

PATRÍCIA FERNANDES NERES

**“ANÁLISES MORFOLÓGICA E FILOGENÉTICA DE *Daptonema*
sp. nov., DETENTORA DE UMA ESTRATÉGIA REPRODUTIVA
INCOMUM PARA NEMATODA MARINHO.”**

RECIFE, FEVEREIRO DE 2008

Neres, Patrícia Fernandes.

“Análises morfológica e filogenética de *Daptonema* sp.nov., detentora de uma estratégia reprodutiva incomum para nematoda marinho” / Patrícia Fernandes Neres. – Recife: O Autor, 2008.

83 folhas. il.,fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Inclui bibliografia.

- 1. *Daptonema* – Taxonomia. 2. Nematoda - Ovoviviparidade.**
- 3. Xyalidae - Filogenia. I. Título.**

**595.132
592.57**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2008-059**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

PATRÍCIA FERNANDES NERES

**“ANÁLISES MORFOLÓGICA E FILOGENÉTICA DE *Daptonema*
sp. nov., DETENTORA DE UMA ESTRATÉGIA REPRODUTIVA
INCOMUM PARA NEMATODA MARINHO.”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Rodrigo Augusto Torres.

Co-orientador: Profa. Verônica Gomes da Fonsêca-Genevois

RECIFE, FEVEREIRO DE 2008.

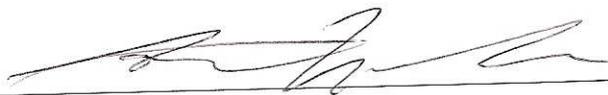
Dissertação Defendida e Aprovada pela Banca Examinadora

Titulares:



Dr. Rodrigo Augusto Torres

UFPE – Depto. Zoologia (Orientador)



Dr. Antônio Mateo Sole Cava

UFRJ – Depto. Genética (Membro Externo)

Dr. Francisco José Victor de Castro

UFCEG – Campus Cuité (Membro Externo)



Dr. André Morgado Esteves

UFPE – Depto. Zoologia (Membro Externo)

Suplentes:

Dra. Maria Eduarda Lacerda Larrazábal

UFPE – Depto. Zoologia (Membro Interno)

Dra. Tânia Tassinari Rieger
UFPE – Depto. Genética (Membro Externo)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todas as pessoas que participaram desta conquista.

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

(Fernando Pessoa)

Agradecimentos:

Agradeço a Deus por guiar todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais por todo amor, paciência e incentivo ao longo de todos estes anos.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo A. Torres pela contribuição profissional, pelas palavras de conforto, por me acolher como “filha científica” e, sobretudo, por ter acreditado em meu potencial.

À Verônica da Fonsêca-Genevois, minha mãe científica e co-orientadora, por todos estes anos de orientação, carinho, paciência, pelos puxões de orelhas imprescindíveis para minha formação, e por acreditar no meu trabalho.

A todos do Laboratório de Meiofauna, mesmo os que estão distante (Chico e Tatá), que de alguma forma contribuíram para este trabalho e para meu conhecimento em Nematologia. Em especial meus companheiros de mestrado (Geruso, Rita e Vivis) pelas conversas, gargalhadas e todo apoio pessoal e profissional.

À Alessandra Botelho, a artista de nosso laboratório, pelas fotografias e pranchas de meus bichinhos.

À Priscila Murolo, por me ensinar as técnicas necessárias para análise de microfitobentos e matéria orgânica, pelas milhões de vezes que tirou minhas dúvidas, e pelas conversas filosóficas no Arriégua (rsrsrs) que me divertiram muito.

Às meninas do Laboratório de Dinâmica de Populações pela simpatia nas inúmeras vezes que eu as interrompi em seus trabalhos ao pedir algo. (rsrsrs)

Ao Prof. André Esteves pelos esclarecimentos e análise estatística.

À Profa. Tânia Rieger, Neyvan e Mariana pela ajuda na parte genética.

À Profa. Wilfrida Decraemer e a Universidade de Gent, pela ajuda profissional e por financiar o sequenciamento para análise filogenética.

A turma de 2006 do Mestrado em Biologia Animal por todos os momentos compartilhado. Todos vocês estão no meu coração.

A Carolina Liberal (Carol), representante de nossa turma, por sempre manter nossa turma bem informada e lutar por nossos interesses.

Aos professores pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

Ao Mestrado em Biologia Animal, em especial ao Prof. Paulo Santos, coordenador do curso, Profa. Maria Eduarda, vice-coordenadora, e Ana Elizabeth. Secretária.

Aos Professores Antônio Sole Cava, André Esteves, Francisco Castro, Tânia Rieger e Maria Eduarda Larrazábal, que aceitaram fazer parte da minha banca examinadora.

À CAPES pelo apoio financeiro durante todo o curso na forma de bolsa de estudos.

E por fim, agradeço ao meu namorado (Paulo), por toda ajuda, paciência, compreensão, palavras de carinho e incentivo, dedicação, enfim, por seu amor.

Lista de Figuras:**Página**

01. Mapa da Bacia do Pina, Recife – Pernambuco, evidenciando o local de coleta (📍).	
FONTE: Google Earth.....	21
02. Desenho de <i>Daptonema</i> sp. nov. holótipo: A – Visão Geral; B - Região cefálica; C- Glândulas ejaculatórias; D - Cauda; E - Aparato copulatório (parátipo) e F - Cárdia.....	37
03. Desenho de <i>Daptonema</i> sp. nov. alótipo: A - Visão Geral; B - Região cefálica; C- Cauda.....	40
04. Fotos de <i>Daptonema</i> sp. nov. Holótipo: A – Visão Geral; B – Região anterior; C – Anfídio; D; Cavidade bucal; E – Cauda; F – Espícula. Alótipo: G – Over-view.....	41
05. Fotos de <i>Daptonema</i> sp. nov. macho: A – Região anterior; B – Anfídio; C – Cauda; D – Estrutura externa do gubernáculo.....	42
06. Topologia do Neighbor-joining baseado em seqüências de 18S de 25 espécimes de Xyalidae e 3 gupos externos (<i>Monhystera riemanni</i> , <i>Sphaerolaimus hirsutu</i> e <i>Spirinia parasitifera</i>). Os números são valores de bootstrap e jacknife (10.000 pseudoréplicas), respectivamente, ambos com suporte de ramo acima de 50%. Barra de escala: 0,01 substituições por sítio.....	44
07. Topologia da Máxima Parcimônia baseada em seqüências de 18S de 25 espécimes de Xyalidae e 3 gupos externos externos (<i>Monhystera riemanni</i> , <i>Sphaerolaimus hirsutu</i> e <i>Spirinia parasitifera</i>). Os números são valores de bootstrap e jacknife (10.000 pseudoréplicas), respectivamente, ambos com suporte de ramo acima de 50%.....	47
08. Topologia de Inferência Bayesiana baseada em seqüências de 18S de 25 espécimes de Xyalidae e 3 gupos externos externos (<i>Monhystera riemanni</i> , <i>Sphaerolaimus hirsutu</i> e <i>Spirinia parasitifera</i>). A topologia é resultante de 10001 árvores (1000000 de gerações/desvio padrão de 0,005222).....	49
09. Precipitação (mm) em Recife no período de setembro a novembro de 2006 e de maio a julho de 2007. Os valores foram determinados pela soma da precipitação nos sete dias que antecederam as coletas. (FONTE: www.inmet.com.br).....	50
10. Densidade de <i>Daptonema</i> sp. nov. na Bacia do Pina, Recife, Pernambuco.....	51
11. Estrutura da população de <i>Daptonema</i> expressos em densidade, evidenciando os estágios de desenvolvimento na Bacia do Pina, Recife, Pernambuco.....	52

12. Proporção de fêmeas grávidas de <i>Daptonema</i> sp. nov. em relação ao número total de fêmeas na Bacia do Pina, Recife, Pernambuco.....	52
13. Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento da prole das fêmeas grávidas de <i>Daptonema</i> sp. nov., ovos (A), embriões (B), juvenil 1 (C) e juvenil 2 (D). (FONTE: Neres, 2006).....	53
14. Desenho esquemático de uma fêmea grávida de <i>Daptonema</i> sp. nov. e fotografia detalhada da prole. (FONTE: Neres, 2006).....	54
15. Fotografia da fêmea de uma fêmea não fertilizada de <i>Daptonema</i> sp. nov. (A), de uma fêmea grávida (B) e de uma fêmea após a eclosão de toda a prole (C).....	55
16. Fotografia da fêmea grávida de <i>Daptonema</i> sp. nov.(A) evidenciando o espaço antes ocupado pelos e dos juvenis (B) que emergiram dela em placa de Petri.....	56
17. Variação temporal da densidade de <i>Daptonema</i> sp. nov. grávidas em relação aos parâmetros ambientais (Microfitobentos – A; Matéria Orgânica – B; Temperatura – C; Salinidade –D). Bacia do Pina – PE.....	58

Lista de Tabelas:**Página**

01. Espécies de Xyalidae com os respectivos número de bases (pb) e número de acesso. Fonte: GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).....	28
02. Espécies válidas de <i>Daptonema</i> segundo o banco de dados do NeMys e Lorenzen (1977)	33 e 34
03. Valor médio das medidas corpóreas de sete machos de <i>Daptonema</i> sp. nov.....	36
04. Valor médio das medidas corpóreas de sete fêmeas de <i>Daptonema</i> sp. nov.....	39
05. Distância genética entre as espécies da Família Xyalidae cujas seqüências de 18S estavam disponíveis no GeneBank.....	45
06. Resultado da Correlação de Spearman.....	58

Resumo

Nematoda é um dos táxons mais abundantes e diversos dentre os metazoários, contudo, grande parte desta diversidade permanece desconhecida. A taxonomia do grupo muitas vezes tem uma história controversa, não somente em consequência do desenvolvimento dos procedimentos em sistemática, mas também por que relativamente poucos nematologistas produzem classificações detalhadas. Além disso, Nematoda é considerado um grupo de difícil identificação, devido ao seu tamanho corporal, o que reforça a necessidade da utilização de outros subsídios para acelerar a descoberta e classificação de sua biodiversidade. A fim de pôr em prática a “taxonomia integrativa”, onde vários tipos de dados são utilizados no estudo das espécies, este trabalho destina-se a descrever uma nova espécie de *Daptonema*, revelar as suas relações filogenéticas, além de descrever e correlacionar sua estratégia reprodutiva com os parâmetros ambientais. As coletas de material biológico e dados abiótico foram realizadas na Baía do Pina, quinzenalmente, na estação seca (setembro, outubro e novembro/2006) e na estação chuvosa (maio, junho e julho/2007), sempre na baixa-mar. Em dezembro, coletou-se uma amostra para extração de DNA e sequenciamento do gene 18S (rDNA). As seqüências foram analisadas pelos métodos de máxima parcimônia, neighbor-joining e inferência bayesiana. As correlações com os fatores ambientais foram realizadas utilizando a Correlação de Spearman. A espécie de *Daptonema* é nova por apresentar uma acentuada redução das setas cefálicas e a espícula em linha reta, característica esta que requer uma emenda na descrição do gênero. Em algumas fêmeas também se pode observar a incubação intra-uterina da prole, sendo tal característica considerada uma das autapomorfias da espécie. As análises apoiaram *Daptonema* sp. nov. como uma linhagem genética e evolutivamente distinta. Os dados também indicaram uma sinonímia e uma parafilia envolvendo *Daptonema*. Em *Daptonema* sp. nov. foi observado a ovoviviparidade, entretanto, o que torna o fenômeno peculiar é a presença de ovos e juvenis em vários estágios de desenvolvimento. Os resultados ecológicos mostraram que nenhum fator ambiental apresentou uma correlação significativa com o fenômeno reprodutivo em *Daptonema* sp. nov.

PALAVRAS-CHAVE: Taxonomia de *Daptonema* - 18S rDNA - Filogenia de Xyalidae - Taxonomia integrativa - Ovoviviparidade em Nematoda.

Abstract

Nematoda is one of the most abundant and diverse taxa among Metazoa, however part of this diversity remain not well known. The taxonomy of the group often has a controversial history, not only as result of wider development in animal systematic, but also because of unique skills and perspectives of the relatively few nematologists who have produced detailed classifications. Beside that, Nematoda is considered a group of difficult identification, due to its physical size, which reinforces the necessity to use other subsidies to accelerate the discovery and classification of its biodiversity. In order to put in practice the “integrative taxonomy”, where several types of data are being used in the study of the species, this work has the aim of describing a new species of *Daptonema*, revealing its phylogenetic relationships, describing and correlating its reproductive strategy with abiotics parameters. The collect of biological material and abiotic factors measurement were realized at the Pina Basin, fortnightly, in the dry station (September, October and November of 2006) and in the rainy station (May, June and July of 2007), always during low tide. In December, a sample was collected for DNA extraction and sequencing of 18S gene. The sequences were analyzed by the methods of maximum parsimony, neighbor-joining and bayesian inference. The correlations with the environmental factors were carried out using the Spearman Correlation. *Daptonema* is considered a new species because of the reduction of the cephalic setae and the morphology of the spicule in straight line, characteristic that demands a correction in the description of the Genus. Moreover, the females are characterized by intra-uterine development of the offspring, considered herein as autapomorphic feature. The analyses supported *Daptonema* sp. nov. as a genetic lineage and evolutively different. The data also indicated a synonymity and paraphyly in *Daptonema*. In *Daptonema* sp. nov. was observed ovoviviparity, however, what makes the special phenomenon is the presence of eggs and juveniles in several stages of development. The ecological results showed that no environmental factor presented a significant correlation with the reproductive phenomenon in *Daptonema* sp. nov.

KEYWORDS: *Daptonema* taxonomy - 18S rDNA - Xyalidae filogeny - Integrative taxonomy - Nematoda ovoviviparous.

Sumário

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....	14
2.OBJETIVOS.....	19
3. HIPÓTESES.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Área de Estudo.....	20
4.2. Procedimentos de Campo.....	22
4.3. Extração de <i>Daptonema</i> sp. nov.....	22
4.4. Diafanização e Preparação das lâminas.....	22
4.5. Identificação dos Nematoda.....	23
4.6. Microscopia eletrônica de varredura.....	25
4.7. Análise Molecular.....	26
4.7.1. Extração de DNA, PCR e Sequenciamento.....	26
4.7.2. Distância genética e relações filogenéticas.....	27
4.8. Material Abiótico.....	30
4.9. Análise dos Dados.....	31
4.9.1. Densidade.....	31
4.9.2. Estrutura da Comunidade.....	31
4.9.3. Tratamento estatístico.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1. Situação Taxonômica.....	32
5.2. Descrição da família Xyalidae Chitwood, 1951.....	32

5.3. Descrição do gênero <i>Daptonema</i> Cobb, 1920.....	33
5.4. Lista de Espécies Válidas.....	33 e 34
5.5. Descrição de <i>Daptonema</i> sp. nov.....	35
5.6. Distância genética e relações filogenéticas.....	43
5.6.1. Análise de Distância Genética (Neighbor-joining – NJ).....	43
5.6.2. Análise de Máxima Parcimônia (MP).....	46
5.6.2. Análise de Inferência Bayesiana (IB).....	48
5.7. Pluviometria.....	50
5.8. Estrutura Populacional de <i>Daptonema</i> sp. nov.....	51
5.9. Estratégia Reprodutiva.....	53
5.9.1. Descrição da Estratégia Reprodutiva.....	53
5.9.2. Correlações com os fatores abióticos.....	57
6. DISCUSSÃO.....	59
6.1. Diagnose diferencial de <i>Daptonema</i> sp. nov.....	59
6.2. Análise Filogenética.....	60
6.3. Estrutura Populacional.....	63
6.4. Estratégia Reprodutiva.....	64
7. CONCLUSÕES.....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

INTRODUÇÃO

Nematoda é um dos táxons mais abundantes e com maior riqueza específica dentre os metazoários (Hugot *et al.* 2001; Coomans, 2002; Lamshead, 2004). A estimativa é de que existam de 0,1 a 100 milhões de espécies (May, 1988; Hammond, 1992; Lamshead, 1993; Coomans, 2000). Contudo, grande parte desta diversidade permanece desconhecida, compondo-se apenas 26.646 de espécies descritas, das quais 10.681 são de vida livre (Hugot *et al.* 2001).

