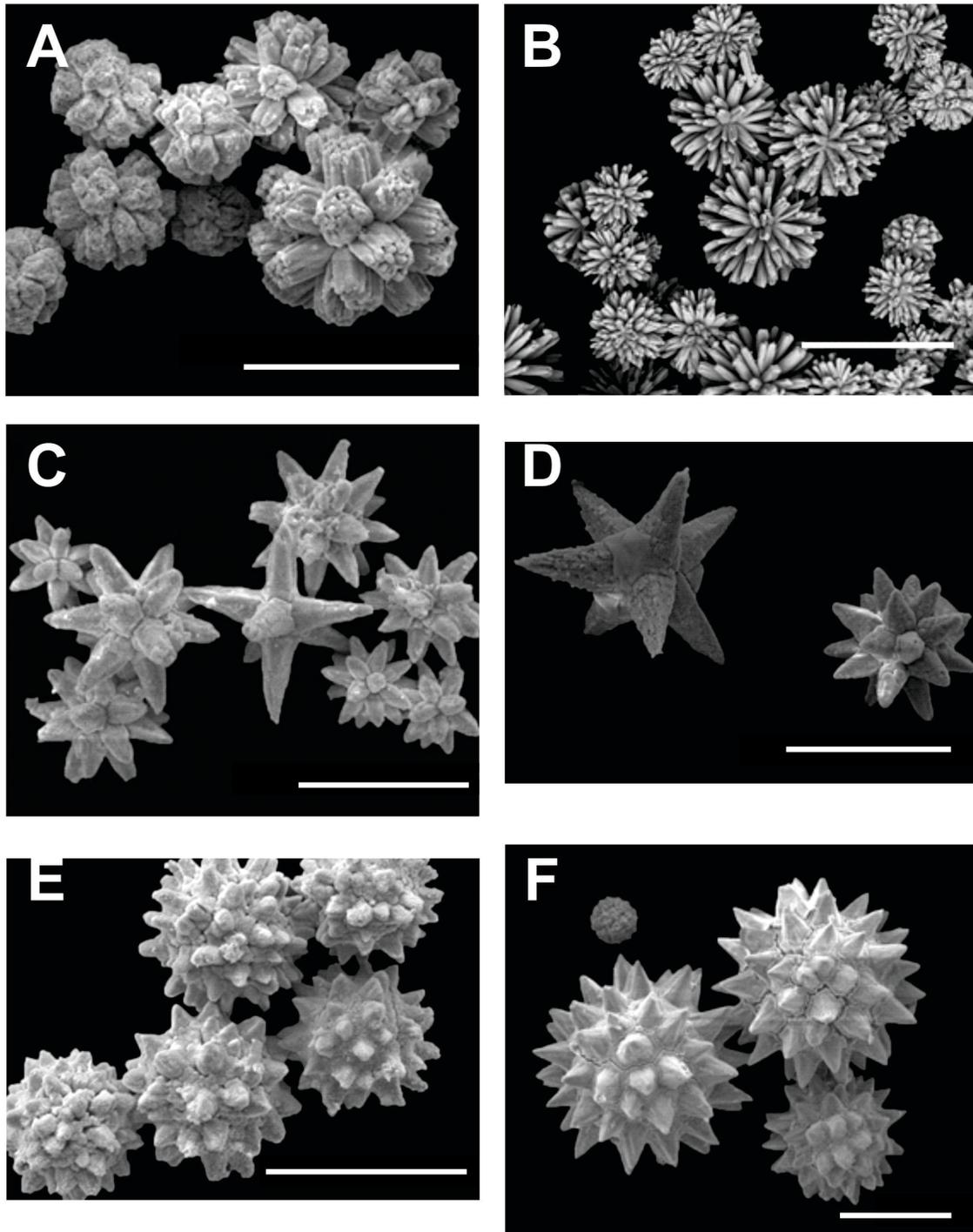
Prancha 2. Aparência externa das colônias; **A**, **B**, *Didemnum ligulum* (UF694; UF578); **C** *Didemnum membranaceum* (UF526); **D**, *Didemnum mutabile* (UF691); **E**, *Didemnum nekozita* (UF595) e **F**, *Didemnum psammatodes* (UF542);