Estes organismos estão amplamente distribuídos, habitando do pólo aos trópicos em todos os tipos de ambientes, inclusive corpos de plantas e animais, regiões desérticas, altas montanhas e no mar profundo (Warwick, 1984; Heip *et al.*, 1985; Moens & Vincx, 1998; Ruppert *et al.*, 2005). Porém, as discussões, sobre distribuição global ou endemismo de espécies de nematódeos são ainda muito prematuras, principalmente por causa de estudos incompletos sobre a Nematologia global (De Ley *et al.*, 2006).

No Brasil, até pouco tempo não existiam especialistas neste grupo de animais, sendo os primeiros registros de Nematoda marinhos feitos por Coob (1920). Os trabalhos de Gerlach (1954; 1956a; 1956b; 1957a; 1957b) e de Meyl (1956 e 1957) representaram um importante passo que resultou em 209 espécies, das quais 106 eram novas. Até o momento são registradas 50 famílias, 285 gêneros e 230 espécies para ambientes marinhos e estuarinos da costa brasileira (Venekey, 2007).

Dentre os organismos da meiofauna os nematódeos marinhos representam geralmente de 50% a 90% do total da comunidade (Coull, 1988; Fleegeer & Decho, 1987). A grande diversidade de espécies de vida livre é freqüentemente atribuída a um elevado número de nichos ocupados, sendo a diversidade da cavidade bucal (que permite a exploração de uma ampla faixa de itens alimentares), assim como a tolerância a vários tipos de estresses ambientais, indicados como fatores importantes para estas especializações (Bouwman, 1983; Moens *et al.*, 2006).

A taxonomia em Nematoda muitas vezes tem uma história controversa, não somente em consequência do desenvolvimento dos procedimentos em sistemática, mas também por que relativamente poucos nematologistas produzem classificações detalhadas (De Ley *et al.*, 2006). Além disso, Nematoda é considerado um grupo de difícil identificação, principalmente devido ao seu tamanho corporal (<1 mm). Dessa forma, os procedimentos de identificação de

sua biodiversidade frequentemente exigem o uso de microscópios óptico e eletrônico de alta resolução, assim como o conhecimento em larga escala de formas descritas em literaturas taxonômicas especializadas (Blaxter & Floyd, 2003; De Ley *et al.* 2005).

Meldal *et al* (2007) relata que apesar do ciclo de vida dos nematódeos e suas relações serem estudados a mais de 350 anos, a falta de critérios objetivos para acessar a homologia entre caracteres morfológicos, tem dificultado a reconstrução filogenética do filo. Além disso, a sua ultra-estrutura e ontogênese são insuficientemente compreendidas e a falta de registros fósseis torna as comparações bem deficitárias. Tais dificuldades têm levado a criação de múltiplas classificações, muitas vezes conflitantes (Chitwood, 1933 e 1937; Chitwood & Chitwood, 1950; Sudhaus, 1976; Maggenti, 1981, 1983; Poinar, 1983; Lorenzen, 1994; Malakhov, 1994).

A mais conhecida análise acerca do arranjo taxonômico-sistemático em Nematoda propõe que o grupo pode ser dividido em duas grandes classes: 'Secernentea', que compreende a maioria das espécies terrestres e parasitas e 'Adenophorea', a qual compreende a maioria de vida livre (marinhas e de água doce) (Chitwood & Chitwood, 1950). Lorenzen (1981) desenvolveu um estudo mais detalhado de Adenophorea, e assim forneceu o primeiro sistema de classificação baseado em princípios cladísticos. Porém, os caracteres morfológicos sozinhos parecem insuficientes para resolver relacionamentos filogenéticos mais complicados (Decraemer & Smol, 2006).

O uso de seqüências de DNA para inferências filogenéticas do filo vem crescendo nos últimos anos (e.g. Nadler, 1992; Aleshin *et al.*, 1998; Blaxter *et al.*, 1998; Kampfer *et al.*, 1998; Litvaitis *et al.*, 2000; De Ley, 2000; Blaxter, 2001; Blaxter, 2004; Foucher *et al.*, 2004; Pegova *et al.*, 2004; De Ley *et al.*, 2005; Nadler, 2006; De Luca *et al.*, 2003; Garcia-Varela *et al.*, 2003; Holterman *et al.*, 2003; Kiontke *et al.*, 2003; Holterman *et al.*, 2006 Sharma *et al.*, 2006). Os resultados de alguns estudos genéticos, com os de De Ley & Blaxter (2002) e Meldal *et al.* (2007), apontam para uma parafilia envolvendo Adenophorea, uma vez que foi evidenciado um ancestral pertencente à Secernentea no agrupamento. Além disso, a Classe Secernentea precisa ser rebaixada um nível taxonômico inferior, já que deriva de um ancestral comum a Axonolaimidae, *Desmolaimus zeelandicus* e *Isolaimium sp.*, e não diretamente do ancestral comum a todos os nematódeos. Na classificação mais recente, De Ley *et al.* (2006) dividem Nematoda em duas classes: Enoplea e Chromadorea, e ainda revela que Adenophorea deve ser tratada como um sinônimo redundante e inapropriado do filo Nematoda.

Na subclasse Chromadoria, uma série de clados surgiram em sucessivas radiações evolutivas. Estes clados são classificados como Ordens distintas, incluindo, por exemplo, as predominantemente marinhas Chromadorida e Desmodorida, bem como as Ordens que também é bem diversa em sedimentos de água doce (Monhysterida) e solos úmidos (Plectida) (De Ley, 2006; De Ley *et al.*, 2006).

Monhysterida forma um grupo monofilético dentro de Chromadoria (Litvaitis *et al.*, 2000). O grupo é estabelecido evolutivamente por apresentar o ovário sempre estendido, característica esta considerada holapomórfica; sua apomorfia, em contraste com Chromadorida, é dada pela ausência de tubos pré-anais nos machos e a ausência de dentes homólogos aos de Chromadorina. No entanto, nenhuma característica morfológica isoladamente pode ser usada para estabelecer a monofilia do grupo, uma vez que tais características também ocorrem em muitos táxons de Chromadorida (Lorenzen, 1994).

Xyalidae representa uma família bem definida cuja maioria dos seus representantes são marinhos. Contudo, as relações entre alguns gêneros e subgêneros propostos permanecem abertas a questionamentos (Nicholas & Trueman, 2002). Junto com Monhysteridae e Sphaerolaimidae constituem a Super-família Monhysteroidea, agrupadas por apresentarem ovário único e estendido (Lorenzen, 1978).

Lorenzen (1981), em sua análise filogenética, estabeleceu que a monofilia de Xyalidae baseada na localização do testículo anterior à esquerda do intestino e o posterior à direita. No entanto, dentro da família a taxonomia e sistemática são bem menos compreendidas. Dois gêneros, *Theristus* Bastian, 1865 e *Daptonema* Cobb, 1920, ambos com muitas espécies descritas, apresentam uma particular dificuldade. *Daptonema* é um dos gêneros que por um tempo foi subgênero de *Theristus*. Neste último incluía-se *Pseudosteineria*, *Trichotheristus*, *Cylindrotheristus*, *Mesotheristus*, *Pseudoheristus* e *Spirotheristus*. Atualmente os quatro últimos são considerados sinônimos de *Daptonema* que representa um gênero distinto (Warwick *et al.*, 1998).

Muitos desses problemas taxonômicos poderiam ser resolvidos com a utilização de técnica moleculares, uma vez que tais ferramentas podem prover identificação de espécimes desconhecidas, servindo como uma fonte para a ordenação filogenética dos grupos em estudo, cuja taxonomia e relações de parentesco são controversas. (Blaxter & Floyd, 2003; Tautz *et al* 2003; Bhadury *et al.*, 2006). As técnicas moleculares podem, ainda, ser usadas como ferramentas para estudos de genética de populações, biogeografia, complexo de espécies (Blaxter, 2001; Monis *et al.*, 2002; Derycke *et al.*, 2008), além de ser considerado um método

em potencial para simplificar e acelerar a avaliação e identificação de Nematoda em estudos de ecologia ou biomonitoramento (Hebert *et al.* 2003; Rogers & Lamshead, 2004).

DNAs ribossomais (rDNA) nucleares têm sido extensivamente estudados, e são regiões genômicas muito escolhidos para estudos de cunho evolutivo por se apresentarem em múltiplas cópias repetidas e intra-especificamente muito conservadas (Bhadury *et al.*, 2006). Por estes motivos, tais regiões do DNA apresentam-se em uma quantidade significativa de alvos nas reações de PCR, quando comparadas com os genes de cópia única (Blaxter, 2001).

As seqüências da subunidade pequena do rDNA (18S) tem confirmado várias controvérsias de hipóteses taxonômicas anteriores, bem como revelado algumas relações inesperadas, alterado substancialmente a dinâmica da sistemática em Nematoda (De Ley, 2006). O 18S é considerado um bom marcador, pois parte do gene é altamente conservada, servindo como ponto de referência para estudos de divergência evolutiva entre táxons, especialmente na diferenciação de espécies (Powers, 2004; Bhadury *et al.*, 2006). Além disso, a maioria das seqüências de nematódeos que estão disponíveis no GenBank para estudos filogenéticos são de genes ribossomais como o 18S (Foucher & Wilson, 2002).

Muitos critérios diferentes podem ser usados para inferir árvores filogenéticas a partir de dados morfológicos ou moleculares. Todos os métodos são baseados em dois processos: um algoritmo para encontrar árvores e um critério para selecionar as melhores baseadas na sua consistência e suporte estatístico (Dorris *et al.*, 1999).

Os métodos mais utilizados para inferências filogenéticas são os Neighbour-joining, que provê uma árvore de evolução mínima baseada em dados transformados em uma matriz de distância e resulta em fenogramas. O método de máxima parcimônia que se baseia na premissa de que a melhor relação evolutiva entre os táxons estudados se estabeleceu pelo menor número de passos evolutivos e os métodos de máxima verossimilhança e inferência bayesiana, que são baseados em modelos de evolução molecular (Avise, 1989; Dorris *et al.*, 1999).

Em estudos anteriores na Bacia do Pina realizado por Neres (2006), foi constatada a presença de uma potencial espécie nova do gênero *Daptonema*. Algumas fêmeas dessa linhagem apresentavam dentro do útero ovos e juvenis em vários estágios de desenvolvimento.

Em zonas tropicais as variações dos fatores ambientais, mesmo sem uma sazonalidade bem marcada, atuam sobre a nematofauna (Heip *et al.*, 1985). Alongi (1987) relata que as

marés, a dessecação e as mudanças de temperatura e de salinidade, associados aos períodos chuvosos, tem se refletido em um forte efeito estacional. Segundo Moens & Vincx (2000a), em estuários, os parâmetros abióticos como salinidade, disponibilidade de alimento e temperatura constituem fatores importantes que influenciam o sucesso das espécies. Vários trabalhos também relataram alterações do desenvolvimento e reprodução em virtude de variações dos fatores abióticos (Heip *et al.*, 1985; Vranken, 1985; Vranken *et al.*, 1988; Moens & Vincx, 2000a; Moens & Vincx, 2000b). A oviparidade, ovoviviparidade, viviparidade e *endotokia matricida* são estratégias de reprodução observadas em Nematoda, entretanto, apenas a primeira é comum para nematódeos marinhos, sendo as demais mais observadas em parasitas (Chitwood & Chitwood, 1974; Lordello & Zem, 1977; Baliadi *et al.*, 2004). Apesar de muitos autores adotarem o termo viviparidade, Chitwood & Chitwood (1974) considera que tais espécies são de fato ovovivíparas e ainda afirma que se a viviparidade, no sentido verdadeiro do termo, realmente existe em Nematoda, terá de ser determinada por pesquisas criteriosas.

Recentemente, muitos artigos científicos têm discutido a natureza das crises taxonômicas e as estratégias potenciais que podem ser utilizadas para acelerar o ritmo da descoberta e classificação da biodiversidade (Blaxter & Floyd, 2003; Mallet & Willmont, 2003; Sites & Marshall, 2003). Muitos dos debates estão centrados nos méritos da morfologia e das seqüências de DNA na delimitação de espécies e estimativa filogenética (Hebert *et al.*, 2003; Lipscomb *et al.*, 2003; Scotland *et al.*, 2003). No entanto, Dayrat (2005) argumenta que a taxonomia tem que ser integrativa, utilizando-se vários tipos de dados (morfológico, genético, ecológico, ciclo biológico) no estudo das espécies.

Dessa forma, considerando as evidências relativas à ocorrência de uma nova espécie de nematódeo estuarino e ainda ser detentora de uma rara estratégia reprodutiva para o Filo, o presente estudo se destina a avaliação taxonômica dessa nova linhagem do gênero *Daptonema*, a revelar as suas relações filogenéticas com outras espécies co-genéricas e com espécies da família, além de descrever e correlacionar sua estratégia reprodutiva com os parâmetros abióticos do ambiente.

2. OBJETIVOS

- Descrever a espécie nova de *Daptonema* com base nos caracteres morfológicos e morfométricos.
- Revelar e analisar as relações filogenéticas de *Daptonema* sp. nov. com alguns representantes da família Xyalidae, por meio de seqüências da região do rDNA 18S.
- Avaliar a estrutura populacional de *Daptonema* sp. nov. do estuário do Pina.
- Descrever a estratégia reprodutiva realizada por *Daptonema* sp. nov., correlacionando com os parâmetros ambientais (microfitobentos, matéria orgânica, temperatura, salinidade).

3. HIPÓTESES

- *Daptonema* sp. nov. forma um grupo monofilético com as espécies geneticamente estudadas do gênero.
- *Daptonema* sp. nov. realiza uma estratégia reprodutiva incomum para os nematódeos marinhos.
- O fenômeno reprodutivo em *Daptonema* sp. nov. está correlacionado com a variação brusca dos fatores ambientais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de Estudo

A Bacia do Pina é uma área estuarina, em plena zona urbana (entre os paralelos 08°04'03 e 08°05'06''S e os meridianos 34°52'16'' e 34°53'58''W) e está localizada na zona litorânea do Estado de Pernambuco, situando-se na parte interna do Porto do Recife-PE (Figura 01). Limita-se, a Norte, pelos bairros do Cabanga e São José, a Sul pelos bairros do Pina e Brasília Teimosa, a Oeste pela confluência dos rios Capibaribe (braço Sul), Tejipió, Jiquió, Jordão e Pina e a Leste, por um dique natural de arrecife de arenito. Possui uma extensão de 3,6 km, aproximadamente, e larguras variáveis de 0,26 a 0,86 km, perfazendo uma área total de 2,02 km² (CONDEPE, 1980 *apud* Feitosa, 1988).

Segundo a classificação de Köppen a área apresenta clima do tipo As', denominado Tropical Quente Úmido, caracterizando-se por dois períodos distintos: uma estação seca (primavera-verão) e uma estação chuvosa (outono-inverno). É um ambiente dinâmico do ponto de vista hidrográfico, cuja salinidade varia entre 0,42 a 37 ‰, a temperatura da água entre 24 e 32 °C e com profundidade máxima de 4,5 m. O regime de marés é semidiurno, com amplitude mesomaré de 2,9 m DHN (Coimbra *et al.*, 1987).

A área já foi estudada por Coimbra *et al.* (1987), Feitosa (1988), Silva-Cunha *et al.* (1990), Silva & Mello (1991), Maia (1995), Nascimento (2001), Castro (2003) e Somerfield *et al.* (2003) sendo constatado um alto índice de poluição orgânica. Os rios Tejipió, Jiquiá, Jordão e Pina, confluentes na referida bacia passam parte dos seus cursos por zonas urbanas sem saneamento ou com saneamento precário, recebendo, assim, descargas de indústrias e efluentes sanitários. Mesmo assim, Feitosa (1988) afirma que a área representa um enorme potencial biológico, sobretudo, em termos de moluscos, crustáceos e peixes, sendo explorada pela população de baixa renda para o seu sustento.



Figura 01: Mapa da Baía do Pina, Recife – Pernambuco, evidenciando o local de coleta (📌).
FONTE: Google Earth (www.earth.google.com).

4.2. Procedimentos de Campo:

As amostras sedimentológicas foram coletadas quinzenalmente, na estação seca (setembro, outubro e novembro de 2006) e na estação chuvosa (maio, junho e julho de 2007), em um ponto fixo no médio litoral (8° 5' 1,8" S e 34° 53' 13,7" W, <http://www.aondefica.com/satelite.asp>), sempre na baixa-mar.

Para obtenção do material biológico, foram amostradas quatro réplicas aleatórias utilizando um cilindro de 5,0 cm de comprimento por 2,5 de diâmetro interno. Todo o material foi fixado com formol salino a 4%.