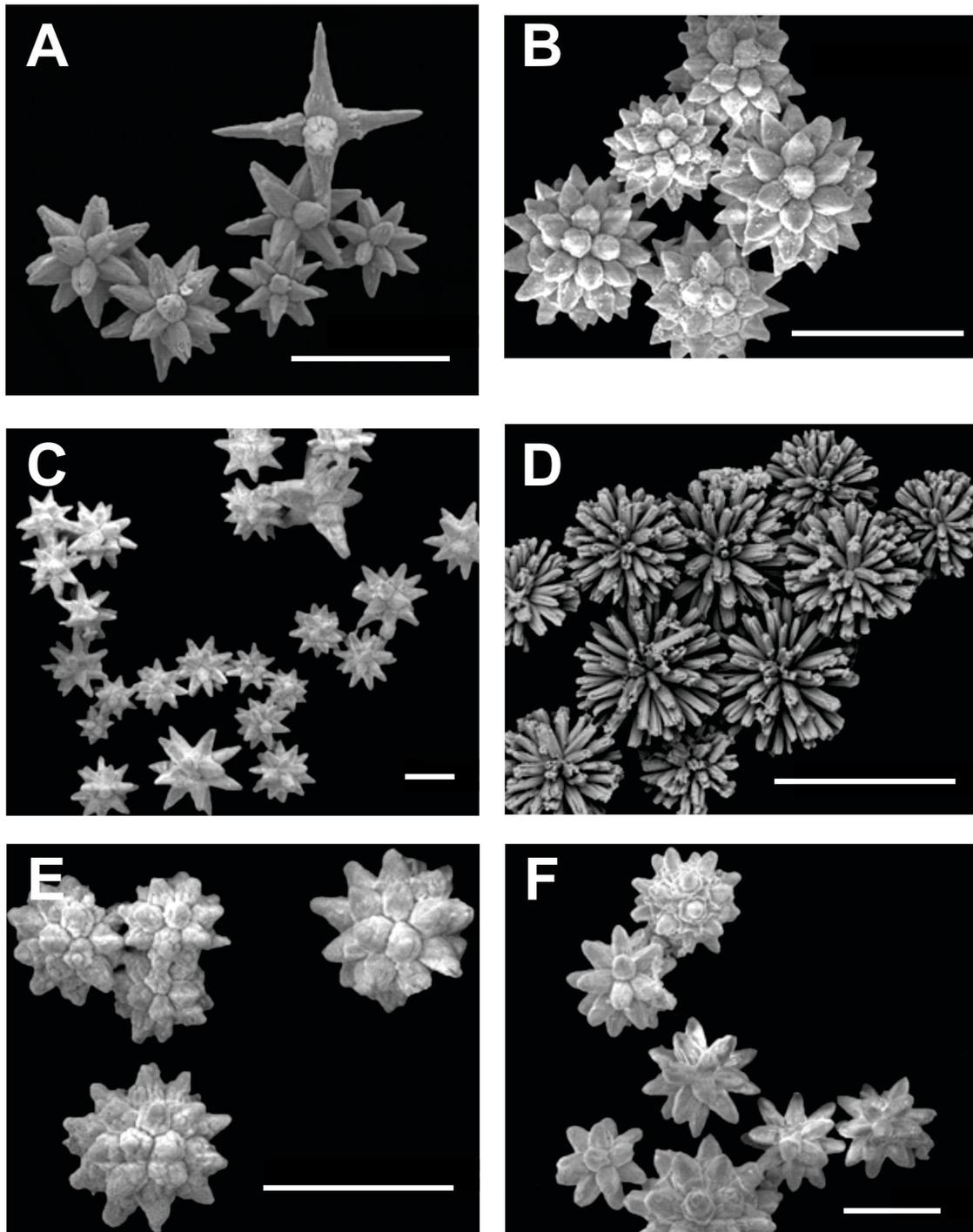
Prancha 3. Aparência externa das colônias; **A**, *Didemnum sordidum* (UF734). Larva; **B**, *Didemnum cineraceum*; **C**, *Didemnum galacteum*; **D**, *Didemnum granulatum*; **E**, *Didemnum ligulum*; **F**, *Didemnum mutabile*, escala: 0,1 mm.



Prancha 4. Larva; **A**, *Didemnum nekozita*; **B**, *Didemnum perlucidum*; **C**, *Didemnum psammatoles*; **D**, *Didemnum sordidum*; Espículas; **E**, *Didemnum ahu* (UF584); **F**, *Didemnum apuroto* (UF813), escala: 40 µm.



Prancha 5. **A**, *Didemnum duplicatum* (TL811); **B**, *Didemnum fragile* (UF839); **C**, *Didemnum granulatum* (UF1408), **D**, *Didemnum granulatum* (UF573); **E**, *Didemnum ligulum* (TL796); **F**, *Didemnum ligulum* (UF694); escala: 40 μ m



Prancha 6. **A**, *Didemnum membranaceum* (UF526); **B**, *Didemnum mutabile* (UF689), **C**, *Didemnum nekozita* (UF595); **D**, *Didemnum parau* (UF552); **E**, *Didemnum perlucidum* (TL948); **F**, *Didemnum sordidum* (UF734); escala: 40 μ m.

APÊNDICE C – IMAGENS DE ALGUNS DOS CARACTERES MORFOLÓGICOS DE *DIDEMNUM*.

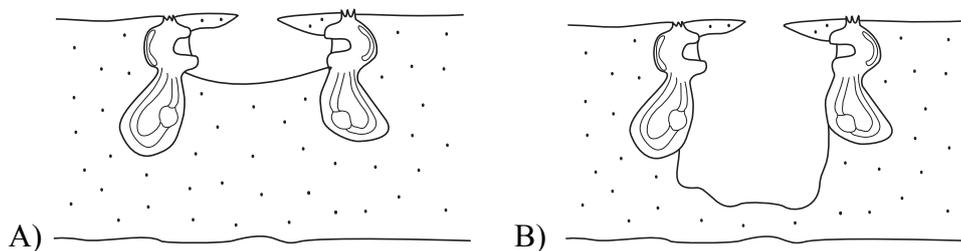


Figura 1 – Forma do sistema de cavidade cloacal; A) Horizontal torácica e B) Profunda (incluindo a região do abdome).

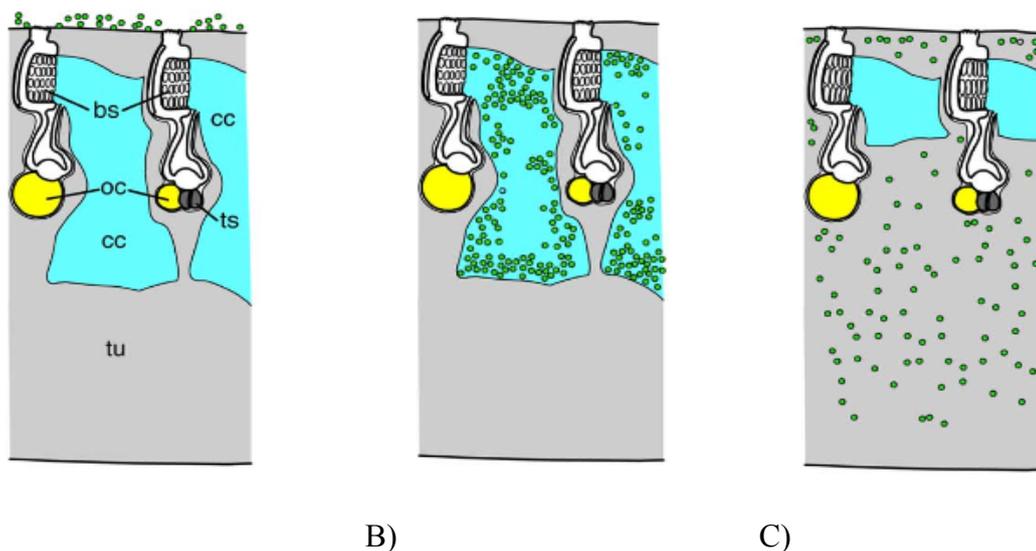


Figura 2 – Desenho esquemático indicando o local de incubação dos simbiotes (células verdes); A) Superfície da colônia, B) Cavidade cloacal e C) Matriz da túnica (HIROSE, 2015).