Com um cilindro de 2,0 cm de comprimento por 1,0 cm de diâmetro interno, foram coletadas três réplicas para análise do microfitebentos. Esse material foi acondicionado em frasco âmbar e mantido refrigerado em um isopor com gelo. A matéria orgânica foi amostrada até 5,0 cm de profundidade, com um cilindro de 20 cm², sendo extraídas três réplicas. A salinidade da água foi determinada através de um refratômetro e a temperatura foi aferida com um termômetro graduado inserido no sedimento por dez minutos.

4.3. Extração de *Daptonema* sp. nov.

A triagem dos indivíduos fixados com formol 4% seguiu a metodologia para extração de Nematoda de Elmegren (1976). A meiofauna foi separada através do peneiramento úmido utilizando peneiras geológicas com intervalos de malhas de 0,044 mm e 0,5 mm. O material retido na peneira de 0,044 mm foi colocado em placa de Petri para centrifugação manual, sendo o sobrenadante vertido em placa de Dolfus, composta de 200 quadrados de 0,25 cm² cada um, e levado ao estereomicroscópio para identificação e triagem de *Daptonema* sp. nov.

4.4. Diafanização e Preparação das lâminas

Para identificação dos estágios sexuais e de desenvolvimento em *Daptonema* sp. nov. foram confeccionadas lâminas permanentes de vidro de acordo com o método descrito por De Grisse (1969), no qual utilizou-se três soluções:

Solução 1: 99% de formol (4%) e 1% de glicerina.

Solução 2: 95% de etanol e 5% de glicerina.

Solução 3: 50% de etanol e 50% de glicerina

Os indivíduos selecionados foram inseridos em cadinho contendo solução 1. O cadinho foi posto em repouso em dessecador contendo etanol por um período de 24 horas (para que todo o formol presente nos animais evaporasse, sendo substituído pelo etanol presente no dessecador). Posteriormente, foi introduzida a solução 2, três vezes a cada duas horas, à 35°C. No final desse processo colocou-se a solução 3, na qual os espécimes ficaram depositados até a montagem das lâminas.

Para a melhor disposição na lâmina foram utilizados cerca de dez animais por unidade. As lâminas foram previamente lavadas com álcool a 70%, para eliminação da gordura presente no vidro e preparadas com dois círculos de parafina, contendo uma gota de glicerina no centro de cada um deles. Os animais foram dispostos na glicerina e recobertos por uma lamínula. Por aquecimento, a parafina foi derretida e a lamínula aderida à lâmina através do resfriamento da parafina.

As lâminas foram levadas a microscópio óptico OLYMPUS CX31 para a identificação do estágio de desenvolvimento, sexo e maturidade (juvenis, machos, fêmeas não grávidas e fêmeas grávidas). Destes, doze indivíduos foram selecionados (1 holótipo, 1 alótipo, 5 parátipos machos e 5 parátipos fêmeas). As lâminas foram remontadas de modo que cada indivíduo ficasse em lâminas distintas.

4.5. Identificação dos Nematoda

Os doze indivíduos de *Daptonema* sp. nov. (seis machos e seis fêmeas) foram desenhados sob microscópio óptico OLYMPUS CX31, com câmara-clara. Após a elaboração dos desenhos, foram obtidas as medidas corpóreas usando um curvímetro analógico. O registro da espécie nova foi feito através do desenho manual e fotografia em câmara digital OLYMPUS-C5050 acoplada ao microscópio.

A situação taxonômica de *Daptonema* sp. nov. está baseada em De Ley *et. al.* (2006) e as diagnoses da família e do gênero seguem Coomans & Eyualem-Abebe (2006). Para a identificação da nova espécie foram usadas descrições originais cedidas ao laboratório de Meiofauna da UFPE pelo Departamento de Biologia Marinha da Universidade de Gent e também disponibilizadas pelo banco de dados on-line www.nemys.ugent.be.

Para a identificação a nível específico, foram confeccionadas tabelas com as medições corporais dos espécimes, utilizando-se as seguintes abreviações:

L: comprimento total do corpo

mbd: diâmetro máximo do corpo

ph: comprimento total da faringe

ph bd: diâmetro do esôfago

t: comprimento total da cauda

abd: diâmetro anal

b cav: comprimento da cavidade bucal

hd: diâmetro cefálico

exc p: localização do poro excretor em relação à região anterior

exc pbd: diâmetro na região do poro excretor

n ring: localização do anel nervoso em relação a região anterior

n ringbd: diâmetro na região do anel nervoso

Amph%: porcentagem do anfídio em relação ao diâmetro correspondente

amph pos: distância do anfídio a extremidade anterior do corpo

ols: comprimento das setas labiais externas

cs: comprimento das setas cefálicas

ts: comprimento das setas caudais

spic: comprimento da espícula ao longo do arco

gub: comprimento do gubernáculo

V%: posição da vulva em relação à extremidade anterior do corpo, expressa como porcentagem do comprimento total.

vbd: Diâmetro na região da vulva

a: comprimento total do corpo/diâmetro máximo (L/mbd).

b: comprimento total do corpo /comprimento total da faringe (L/ph).

c: comprimento total do corpo/ comprimento total da cauda (L/t).

As abreviações para as regiões do corpo estudadas foram baseadas em Coomans (1979) além daquelas criadas para a espécie. Todas as medidas foram expressas em micrômetros (μm).

4.6. Microscopia eletrônica de varredura

Os espécimes foram enviados para Laboratório de Nematologia da Universidade de Gent, Bélgica, onde a técnica descrita abaixo foi empregada para obtenção de fotografias.

A metodologia consiste primeiramente na abertura das lâminas e transferência de pelo menos 5 nematódeos para um cadinho contendo uma gota de glicerina pura. Uma gota de água destilada foi adicionada a cada meia hora até que o cadinho estivesse cerca de $\frac{3}{4}$ de seu conteúdo com a solução. Após uma manhã de repouso, foi tomado outro cadinho previamente limpo contendo 4 gotas de água destilada no qual os nematódeos foram transferidos com um auxílio de uma pinça de um cadinho para o outro.

Um tratamento ultra-sônico foi utilizado para retirada de possíveis impurezas ou partículas que pudessem estar presentes na cobertura da cutícula dos Nematoda durante 10 minutos. Os Nematoda foram introduzidos numa armação ou bloco com etanol (25%), seguindo um processo gradual de desidratação.

No segundo dia a desidratação foi completada durante o dia durante 2 horas com a utilização com soluções de etanol de 50%, 75%, 95% e 100%. Logo após, os Nematoda foram deixados em repouso na solução de etanol a 100% durante uma noite.

Os espécimes foram montados em um bloco com fibras de vidro, sendo estes transferidos em um tubo, no qual a região da cabeça era colocada sobre as fibras de vidro a fim de se visualizar a região bucal.

Um pequeno tubo contendo os Nematoda foi impregnado com ouro para posterior leitura e visualização das estruturas externas em microscópio eletrônico de varredura.

4.7. Análise Molecular

Para a análise molecular, foi coletada uma amostra, sendo esta fixada em álcool 70%. Dois indivíduos de *Daptonema* sp. nov. foram triados. Os espécimes foram depositados em tubos Eppendorfs com álcool 70% e enviados para Universidade da Ghent – Bélgica, onde as etapas de extração de DNA, PCR e sequenciamento foram efetuadas.

4.7.1. Extração de DNA, PCR e Sequenciamento

A extração do DNA e a amplificação da região 18S foram realizadas segundo o protocolo disponibilizado por De Ley *et. al.* (2005).

Os espécimes foram colocados em uma lâmina com 20 µl de “Worm Lysis Buffer - WLB” (5ml de 0,5M KCl; 5ml de 0,1M Tris HCl pH 8,3; 0,5ml de 0,25M MgCl₂; 0,225ml de NP40 e 0,225ml de Tween 20), onde foram cortados em pedaços, com um bisturi estéril. Esses fragmentos foram pipetados para tubos eppendorf contendo 2 µl de proteinase K (60µg ml⁻¹). Após a agitação por vortex, os tubos foram colocados no nitrogênio líquido por 10 minutos, e em seguida incubados no termociclador durante 1 hora a 65°C e 10 minutos a 95°C. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 3 minutos e estocados no freezer a -20°C.

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a amplificação de fragmentos de 18S foi realizada utilizando-se os seguintes primers: Foward: 5'-CGCAAATTACCCACTCTC-3' Reverse: 5'-AGTCAAATTAAGCCGCAG-3'.

Para cada espécime foi preparada a PCR master mix contendo 18,2 µl de DDH₂O, 2,5 µl de PCR tampão 10x, 0,75 µl de 10 mM DNTPs, 0,4 µl de 25 µM primer (18S Forward), 0,4 µl de 25 µM primer (18S Reverse), 0,25 µl de Taq Polimerase e 2,5 µl de DNA da amostra. Em seguida, os tubos foram transferidos para o termociclador para seguir o seguinte programa: 1 ciclo a 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial); 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação do DNA), 55°C por 30 segundos (anelamento do Primer), 72°C por 1 minuto (extensão), e 72°C por 7 minutos (extensão final); e finalmente, 1 ciclo de 4°C para repouso.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% (0,9 µl de brometo de etídio em 20 ml de gel de agarose), onde 1µl do tampão de amostra e 5 µl do produto da PCR

foram homogeneizados e colocados em cada poço do gel. O marcador de peso molecular (5 µl, 1kb DNA ladder, PROMEGA Corp, Madison, WI, USA) foi adicionado no primeiro poço.

Os procedimentos de sequenciamento foram desenvolvidos conforme o protocolo do kit BigDye V3.1, utilizando o seqüenciador automatizado Applied Biosystems – 3130x/Genetic Analyzer – 16 capilares.

A primeira etapa consiste na limpeza do produto da PCR, onde para cada reação foram pipetados 5 µl do DNA amplificado e 1 µl de Exo-SAP-it para um tubo Eppendorf. Esse material foi misturado por vortex, rapidamente centrifugado e, posteriormente, incubado por 15 min a 37°C e 15 min a 85°C para inativar proteínas.

A reação de sequenciamento se estabeleceu pela elaboração de uma solução contendo: 4 µl de *Terminator Ready Reaction Mix*, 1,25 µl do produto da PCR purificado, 0,5 µl dos Primers (5 µM) e água ultra pura para um volume final de 10 µl. Em seguida, o tubo foi transferido para um termociclador programado para rodar 25 ciclos de 30 segundos a 6°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C.

Após o término dos ciclos, o material foi precipitado adicionando-se 26 µl de uma solução contendo EtOH 95% + 0,12M NaAc. Tal solução foi deixada em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente a solução foi centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm (4°C), foi removido o sobrenadante e adicionado 125 µl de etanol 70% em cada tubo. Tal solução foi misturada por vortex e centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm (4°C). Por fim, removeu-se novamente o sobrenadante e deixou-se secar por 15 minutos no vácuo.

A etapa seguinte consistiu na adição de 10 µl Hi-Di-formaldeído. A solução foi misturada em vortex e transferida de cada tubo para uma placa com 96 poços. A placa foi devidamente aquecida por 2 minutos a 95°C por 2 minutos. Posteriormente, inseriu-se a placa imediatamente no gelo, transferindo-a para o seqüenciador.

4.7.2. Distância genética e relações filogenéticas

A seqüência de *Daptonema* sp. nov. obtida foi depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com número de acesso EF436228. Seqüências de 18S de outros representantes da família Xyalidae foram utilizadas do banco de dados (*Daptonema hirsutum*, *D. normandicum*, *D. oxycerca*, *D. procerum*, *D. setosum*, *Daptonema* sp. 2005, *Daptonema* sp. 2006, *Metadesmolaimus* sp. 2005, *Theristus acer*, *T. agilis*), bem como as de

Sphaerolaimus hirsutus (representante da mesma Superfamília a qual pertence Xyalidae), *Monhystera riemanni* (representante da mesma Ordem de Xyalidae, porém de outra Superfamília) e *Spirinia parasitifera* (representante da Ordem Chromadorida, a qual Xyalidae não faz parte) que foram usadas como grupos externos (Tabela 01).

Tabela 01: Espécies de Xyalidae e grupo externo com os respectivos número de bases (pb) e número de acesso. Fonte: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Espécies	Nº de bases	Nº de acesso
<i>Daptonema hirsutum</i>	1405	AY854223
<i>Daptonema hirsutum</i>	926	AM236231
<i>Daptonema hirsutum</i>	345	DQ394801
<i>Daptonema hirsutum</i>	345	DQ394784
<i>Daptonema</i> sp. nov.	1741	EF436228
<i>Daptonema normandicum</i>	1405	AY854224
<i>Daptonema normandicum</i>	345	DQ394759
<i>Daptonema oxycerca</i>	1404	AY854225
<i>Daptonema oxycerca</i>	344	DQ394760
<i>Daptonema procerum</i>	1748	AF047889
<i>Daptonema setosum</i>	1710	AM234045
<i>Daptonema setosum</i>	1405	AY854226
<i>Daptonema setosum</i>	345	DQ394768
<i>Daptonema setosum</i>	345	DQ394744
<i>Daptonema</i> sp. PB-2005	926	AM234624
<i>Daptonema</i> sp. PB-2006	345	DQ394782
<i>Metadesmolaimus</i> sp. PDL-2005	1839	AJ966491
<i>Theristus acer</i>	1748	AJ966505
<i>Theristus acer</i>	929	AM234627
<i>Theristus acer</i>	349	DQ394754
<i>Theristus acer</i>	347	DQ394794
<i>Theristus agilis</i>	1722	AY284695
<i>Theristus agilis</i>	1609	AY284694
<i>Theristus agilis</i>	1354	AY284693
<i>Theristus</i> sp. PB-2006	347	DQ394773
<i>Sphaerolaimus hirsutus</i>	1249	AM234622
<i>Monhystera riemanni</i>	1710	AY593938
<i>Spirinia parasitifera</i>	926	AM236044

As 28 seqüências foram alinhadas no BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999), utilizado o alinhamento múltiplo ClustalW. Para tal, foram adotados os valores de 10 para abertura de um *Gap* e 0,1 para a extensão de um *Gap* (Hall, 2001). Os caracteres foram designados como não-ordenados e com pesos equivalentes. Após o alinhamento, as extremidades das seqüências foram cortadas, tanto da região inicial quanto da final, de modo a evitar o acúmulo de *gaps* entre os sítios analisáveis. Tal iniciativa também foi conduzida a fim de facilitar o tratamento das seqüências pelos métodos utilizados para a geração das hipóteses de relacionando genético e filogenético.

As seqüências alinhadas foram exportadas como um arquivo Nexus e analisadas pelos métodos de máxima parcimônia (MP/sem pesagem, Fitch, 1977), neighbor-joining (NJ – *General time reversible*; Saitou & Nei 1987) e inferência bayesiana [IB (nst= 6; GTR + Γ); Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003).

A análise de parcimônia foi conduzida por busca heurística e todos os caracteres foram designados como não-ordenados, com o peso equivalente e otimizados nas modalidades Acctran e Deltran. A adição das OTUs – *Operational Taxonomic Units* - foi randômica e a sua permuta por meio do algoritmo *tree-bisection-reconnection* (TBR). Foi estabelecido um número máximo (*MaxTrees*) de 100.000 árvores com 5.000 replicações aleatórias, sendo ainda determinado o consenso estrito das árvores geradas.

Para ambas as análises (NJ e MP) foram computadas, à partir de 10.000 pseudoréplicas, os índices de suporte dos ramos de *Bootstrap* e *Jacknife*, seguindo a regra de consistência dos ramos igual ou maior ao percentil 50, por meio da opção de busca *fast stepwise addition*. A adição das OTUs também foi randômica e a sua permuta igualmente realizada por meio do algoritmo *tree-bisection-reconnection*. Todos os procedimentos supramencionados foram desenvolvidos por meio do uso do software Paup* v.4.0b10 (Swofford, 2000).

A análise de inferência bayesiana foi conduzida por meio do uso do software MrBayes v. 3.1.1 (Huelsenbeck et al. 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003) em 1 milhão de gerações de 4 cadeias de Markov. As probabilidades posteriores dos ramos foram obtidas à partir do consenso de todo o conjunto de gerações.

4.8. Material Abiótico

A fim de correlacionar a estratégia reprodutiva da espécie aferiu-se alguns parâmetros ambientais, a saber:

Microfitobentos: as amostras de microfitobentos foram estocadas no freezer a -20 °C até o dia do processamento. Os procedimentos para obtenção da clorofila *a* seguiu o método modificado de Colijn & Dijkema (1981). Os pigmentos foram extraídos com 15 ml de acetona (100%), a 5°C, em 18h na ausência de luz. A clorofila-a foi determinada com um espectrofotômetro usando as equações de Lorenzen (1967). Dois comprimentos de onda (665 e 750 nm) foram utilizados antes e depois da acidificação com 50µm de HCl (0,05N). Valores de clorofila-a foram expressos em µg/cm².