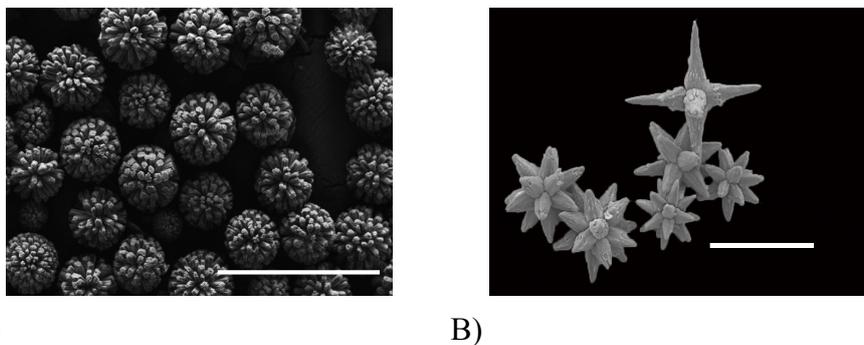


Figura 3 – Forma das espículas; A) Globular e B) Estrelada, escala: 40 μm .

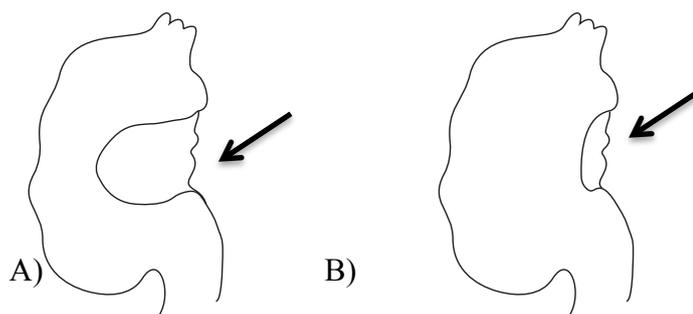


Figura 4 – Forma da abertura atrial A) Ampla e B) Estreita.

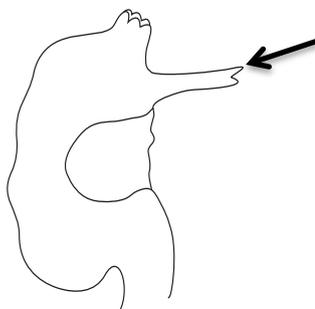


Figura 5 – Lingueta atrial bifurcada.

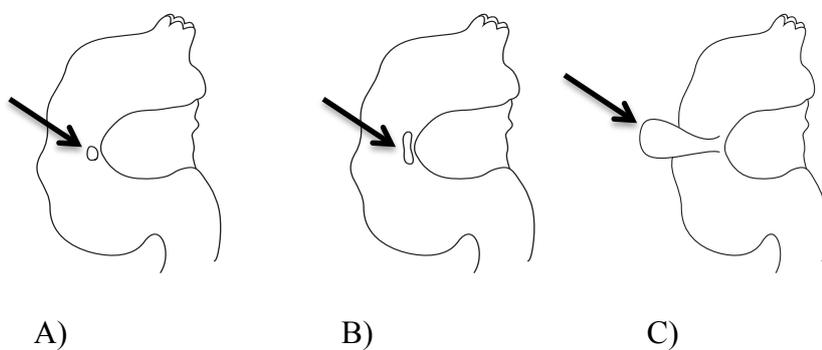


Figura 6 – Órgão torácico lateral; A) Circular e séssil; B) Alongado e séssil e C) Oval e saliente.

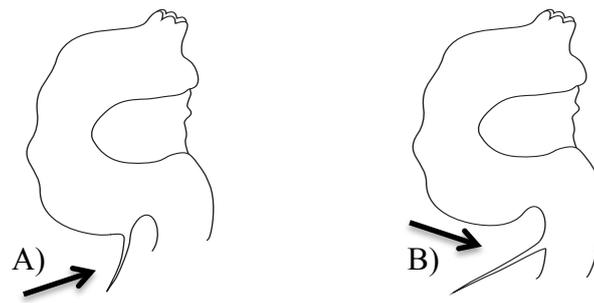


Figura 7 – Apêndice fixador; A) Inserido no fim do tórax e B) Inserido no pedúnculo esofágico retal.