Matéria Orgânica: as amostras para análise do teor orgânico foram estocadas no freezer a -20 °C até o dia do processamento. Para a sua determinação seguiu-se o método citado por Wetzel e Likens (1990). As amostras foram colocadas em estufa a 70°C por 48h, em seguida, foram pesadas e levadas ao forno mufla por 4h. Após este procedimento, o material foi repesado e a diferença de peso representou a quantidade de matéria orgânica que volatilizou.

Temperatura do sedimento e a Salinidade da água: após leitura em campo, os dados foram integrados em tabelas para as posteriores correlações.

Os dados de pluviosidade foram obtidos do site do Instituto Nacional de Meteorologia (www.inmet.com.br), que foram determinados pela soma da precipitação (em milímetros) nos sete dias que antecederam as coletas.

4.9. Análise dos Dados

4.9.1. Densidade

A densidade foi calculada para o número de indivíduos por cm² (n. ind/cm²).

4.9.2. Estrutura da Comunidade

Foram determinadas as categorias populacionais de *Daptonema* sp.nov., identificando os estágios de desenvolvimento sexual em: fêmeas não grávidas, fêmeas grávidas, machos e juvenis.

4.9.3. Tratamento estatístico

O teste X² (Qui-quadrado) foi aplicado a fim de testar se as categorias populacionais (machos, fêmeas e juvenis) de *Daptonema* sp.nov. ocorreram, respectivamente, nas proporções esperadas de 1:1:2, conforme proposto por Manachini (1997).

As correlações dos fatores ambientais com a densidade de fêmeas grávidas foram efetuadas utilizando o coeficiente de Spearman. Foram consideradas significativas as correlações cujo $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Situação Taxonômica

Filo NEMATODA

Classe CHROMADOREA

Subclasse CHROMADORIA

Order MONHYSTERIDA Filipjev, 1929.

Suborder MONHYSTERINA De Coninck & Schuurmans Stekhoven, 1933.

Superfamily SPHAEROLAIMOIDEA Filipjev, 1918.

Family XYALIDAE Chitwood, 1951.

Genus *Daptonema* Cobb, 1920.

Espécie *Daptonema* sp. nov.

5.2. Diagnose da família Xyalidae Chitwood, 1951:

Apresentam tipicamente cutícula transversalmente estriada. A cabeça compõe-se 6 setas labiais externas e 4 setas cefálicas dispostas em um mesmo ciclo, com as cefálicas menores ou do mesmo tamanho que as labiais. Frequentemente possuem setas cefálicas adicionais e ocasionalmente oito grupos de setas sub-cefálicas. O estoma é geralmente em forma de funil, com o tecido faringiano envolvendo-o completamente ou só a sua base. Os machos podem possuir um ou dois testículos: o anterior a esquerda do intestino e o posterior, quando presente, à direita. As fêmeas apresentam apenas um ovário anterior à esquerda do intestino. A maioria dos representantes é marinho, mas algumas espécies podem ser de água doce ou terrestre.

5.3. Diagnose do gênero *Daptonema* Cobb, 1920:

Daptonema spp. são o xialídeos de tamanho pequeno a médio e corpo robusto. A cutícula é estriada com setas ao longo do corpo. A região labial apresenta de 10 ou 12 setas, que podem ser segmentadas quando longas. Cavidade bucal com o quelostômio amplo e arredondado, e estoma em forma de funil. A glândula ventral é ausente ou de difícil visualização. Geralmente possuem dois testículos, o anterior à esquerda do intestino e o posterior à direita. A espícula mede aproximadamente um diâmetro anal de comprimento, em sua maioria, e é fortemente curvada. O gubernáculo é formado por duas peças laterais, podendo possuir apófise dorso-caudal. O ovário é anterior e à esquerda do intestino. Um saco uterino pós ou pré-vulvar pode estar presente. A cauda é cilíndrica e em sua porção posterior pode apresentar duas (raramente três ou quatro) setas terminais. A maioria dos representantes são marinhos.

5.4. Lista de Espécies Válidas

A lista de espécies válidas está baseada em Lorenzen (1977) e Nemys (Deprez *et al.*, 2005). Foram registradas 113 espécies válidas de *Daptonema*, apresentadas a seguir em ordem alfabética (Tabela 02).

Tabela 02. Espécies válidas de *Daptonema* segundo o banco de dados do NeMys e Lorenzen (1977).

<i>D. acanthospiculum</i> (Allgén, 1959)	<i>D. miamiense</i> (Hopper, 1969)
<i>D. acidus</i> (Vitiello, 1971)	<i>D. longissimecaudatum</i> (Kreis, 1935)
<i>D. acrilabiatus</i> (Deconinck & Stekhoven, 1933)	<i>D. maeoticum</i> (Filipjev, 1922)
<i>D. adiecta</i> (Schulz, 1932)	<i>D. marylynicus</i> (Timm, 1952)
<i>D. aegypticum</i> (Gerlach, 1964)	<i>D. microspiculum</i> (Gerlach, 1953)
<i>D. albigensis</i> (Riemann, 1964)	<i>D. nannospiculus</i> (Tchesunov, 1980)
<i>D. alternum</i> (Wieser, 1956)	<i>D. nanum</i> (Lorenzen, 1972)
<i>D. angulatum</i> (Stekhoven, 1950)	<i>D. naviculivorus</i> (Cobb, 1930)
<i>D. arcticus</i> (Steiner, 1916)	<i>D. normadicum</i> (De Man, 1890)
<i>D. articulatum</i> (Wieser, 1956)	<i>D. notoistospiculoides</i> (Allgén, 1959)
<i>D. australis</i> (Allgén, 1951)	<i>D. notosetosus</i> (Allgén, 1959)
<i>D. bathylaimus</i> (Allgén, 1959)	<i>D. osadchikae</i> (Tchesunov, 1980)
<i>D. biggi</i> (Gerlach, 1965)	<i>D. ostentator</i> (Wieser & Hopper 1967)
<i>D. buelkiensis</i> (Schulz, 1932)	<i>D. oxycerca</i> (De Man, 1888)
<i>D. buetschilii</i> (Bresslau & Stekhoven, 1935)	<i>D. papillatus</i> (Murphy, 1965)
<i>D. calcaneus</i> (Stekhoven, 1950)	<i>D. parabutschlii</i> (Timm, 1961)
<i>D. calceolatum</i> (De Coninck & Stekhoven, 1933)	<i>D. paradonsi</i> (Gerlach & Riemann, 1973)
<i>D. circulum</i> (Vitiello, 1971)	<i>D. paraelaboratum</i> (Vitiello, 1971)

- D. circumscriptum* (Wieser, 1959)
D. clavicaudatum (Gerlach, 1953)
D. conicum (Filipjev, 1922)
D. curticauda (Tchesunov, 1980)
D. curvatus (Gerlach, 1956)
D. curvispiculum (Gerlach, 1953)
D. curvispiculum (Gerlach, 1953)
D. cuspidospiculum (Allgén, 1932)
D. dentatum (Wieser, 1956)
D. divertens (Boucher & Helléquet, 1977)
D. donsi (Allgen, 1948)
D. dubium (Butschli, 1873)
D. ecphygmaticum (Wieser, 1959)
D. elaboratum (Chitwood, 1951)
D. elegans (Kreis, 1929)
D. erectum (Wieser and Hopper, 1967)
D. exutum (Wieser, 1956)
D. fallax (Lorenzen, 1972)
D. filispiculum (Allgén, 1932)
D. fimbriatus (Wieser, 1956)
D. fissidens (Cobb, 1920)
D. fistulatum (Wieser and Hopper 1967)
D. flagellicaudata (Lorenzen, 1973)
D. furcatum (Juario, 1974)
D. grahami (Allgén, 1959)
D. groenlandicum (Ditlevsen, 1928)
D. gyrophorum (Wieser, 1956)
D. hirsutum (Vitiello, 1967)
D. intermedius (Tchesunov, 1980)
D. invagiferoum (Platt, 1973)
D. karabugasensis (Tchesunov, 1980)
D. kornoeense (Allgen, 1929)
D. lata (Steiner, ?)
D. laxum (Wieser, 1956)
D. leptogastrelloides (Travizi, Vidakovic, 1997)
D. leviculus (Lorenzen, 1972)
D. levis (Lorenzen, 1973)
D. litoralis (Allgén, 1929)
D. longicaudatum (Timm, 1963)
D. paraelaboratus (Timm, 1952)
D. paratortum (Vitiello, 1971)
D. paroistospiculoides (Allgén, 1959)
D. planiere (Vitiello, 1971)
D. polaris (Timm, 1963)
D. pratti (Murphy & Canaris, 1964)
D. procerum (Gerlach, 1951)
D. prominens (Vitiello 1971)
D. proprium (Lorenzen, 1972)
D. psammooides (Warwick, 1970)
D. pseudotortum (Vitiello, 1971)
D. resimus (Murphy, 1966)
D. resinum (Wieser, 1959)
D. riemmani (Platt, 1973)
D. robustus (Tchesunov, 1980)
D. rusticum (Kreis, 1929)
D. sanctimarteni (Timm, 1957)
D. sentiens (Cobb, 1914)
D. septentrionalis (Cobb, 1914)
D. setifer (Gerlach, 1952)
D. setosum (Butschli, 1874)
D. simplex (Allgén, 1959)
D. sinuosus (Wieser, 1959)
D. sphaerolaimoides (Schulz, 1932)
D. spirum (Gerlach, 1959)
D. stylosum (Lorenzen, 1973)
D. stylosus (Lorenzen, 1973)
D. svalbardense (Gerlach, 1965)
D. tortuosum (Timm, 1961)
D. trabeculosum (Schneider 1906)
D. trecuspidatum (Wieser, 1959)
D. trecuspidatus (Wieser, 1959)
D. trichinus (Gerlach, 1956)
D. trichuroides (Meyl, 1955)
D. uncinatus (Wieser, 1959)
D. vicinum (Riemann, 1966)
D. williamsi (Vincx and Coomans, 1983)
D. xyaliforme (Wieser and Hopper, 1967)
-

5.5. Descrição de *Daptonema* sp. nov.

Material estudado: 6 machos; 6 fêmeas.

Localização: Bacia do Pina (Recife - Pernambuco/Brazil), mediolitoral, sedimento lamoso .

Holótipo:

O corpo é alongado e não muito afilado anteriormente. A cutícula é transversalmente estriada, com estriações relativamente finas (Figura 02 - B e 05 - B). Apresentam setas somáticas curtas e distribuídas ao longo da superfície do corpo, no entanto são mais concentradas na região faringiana e caudal (Figura 02 - A e B).

A cabeça é rodeada por seis lábios distintos, cada um com uma papila (Figura 05 - A). Possuem 12 setas cefálicas em 6 pares e um ciclo de setas subcefálicas (Figura 02 - B). A cavidade bucal é em forma de funil, com um anel delimitando o início do estoma da parte anterior da cavidade (Figura 04 - D).

O anfídio é circular, pequeno e está localizado próximo a extremidade anterior do corpo (Figura 02 - B; 04 - C). O poro excretor está situado anterior ao anel nervoso (Figura 02 - B), que está envolvendo a faringe em sua região mediana, aproximadamente. A cárdia apresenta uma forma irregular e está parcialmente inserida no intestino (Figura 02 - F). O tecido faringiano envolve todo o estoma (Figura 04 - D). A glândula ventral não foi visualizada.

O testículo é único, estende-se para região anterior do corpo e está situado à esquerda do intestino (Figura 02 - A). Foram visualizadas 5 glândulas ejaculatórias (Figura 02 - C). As espículas estão dispostas quase em linha reta e apresentam uma ligeira cefalização proximal (Figura 02 - E). O gubernáculo é simples, sem apófise e com a parte distal alargada em forma de asa (Figura 05 - D). Ele envolve a espícula em sua porção distal e corresponde a 1/5 do seu comprimento (Figura 02 - E). Apresentam três glândulas pós-cloacais (Figura 02 - D). A cauda é cônico-cilíndrica, com duas setas terminais (Figura 02 - D e 05 - C). Foram observadas 4 pares de setas em forma de espinho próximas ao início da porção cilíndrica da cauda (Figura 02 - D).

Tabela 03: Valor médio das medidas corpóreas (com valores de desvio padrão) de sete machos de *Daptonema* sp. nov.. Ver lista de abreviações em materiais e métodos, página 24.

Medidas (µm)	Machos
L	1259 (114,1)
Ph	197,2 (15,3)
mbd	66,4 (4,3)
t	194,7 (19,1)
a	19 (2,2)
b	6,4 (0,3)
c	6,5 (0,2)
ols	3 (0)
cs	1,8 (0)
ph bd	58,4 (5,4)
b cav	10,9 (0,4)
hd	23,5 (1,9)
exc p	34,2 (7,2)
exc pbd	37,6 (2,7)
n ring	89,8 (10,6)
n ringbd	48,2 (3,7)
Amph%	20,5 (3)
amph pos	12,2 (1,3)
abd	43,1 (3,3)
spic	28,8 (1,5)
gub	7,2 (0,6)
cy lind %	33,2 (3,9)
ts	8,8 (1,4)

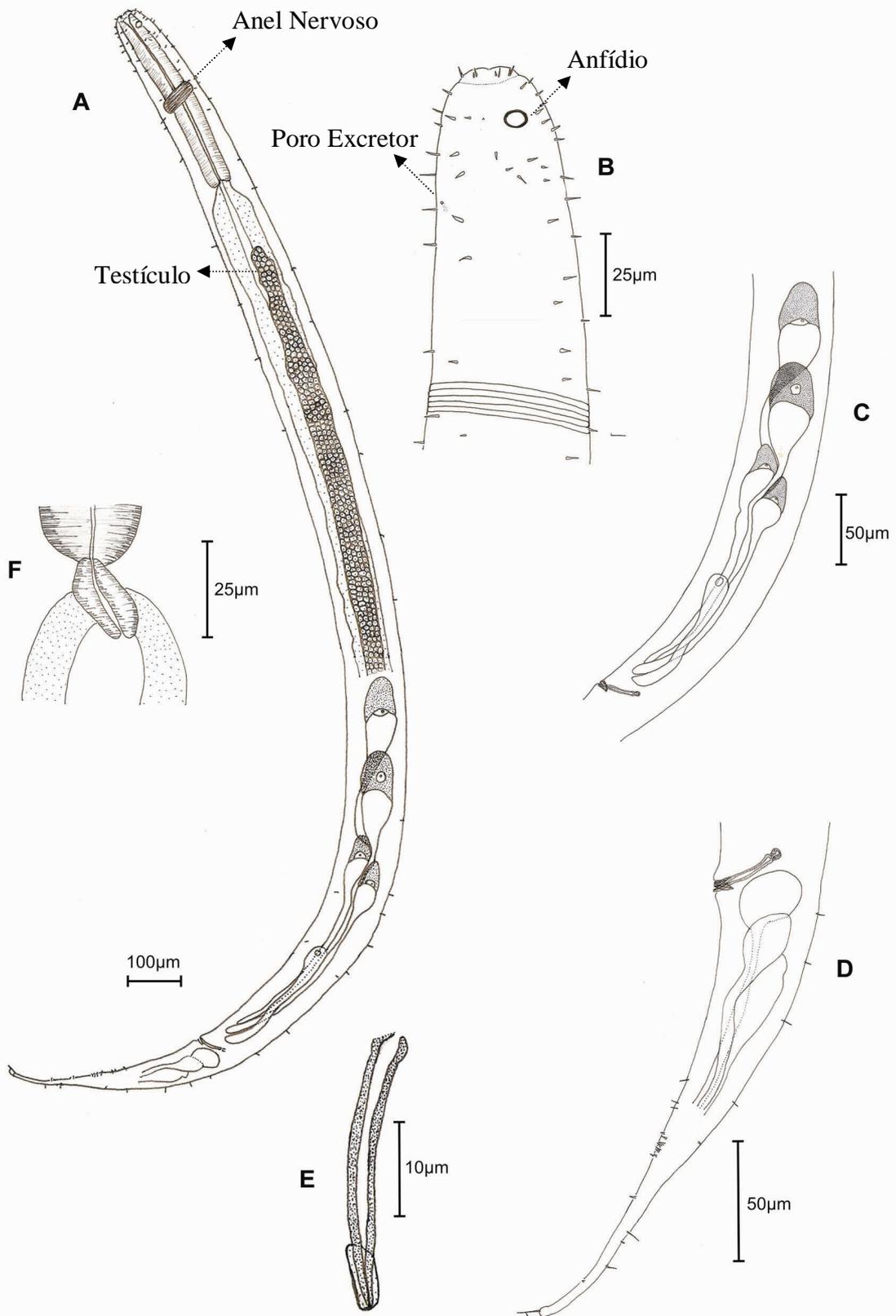


Figura 02: Desenho de *Daptonema* sp. nov. holótipo: A – Visão geral; B - Região cefálica; C- Glândulas ejaculatórias; D - Cauda; E - Aparato copulatório (parátipo) e F - Córdia.