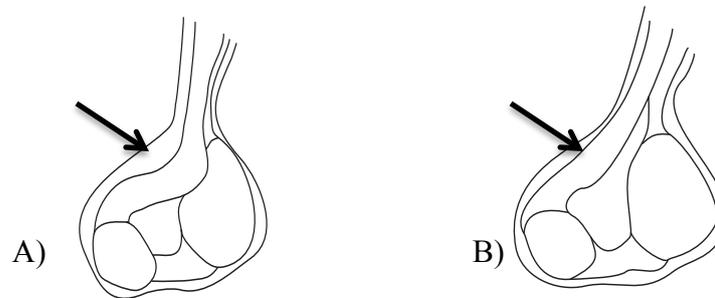


Figura 8 – Alça intestinal; A) Fechada e B) Aberta.



Figura 9 - Forma do espermiduto; a) Reto e b) Espiral.

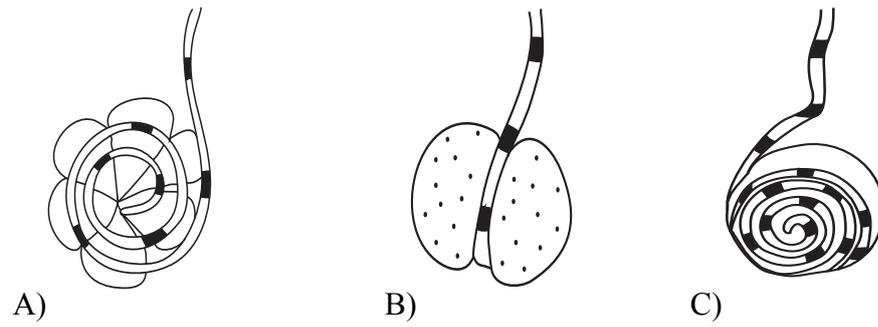


Figura 10 – Número de lobos testiculares; A) Múltiplos, B) Bilobado e C) Único.

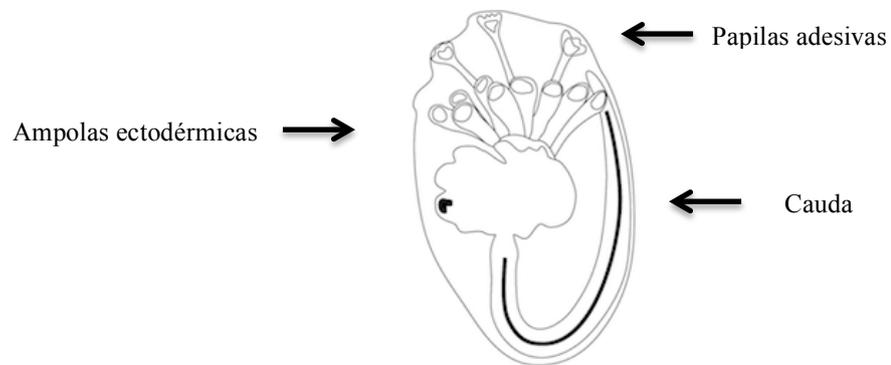
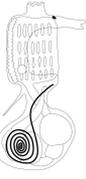


Figura 11 – Desenho esquemático de uma larva.

**APÊNDICE D – COMPARAÇÃO DOS CARACTERES MORFOLÓGICOS
PARA DIAGNOSE DOS GÊNEROS.**

Gêneros	Lingueta atrial	Número de voltas no espermiduto	Número de lobos testiculares	Número de papilas adesivas	Número de ampolas ectodérmicas (pares)	Número de fendas no oozooide
<p><i>Polysyncraton</i></p> 	Presente	Menor ou igual a 5	Maior ou igual a 3	3	Maior que 8	4
<p>Didemnidae gen. n</p> 		Maior que 5	Bilobado ou único			3
<p><i>Didemnum</i></p> 	Ausente			2 ou 3	Geralmente 4	