Alótipo:

A fêmea apresenta características similares às do macho. O dimorfismo sexual está baseado apenas no tamanho e proporção do anfídio em relação ao diâmetro na região, que é maior nos machos (Figura 03).

O poro excretor é visível entre a extremidade anterior do corpo e o anel nervoso, que se encontra aproximadamente na porção mediana da faringe. A glândula ventral também não foi visualizada.

O ovário está à esquerda do intestino e se estende para região anterior do corpo. Uma espermateca foi observada no segundo terço do corpo. A vulva localiza-se próximo ao ânus (Figura 03 - A).

Detectou-se a ovoviviparidade. As fêmeas que possuíam ovos e juvenis em diversos estágios apresentaram tamanho e diâmetro corporal maiores que os das fêmeas imaturas.

Tabela 04: Valor médio das medidas corpóreas (com valores de desvio padrão) de sete fêmeas de *Daptonema* sp. nov.. Ver lista de abreviações em materiais e métodos, página 24.

Medidas (μm)	Fêmeas
L	1361 (114,7)
Ph	205 (14,7)
mbd	85,5 (12,6)
t	229,2 (20,4)
a	16,1 (1,3)
b	6,6 (0,3)
c	5,9 (0,2)
V%	73,9 (0,9)
ols	3,5 (0,2)
cs	2 (0,3)
ph bd	69,8 (10,3)
b cav	13,4 (0,6)
hd	30,5 (2)
exc p	37,1 (2,6)
exc pbd	47 (3,4)
n ring	100,4 (17,9)
n ringbd	59,4 (8,4)
Amph%	12,1 (1,8)
amph pos	13,2 (1,6)
abd	54,2 (6)
vbd	72,4 (9,8)
cylind %	36,3 (2,3)
ts	8,8 (1,4)

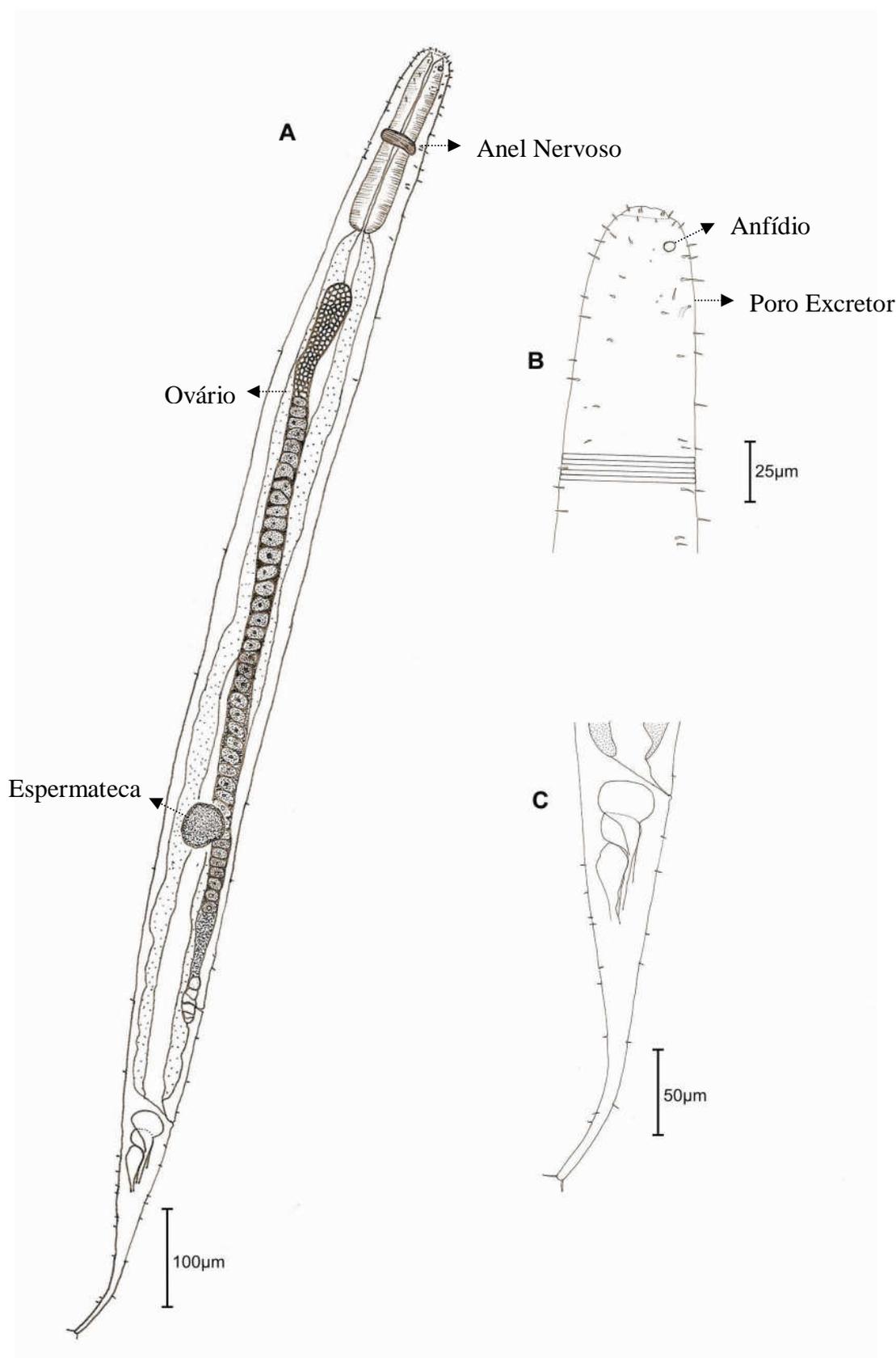


Figura 03: Desenho de *Daptonema* sp. nov. alótipo: A – Visão geral; B - Região cefálica; C- Cauda.



Figura 04: Fotos de *Daptonema* sp. nov. Holótipo: A – Visão geral; B – Região anterior; C – Anfídeo; D; Cavity bucal; E – Cauda; F – Espícula. Alótipo: G – Visão geral.

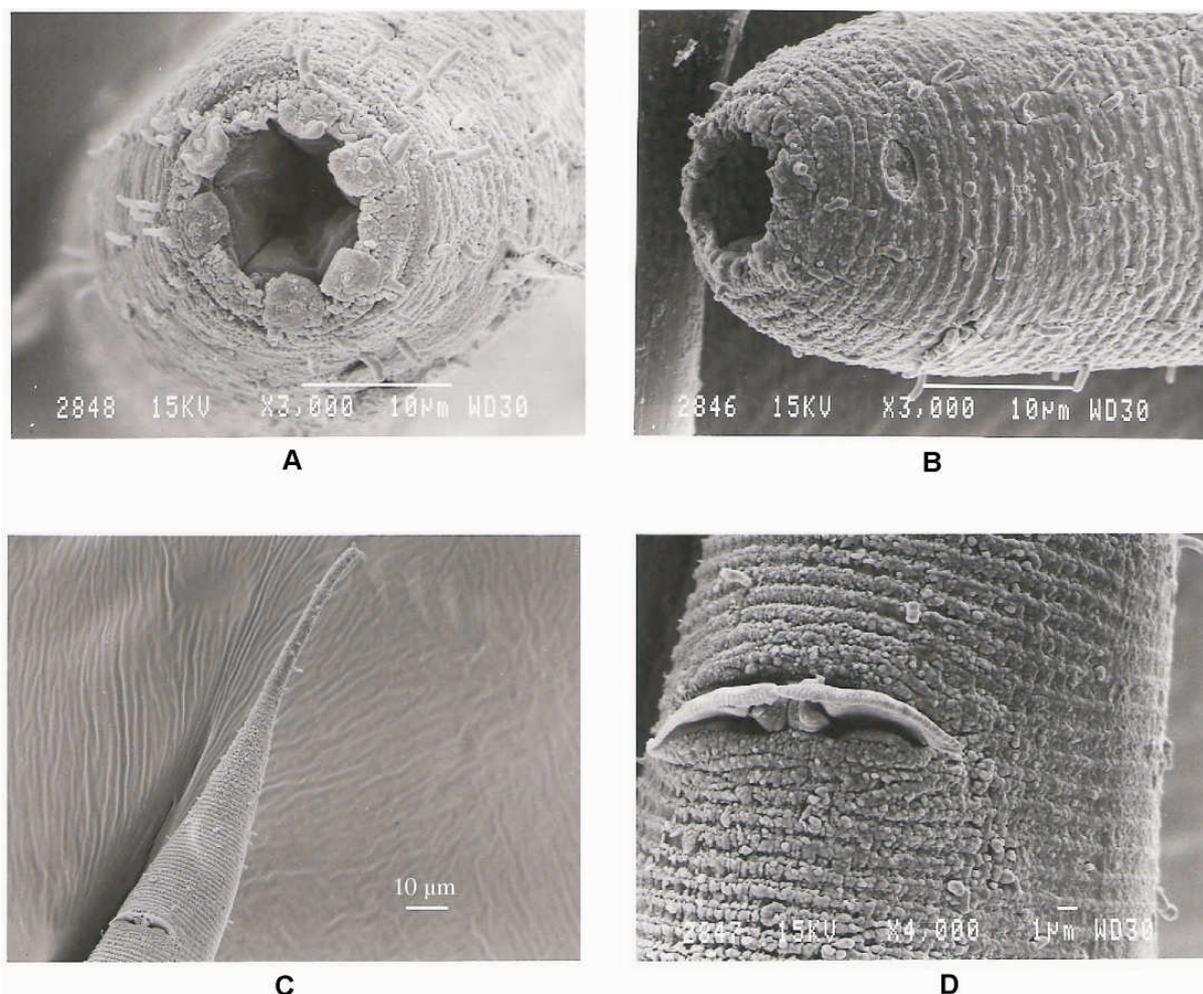


Figura 05: Fotos de *Daptonema* sp. nov. macho: A – Região anterior; B – Anfídio; C – Cauda; D – Estrutura externa do gubernáculo.

5.6. Distância genética e relações filogenéticas

5.6.1. Análise de Distância Genética (Neighbor-joining – NJ)

A topologia do neighbor-joining revelou a existência de dois agrupamentos genéticos. O primeiro caracteriza a linhagem do gênero *Theristus* e *Daptonema normandicum*. Esta última é geneticamente mais próxima de *Theristus agilis*. Tal agrupamento surgiu como uma linhagem genética irmã a outro agrupamento que reúne *Theristus acer* e *Theristus* sp (Figura 06).

O segundo agrupamento evidencia a unidade genética das demais espécies de *Daptonema* + *Metadesmolaimus* sp. Esta última aparecendo como uma linhagem genética irmã de *Daptonema hirsutum*, *D. setosum* + *Daptonema* sp (AM234624 e DQ394782). (Figura 06).

Daptonema hirsutum e *D. setosum* apresentaram seqüências de 18S idênticas, com seus valores de distância genética iguais a zero (Tabela 05). *D. oxicerca* + *D. procerum* são linhagens geneticamente próximas com o índice de distância genético variando de 0,002 a 0,003 (Tabela 05).

A análise de NJ ainda revelou que a distância genética do gene 18S entre espécies de *Daptonema* variou de 0,2 a 15,1%, porém não houve variação intra-específica (Tabela 05). Entre *Daptonema* e *Theristus* a menor distância genética registrada foi de 0,04 (4%) e a maior foi de 0,2 (20%). Em *Theristus* foi detectado variação intra-específica (até 0,01), tanto em *T. agilis* quanto em *T. acer* (Tabela 05).

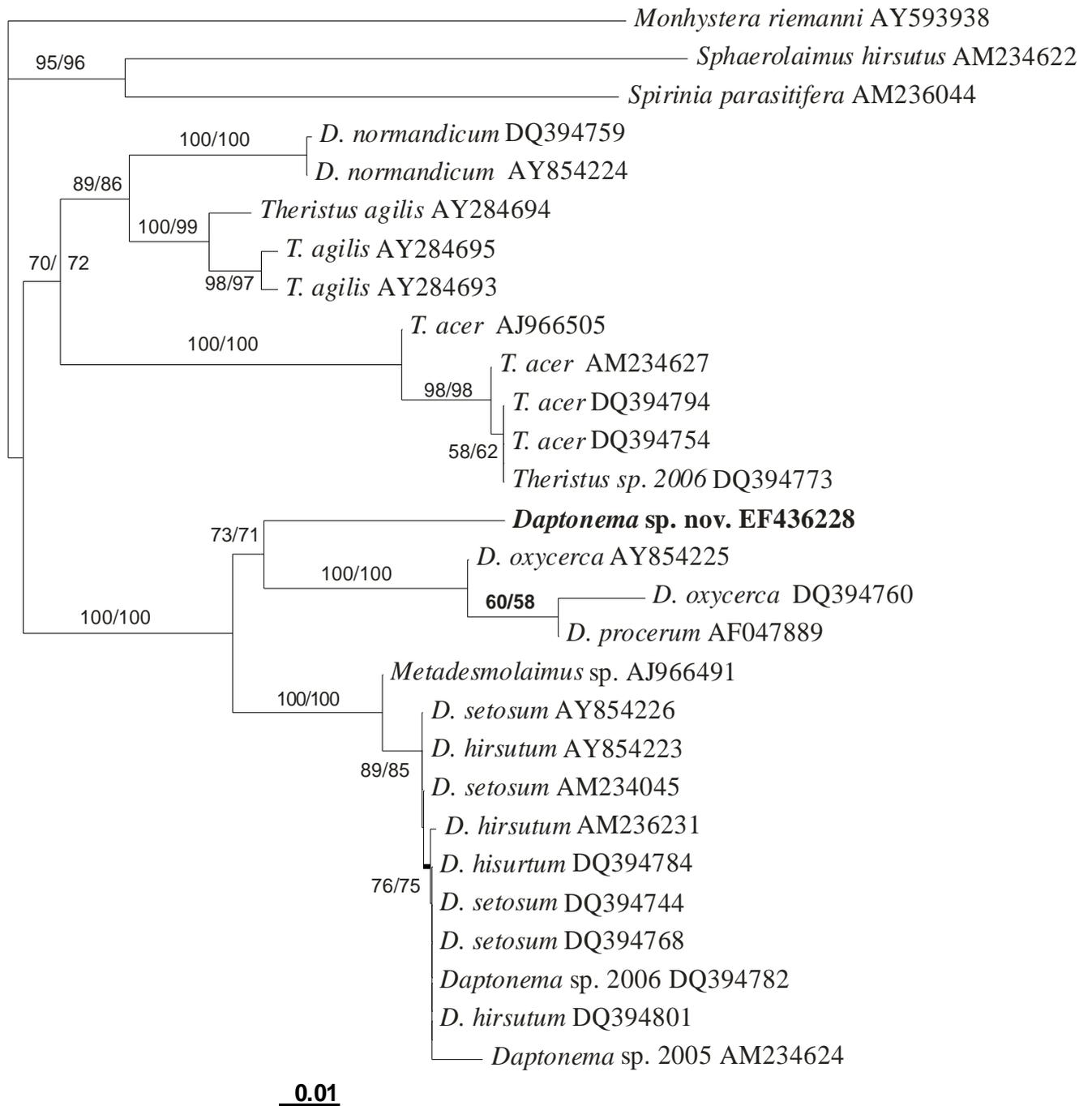


Figura 06: Topologia do Neighbor-joining baseado em seqüências de 18S de 25 espécimes de Xyalidae e 3 gupos externos (*Monhystera riemanni*, *Sphaerolaimus hirsutu* e *Spirinia parasitifera*). Os números são valores de bootstrap e jacknife (10.000 pseudoréplicas), respectivamente, ambos com suporte de ramo acima de 50%. Barra de escala: 0,01 substituições por sítio.

Tabela 05: Distância genética entre as espécies da Família Xyalidae cujas seqüências de 18S estavam disponíveis no GeneBank.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>Daptonema</i> sp. nov	0,00											
2 <i>D. hisurtum</i>	0,07-0,09	0,00										
3 <i>D. setosum</i>	0,06-0,09	0,00	0,00									
4 <i>D. oxycerca</i>	0,07-0,10	0,07-0,09	0,05-0,09	0,00								
5 <i>D., procerum</i>	0,07	0,05-0,10	0,05-0,10	0,002-0,003	0,00							
6 <i>D. normandicum</i>	0,10-0,12	0,09- 0,12	0,09-0,12	0,10-0,151	0,11-0,15	0,00						
7 <i>Daptonema</i> sp, 2006	0,09	0,00	0,00	0,09	0,10	0,11-0,12	0,00					
8 <i>Daptonema</i> sp, 2005	0,09	0,005-0,009	0,005-0,009	0,08-0,10	0,08	0,123-0,127	0,005	0,00				
9 <i>Metadesmolaimus</i>	0,06	0,002-0,006	0,002-0,004	0,05-0,10	0,05	0,09-0,11	0,002	0,01	0,00			
10 <i>Theristus acer</i>	0,12-0,18	0,11-0,14	0,11-0,14	0,13-0,20	0,14-0,20	0,10-0,12	0,13-0,14	0,14-0,15	0,11 0,14	0-0,01		
11 <i>Theristus agilis</i>	0,10	0,09-0,12	0,09-0,12	0,11-0,16	0,11-0,11	0,04-0,06	0,11-0,12	0,12	0,09-0,11	0,08 0,11	0-0,01	
12 <i>Theristus</i> sp, 2006	0,18	0,01-0,14	0,13-0,14	0,20	0,20	0,12	0,14	0,14	0,01	0-0,01	0,10-0,11	0,00

5.6.2. Análise de Máxima Parcimônia (MP)

A topologia de máxima parcimônia foi representada sob o consenso estrito de 28.153 árvores igualmente parcimoniosas. O número de caracteres analisados foi de 1.416, dos quais 945 eram constantes, 270 parcimoniosamente informativos e 201 não informativos. O comprimento da árvore consenso foi de 887 passos e os índices de retenção e consistência foram 0,7934 e 0,7193, respectivamente.

A análise revelou a existência de dois grupos monofiléticos. O primeiro formado por *Daptonema normandicum* e as espécies de *Theristus*, onde *T. agilis* e *D. normandicum* surgiu como uma linhagem evolutiva irmã a outro agrupamento que reúne *T. acer* e *Theristus* sp (Figura 07).

O segundo grupo foi formado pelas demais espécies de *Daptonema*, incluindo a espécie nova, e *Metadesmolaimus* sp. *Daptonema* sp. nov. caracterizou-se como um ramo evolutivamente distinto e grupo irmão das outras espécies congêneres, à exceção de *D. normandicum*. *Daptonema procerum* e *D. oxycerca* apresentaram-se como grupos irmãos, tal unidade evolutiva surgiu ainda como grupo irmão de *D. setosum*, *D.* sp. (AM234624 e DQ394782), *D. hisurtum* + *Metadesmolaimus* sp. (Figura 07).

A análise também revelou uma sinonímia envolvendo *Daptonema hirsutum* e *D. setosum*, além de uma unidade monofilética bem suportada (98/97) compreendendo diversas espécies de *Daptonema* e *Metadesmolaimus* sp. (Figura 07).

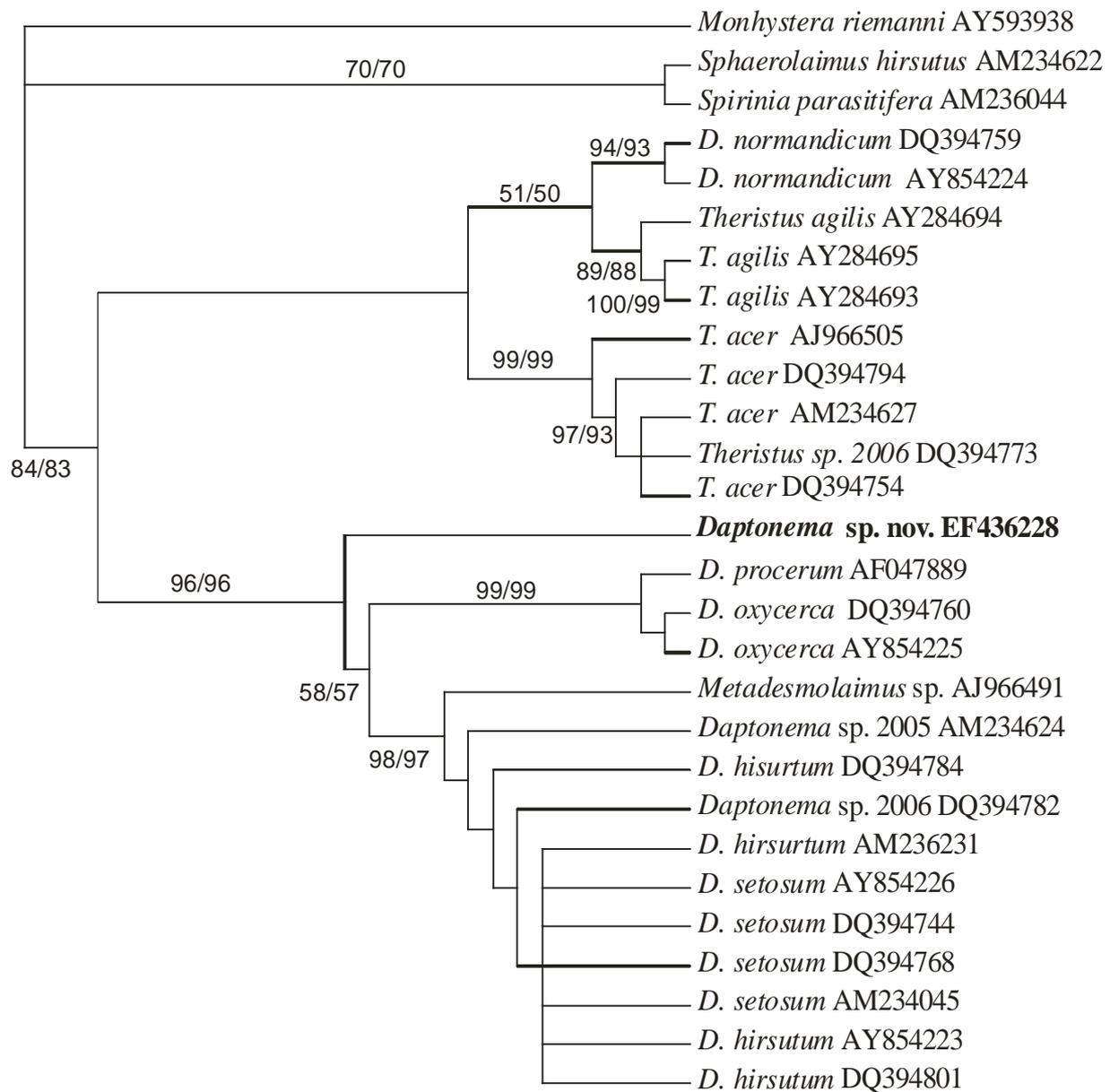


Figura 07: Topologia da Máxima Parcimônia baseada em seqüências de 18S de 25 espécimes de Xyalidae e 3 gupos externos externos (*Monhystera riemanni*, *Sphaerolaimus hirsutu* e *Spirinia parasitifera*). Os números são valores de bootstrap e jackknife (10.000 pseudorélicas), respectivamente, ambos com suporte de ramo acima de 50%.

5.6.2. Análise de Inferência Bayesiana (IB)

A topologia da inferência bayesiana resultou do consenso (*Majority rule consensus*) de 10001 árvores e o desvio padrão foi de 0,005222, resultante de 1.000.000 de gerações computadas em 4 cadeias de Markov (mcmc).

Na análise também ficou evidenciado a existência de dois grupos monofiléticos. O primeiro formado por *Daptonema normandicum* e as espécies de *Theristus*, como revelada na topologia da máxima parcimônia, porém na IB, *D. normandicum* surgiu como uma linhagem irmã a outro agrupamento que reúne *T. agilis*, *T. acer* e *Theristus* sp. (Figura 08).

No segundo agrupamento (Figura 08), formado pelas demais espécies de *Daptonema* + *Metadesmolaimus* sp, *Daptonema* sp. nov. apresentou o mesmo status filogenético visto na topologia de máxima parcimônia, constituindo-se como o grupo irmão de *D. oxycerca*, *D. setosum*, *D. procerum*, *D. hisurtum*, *Daptonema* sp. (AM234624 e DQ394782) + *Metadesmolaimus* sp.. *Daptonema procerum* e *D. oxycerca* apresentaram-se igualmente como grupo irmão de *D. setosum*, *D. sp.* (AM234624 e DQ394782), *D. hisurtum* + *Metadesmolaimus* sp. (Figura 08).

A análise ainda revela duas politomias, a primeira envolvendo *D. hirsutum* e *D. setosum*, *Daptonema* sp. (AM234624 e DQ394782) + *Metadesmolaimus* sp., e a segunda entre *D. procerum* e *D. oxycerca* (Figura 08).

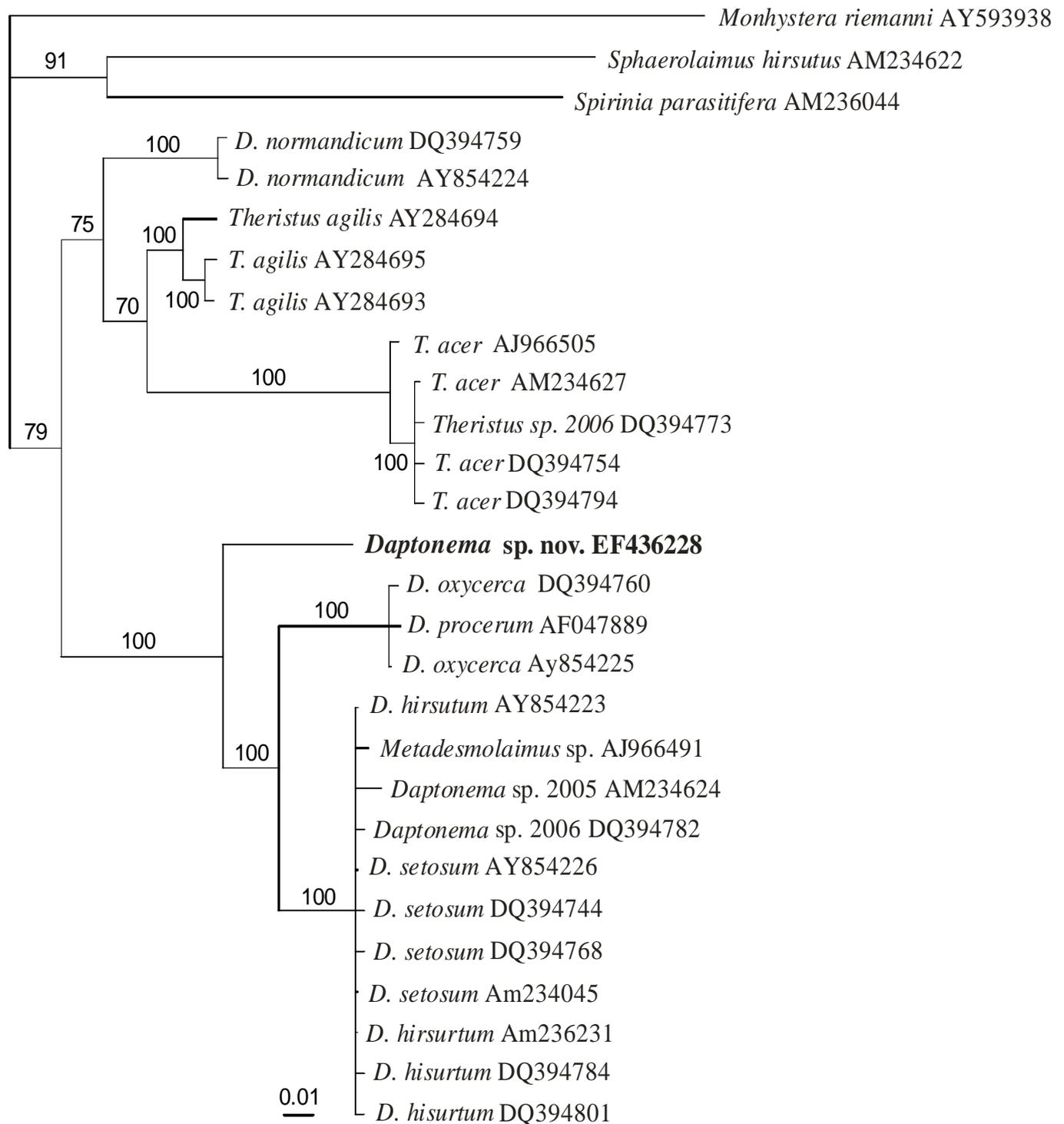


Figura 08: Topologia de Inferência Bayesiana baseada em seqüências de 18S de 25 espécimes de Xyalidae e 3 gupos externos externos (*Monhystera riemanni*, *Sphaerolaimus hirsutu* e *Spirinia parasitifera*). A topologia é resultante de 10001 árvores (1000000 de gerações/desvio padrão de 0,005222).

5.7. Pluviometria

De acordo com dados de pluviometria obtidos nos períodos analisados, o período seco foi representado pelos meses de setembro, outubro e novembro; e o período chuvoso maio, junho e julho. Setembro correspondeu a um mês de transição entre o período chuvoso e seco, no qual se pode observar uma precipitação de 27,8 mm na primeira quinzena e de 1,6 mm na segunda quinzena (valores máximo e mínimo do período seco, respectivamente). Maio correspondeu a um mês de transição entre o período seco e chuvoso, no qual se registrou uma precipitação de 3,9 mm na primeira quinzena (valor mínimo do período chuvoso) e 32,5 mm na segunda quinzena. O maior índice pluviométrico do período chuvoso foi registrado na primeira quinzena de julho (Figura 09).

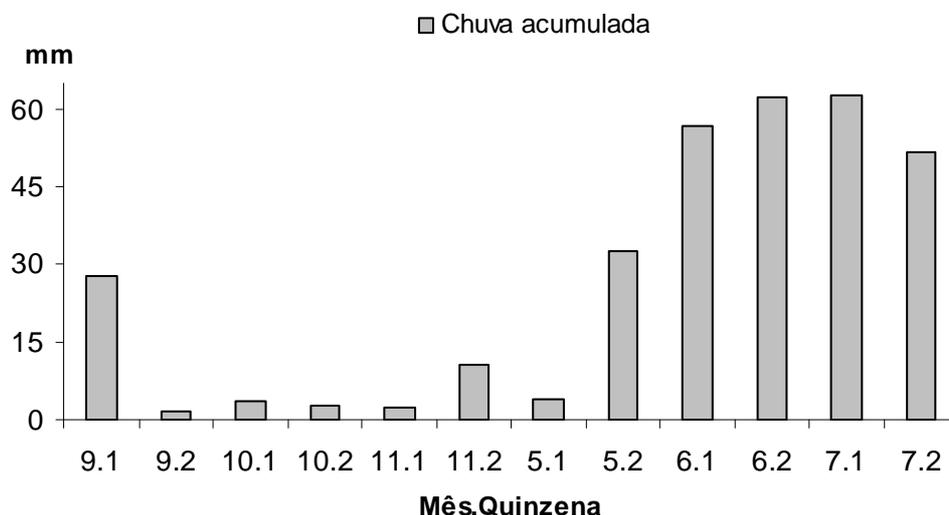


Figura 09: Precipitação (mm) em Recife no período de setembro a novembro de 2006 e de maio a julho de 2007. Os valores foram determinados pela soma da precipitação nos sete dias que antecederam as coletas. (FONTE: www.inmet.com.br).

5.8. Estrutura Populacional de *Daptonema* sp. nov.

O período seco foi marcado por maiores densidades de *Daptonema* sp. nov. que o período chuvoso. A máxima foi observada na segunda quinzena de setembro e a mínima na primeira quinzena de junho (Figura 10).

As fêmeas grávidas também se apresentaram em maior densidade no período seco (máx. 2,11 ind/cm² na primeira quinzena de outubro). No período chuvoso, a densidade de fêmeas grávidas foi diminuindo até a primeira quinzena de junho (0,36 ind/cm²). Após este período um novo aumento foi observado, chegando a 2,04 ind/cm² na última quinzena analisada (julho) (Figura 11).

A densidade de juvenis foi superior a de machos e fêmeas total (fêmeas não grávidas + fêmeas grávidas) na maioria dos períodos analisados, menos na primeira quinzena de maio e junho, e na segunda quinzena de outubro, quando foi menor que a de fêmeas total. Os machos estiveram em menor densidade que o total de fêmeas em todas as quinzenas estudadas, exceto na primeira de setembro e na segunda de junho (Figura 11). As fêmeas grávidas apresentaram maiores densidade que as não grávidas na maioria dos períodos estudados, aparecendo em menor densidade apenas nas duas quinzenas de junho, e com a mesma proporção na segunda quinzena de maio (Figura 12).

O teste Qui-quadrado (X^2) indicou que as categorias populacionais de *Daptonema* sp. nov. apresentaram proporções, significativamente, diferentes daquelas esperadas (1 macho:1 fêmea:2 juvenis) (Macho: $X^2= 35,38613$, $p < ,0002$; Fêmea: $X^2 = 50,98032$, $p < 0,000001$; Juvenil: $X^2 = 20,67014$, $p < 0,04$)

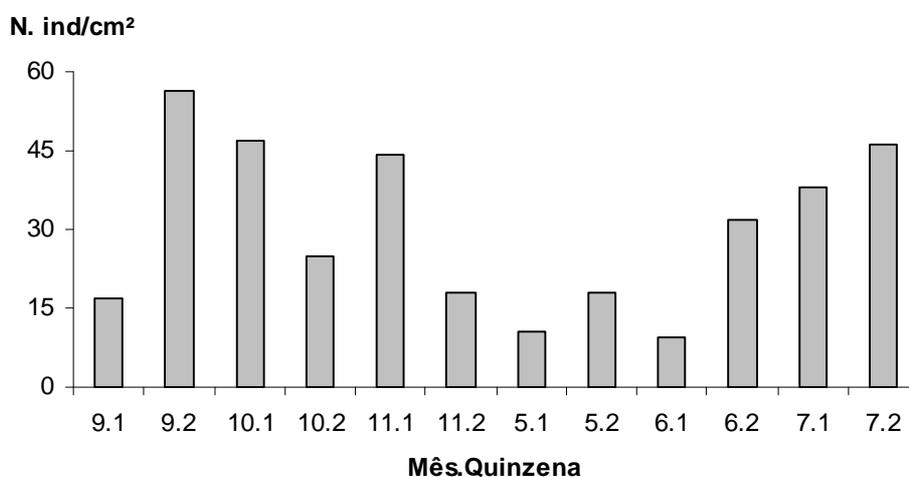


Figura 10: Densidade de *Daptonema* sp. nov. na Bacia do Pina, Recife, Pernambuco.

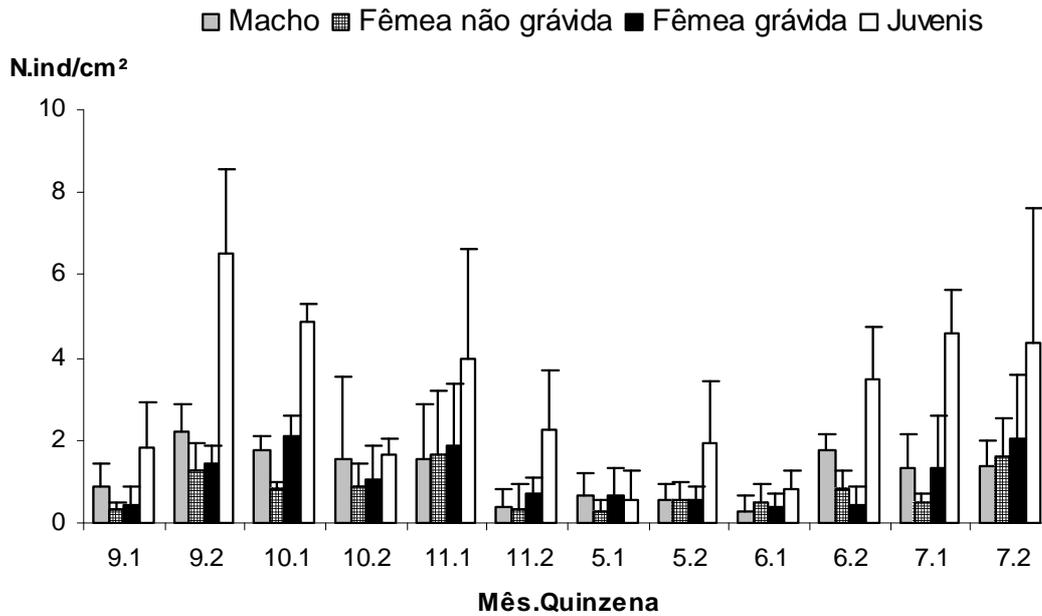


Figura 11: Estrutura da população de *Daptonema* sp. nov. expressos em densidade, evidenciando os estágios de desenvolvimento na Bacia do Pina, Recife, Pernambuco.

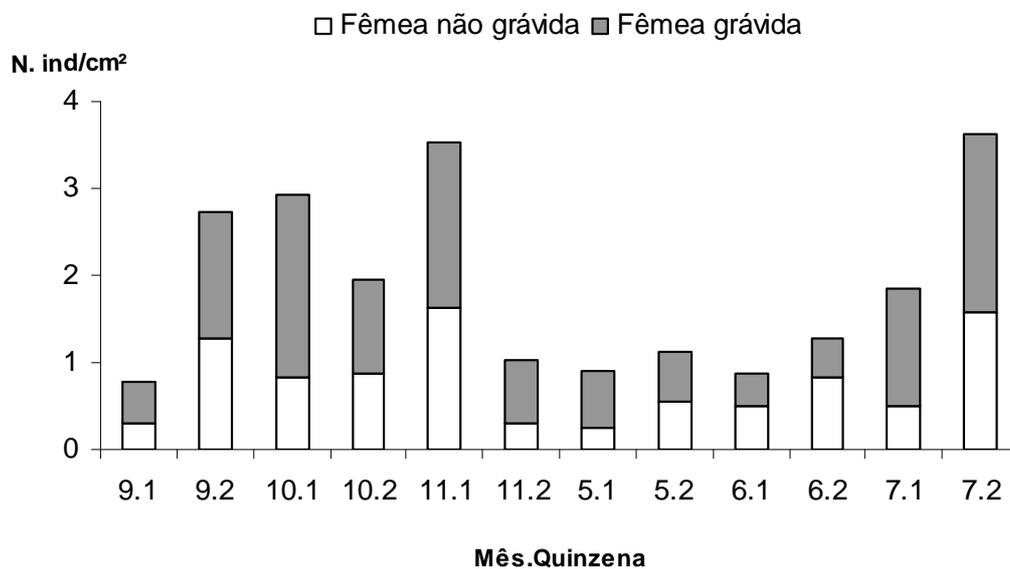


Figura 12: Proporção de fêmeas grávidas de *Daptonema* sp. nov. em relação ao número total de fêmeas na Bacia do Pina, Recife, Pernambuco.

5.9. Estratégia Reprodutiva

5.9.1. Descrição da Estratégia Reprodutiva

Fêmeas de *Daptonema* sp. nov. apresentaram ovos e juvenis em vários estágios de desenvolvimento (Figura 13). A prole variou de 2 a 45 indivíduos, as fêmeas que possuíam um menor número de indivíduos só apresentaram ovos que estavam em diferente estágios de desenvolvimento. Os ovos e embriões possuíam uma membrana vitelina delicada (Figura 13 - A e B), não mais visualizados nos juvenis (Figura 13 - C e D).

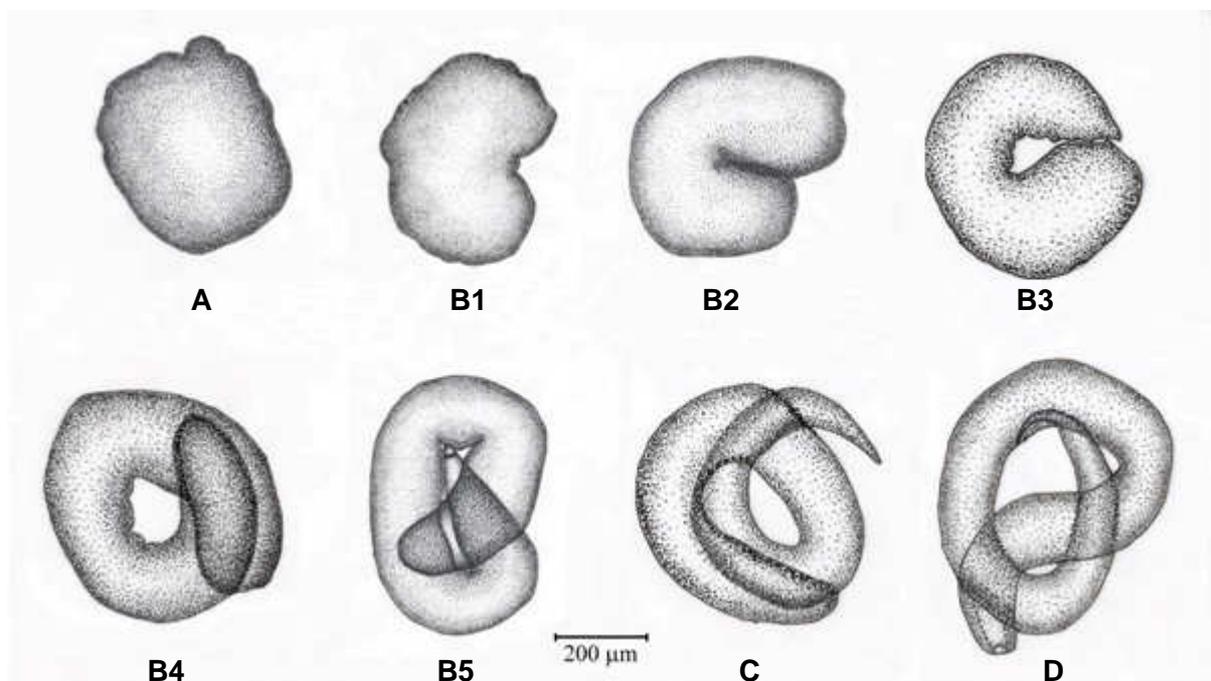


Figura 13: Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento da prole das fêmeas grávidas de *Daptonema* sp. nov., ovos (A), embriões (B), juvenil 1 (C) e juvenil 2 (D). (FONTE: Neres, 2006)

O ovário estava comprimido no sentido anterior do animal, localizando-se mais próximo do esôfago (Figura 14). O intestino apresentava-se comprimido na lateral do corpo (Figura 15 - B). Os ovos estavam posicionados na porção anterior do útero, seguidos pelos embriões em diferentes estágios de desenvolvimento. Os juvenis estavam na região posterior do útero de forma que os estágios mais tardios encontravam-se mais próximos da vulva (Figura 14).

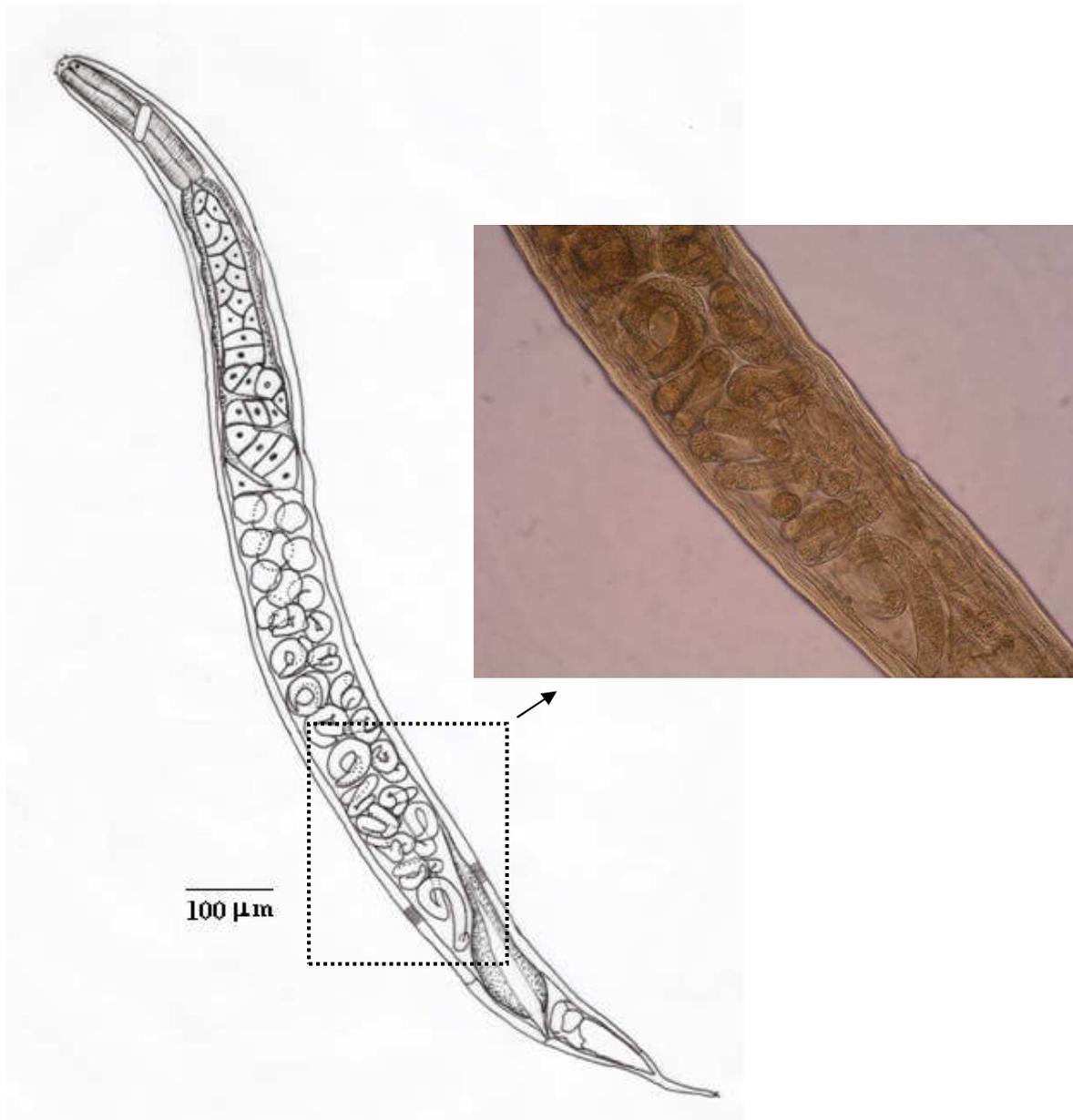


Figura 14: Desenho esquemático de uma fêmea grávida de *Daptonema* sp. nov. e fotografia detalhada da prole. (FONTE: Neres, 2006)

As fêmeas grávidas possuíam quase o dobro do diâmetro corporal das fêmeas não fertilizadas (Figura 15 – A e B). Observou-se também que quanto maior o número da prole maior o comprimento da progenitora. Após o nascimento de toda a prole, a fêmea apresentava as paredes corporais distendidas e alguns órgãos ainda comprimidos, porém intactos (Figura 15 - C).

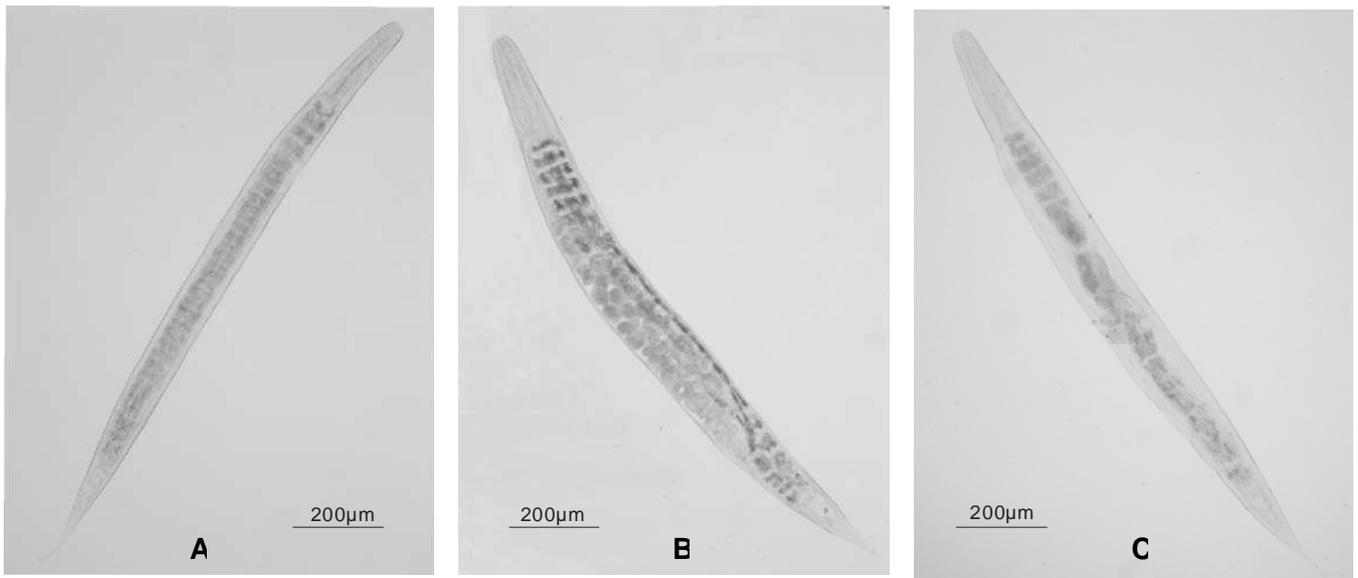


Figura 15: Fotografia da fêmea de uma fêmea não fertilizada de *Daptonema* sp. nov. (A), de uma fêmea grávida (B) e de uma fêmea após a eclosão de toda a prole (C).

Foi observado em placa de petri com uma fêmea grávida viva, que dois juvenis emergiram de sua progenitora (Figura 16 - A). Eles estavam no segundo estágio de desenvolvimento e apresentavam 289,5 e 291 μm . (Figura 16 - B). Tentou-se cultivar fêmeas grávidas, porém não se obteve sucesso, o que impossibilitou a visualização das etapas posteriores.



Figura 16: Fotografia da fêmea gávida de *Daptonema* sp. nov.(A) evidenciando o espaço antes ocupado pelos e dos juvenis (B) que emergiram dela em placa de Petri.

5.9.2. Correlações com os fatores abióticos

Os valores de clorofila a, no geral, foram superiores no período de estiagem. Neste período a menor quantidade de clorofila no sedimento foi observada na segunda quinzena de outubro (4,14 Chl ug/cm²) e a maior na primeira quinzena de novembro (11 Chl ug/cm²). No período chuvoso, o valor mínimo foi registrado na segunda quinzena de junho (1,42 Chl ug/cm²) e o máximo na primeira de julho (9,7 Chl ug/cm²) (Figura). A densidade máxima de fêmeas grávidas foi obtida quando o valor de clorofila a no sedimento foi de 8,16 ug/cm² e a mínima foi registrada com segundo menor valor do período chuvoso (3,43 ug/cm²) (Figura 17-A).

Os percentuais de matéria orgânica foram mais baixos nos meses secos, registrando-se o mínimo de 1,34% na segunda quinzena de novembro e o máximo de 2,22% na primeira quinzena de setembro. No período chuvoso, o menor teor orgânico no sedimento (2,59%) foi registrado em junho (primeira quinzena). Esse valor vai aumentando, gradativamente, até alcançar o pico máximo na segunda quinzena de julho (4,75%). A densidade máxima de fêmeas grávidas foi detectada quando a matéria orgânica representava 2,06% do total da amostra sedimentológica e a mínima correspondeu ao menor teor orgânico do período chuvoso (Figura 17-B).

A temperatura não apresentou grande diferença entre os períodos de estiagem e chuvoso. A máxima foi registrada em maio, 35°C, e a mínima de 28°C na primeira quinzena de julho. A maior densidade de fêmeas grávidas foi registrada quando a temperatura estava em 32°C e a menor foi detectada em 31°C (Figura 17-C).

Em setembro, a partir da segunda quinzena, houve uma queda gradativa dos valores de salinidade até a primeira quinzena de novembro, pico mínimo do período seco (15 ppm). A salinidade sobe abruptamente atingindo 35ppm na segunda quinzena de novembro, valor máximo em todos os tratamentos analisados. No período chuvoso a salinidade diminui gradativamente entre a primeira quinzena de maio (22 ppm) e junho (10 ppm), tornando a aumentar até atingir 18 ppm na última quinzena de julho. A densidade máxima de fêmeas grávidas foi detectada quando a salinidade estava em 24 ppm e a mínima correspondeu ao menor pico (10 ppm) (Figura 17-D).

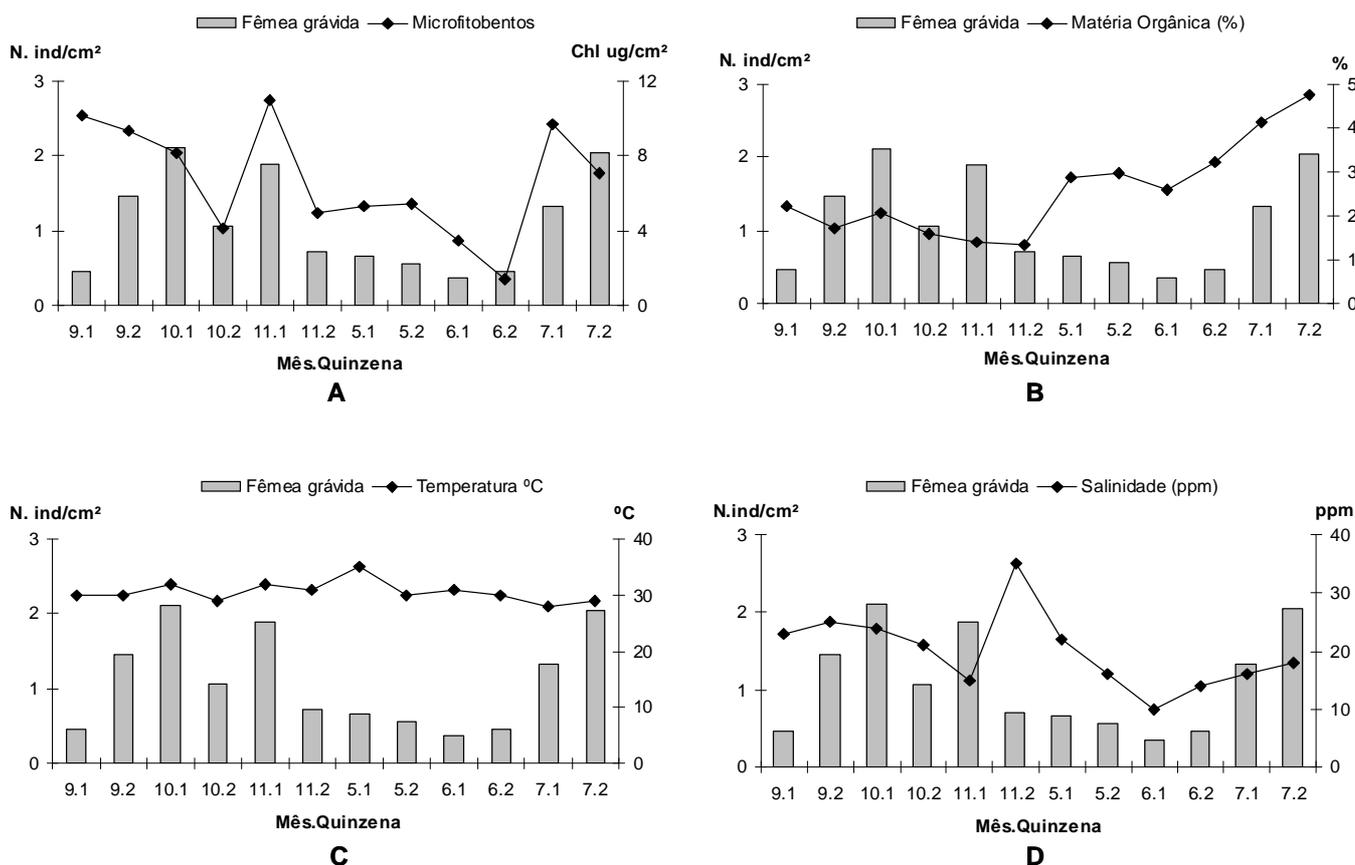


Figura 17: Variação temporal da densidade de *Daptonema* sp. nov. grávidas em relação aos parâmetros ambientais (Microfitobentos – A; Matéria Orgânica – B; Temperatura – C; Salinidade –D). Bacia do Pina – PE.

De acordo com o teste de Correlação de Spearman não houve correlação significativa ($p < 0,05$) entre os fatores abióticos e o padrão de distribuição da densidade das fêmeas grávidas de *Daptonema* sp. nov.. Entretanto, o parâmetro que apresentou uma maior correlação foi o microfitobentos (clorofila-a) (coeficiente de Spearman = 0,51/ $p = 0,089$), seguido pela salinidade (coeficiente de Spearman = 0,36/ $p = 0,248$). Todas as outras correlações foram negativas (Tabela 06).

Tabela 06: Resultado da Correlação de Spearman.

Parâmetro	Spearman	p
Salinidade	0,361404	0,248393
Temperatura	-0,032266	0,920707
Matéria Orgânica	-0,147111	0,648215
Microfitobentos	0,511384	0,089257

6. DISCUSSÃO

6.1. Diagnose diferencial

Os caracteres morfológicos utilizados como parâmetros distintivos entre as espécies de *Daptonema* são: comprimento das setas, tamanho e posição do anfidio, tamanho e estrutura do aparelho copulatório e forma e comprimento da cauda (Warwick *et al.*, 1998).

Daptonema sp. nov. distingue das demais espécies do gênero por apresentar uma acentuada redução das setas cefálicas em relação ao diâmetro cefálico e a forma da espícula em linha reta, que nas demais espécies é curvada, muitas vezes forma de L. Esta característica peculiar sugere uma emenda na descrição do gênero: A espícula geralmente mede aproximadamente um diâmetro anal de comprimento, e é fortemente curvada na maioria das espécies.

Daptonema planiere também apresenta as setas cefálicas com tamanho reduzido (2,9 μm), entretanto, essas setas são em número de dez, de tamanhos iguais e a sua proporção em relação ao diâmetro cefálico é 5 a 6 vezes maior que a mesma correlação na espécie nova. O mesmo arranjo das setas somáticas, observado na espécie nova, foi constatado em *Daptonema psammoides*, contudo, na espécie nova estas setas possuem tamanho reduzido.

Daptonema sp. nov. apresenta o anfidio a menos de um diâmetro cefálico da extremidade anterior, característica esta também observada em *Daptonema oxycerca* e *D. procerum*.

A espécie nova possui a vulva situada próxima à região anal, sendo esta característica também evidenciada em *D. calceolatum*, *D. circumscriptum*, *D. laxum*, *D. hirsutum*, *D. marylinicus*, *D. oxycerca*, *D. setosum*, *D. subsetosum* e *D. trabeculosum*. A presença de espermateca também foi observada em *D. arcticus*, *D. conicum*, *D. nanum*, *D. pratti*, *D. procerum*, *D. proprium*, *D. sentiens*, *D. setosum*, *D. trabeculosum*, *D. williamsi*. Apesar dessa característica compartilhada, no que se refere ao órgão reprodutivo, *Daptonema* sp. nov. diferencia-se de todas as demais espécies co-genéricas dada a sua potencial autapomorfia de incubação intra-uterina de sua prole.

Com relação às estruturas reprodutivas dos machos, *Daptonema pratti*, *D. williamsi* e a espécie aqui estudada são as únicas que apresentam glândulas ejaculatórias. Porém, *Daptonema* sp. nov. difere-se das espécies acima mencionadas, pela forma da espícula e do gubernáculo e por apresentar testículo único. Além disso, foi observado que

D. dentatum, *D. planiere*, *D. exutum* e *D. simplex* possuíam a mesma proporção da espícula em relação ao diâmetro anal que *Daptonema* sp. nov., contudo, estas espécies além de apresentarem a espícula curvada, a ausência de gubernáculo e a sua forma, quando presente, distingue-as da espécie nova.

6.2. Análise Filogenética

Muitos trabalhos têm comprovado a eficiência da região 18S rDNA para estudos de filogenéticos no filo Nematoda (Blaxter *et al.*, 1998; De Ley & Blaxter, 2002 e 2004; Bhadury *et al.*, 2006; De Ley *et al.*, 2005; De Ley, 2006; Meldal *et al.*, 2007). Bhadury *et al.* (2006), constataram em seu estudo com 80 seqüências de apenas 345bp, que tal região ainda demonstrou uma boa resolução a nível genérico e específico. Os autores ainda observaram que o gene não apresentou variação a nível intra-específico. Os resultados aqui observados, no que se refere à resolução de 18S em abordagens filogenéticas, corroboram as evidências acima descritas, tendo em vista a resolução genética e filogenética aqui observada entre gêneros e espécies de Xyalidae (Figuras 06, 07 e 08). Além disso, a comparação das seqüências estudadas de *Daptonema* corrobora o conservadorismo intra-específico de 18S observado por Bhadury *et al.* (2006), apesar do mesmo não ter sido evidenciado em *Theristus*, onde houve variação (até 0,01; Tabela 05). Tal inconsistência, no que se refere à ausência de conservadorismo intra-específico de 18S em *Theristus*, entre as seqüências de *T. acer* e as de *T. agilis*, pode sugerir a fragilidade taxonômica destas espécies, sugerindo portanto a revisão das mesmas.

De Ley *et al.* (2002), em sua comparação filogenética usando seqüências quase completas de rDNA 18S (1577–1597 bp) de 14 espécies de *Meloidogyne*, concluiu que o 18S detém uma considerável diversidade genética (até 10 % de divergência) para um gene conservado. A comparação destes dados com aqueles aqui obtidos, entre as espécies de *Daptonema*, maior amplitude na variação da região 18S, desde 0,2% (entre *D. oxycerca* e *D. procerum*) até 15,1% (entre *D. normandicum* e *D. oxycerca*). Esta última comparação pode ser explicada pelo fato de que *D. normandicum* mostrou-se genética e filogeneticamente mais próximo de *Theristus* e, portanto, pode refletir o distanciamento evolutivo observado entre dois clados: *Daptonema* e *Theristus*. A avaliação acerca da posição filogenética de *D. normandicum*, bem como o que isso representa em termos taxonômicos será mencionada à seguir.

Os resultados relativos ao tratamento filogenético das sequências 18S rDNA ainda destacam que o gene eficiente na identificação de espécies desconhecidas, como já mencionada por Blaxter & Floyd (2003), Tautz *et al.* (2003) e Bhadury *et al.* (2006). Apesar da topologia de máxima parcimônia não ser conclusiva acerca do status de *Daptonema* sp. 2005 e *D.* sp. 2006, as análises de neighbor-joining e inferência bayesiana sugerem tais linhagens como sinônimos de *Daptonema setosum* + *D. hisurtum* (Figuras 6 e 8). Resultados similares podem igualmente ser observados em relação ao gênero *Theristus*, uma vez que existe um sólido apoio a indicar *Theristus* sp. como *T. acer*, tendo em vista todas as topologias, bem como as evidências de distância genética (Figuras 06, 07 e 08; Tabela 05).

Todas as análises realizadas apresentaram, no geral, a mesma topologia. Assim, as topologias resultantes de NJ, MP e IB apoiaram *Daptonema* sp. nov. como uma linhagem genética e evolutivamente distinta, sendo ainda o grupo irmão das demais espécies de *Daptonema* à exceção de *D. normandicum*. Além disso, por todas as análises, *Metadesmolaimus* sp. apareceu inserido dentro do que agrupamento formado pela maioria das espécies de *Daptonema* (Figuras 06, 07 e 08). Tal evidência sugere um erro na identificação do espécime, que deveria ser considerado como uma espécie de *Daptonema*. Esse erro também foi evidenciado por Meldal *et al.* (2007), que ainda ressaltou a dificuldade de identificar os membros de Xyalidae usando apenas os caracteres morfológicos.

As análises de distância genética (NJ) e as evolutivas (MP e IB) detectaram uma sinonímia envolvendo *D. hisurtum* e *D. setosum*. Vitiello (1967) relata sobre a semelhança entre as duas espécies e mencionou que tais espécies se distinguem apenas por morfometria (comprimento das setas cefálicas, cauda e espícula). Contudo, Sharma (1985), afirma que tais características não são suficientes para separá-las em duas espécies, devendo ser tratadas como uma variação intra-específica. Portanto, as análises aqui realizadas sugerem *D. setosum* como a sinonímia júnior de *D. hirsutum*.

Segundo as análises NJ e MP (Figuras 06 e 07) *D. oxycerca* e *D. procerum* são linhagens próximas, sob ponto de vista genético e evolutivo, respectivamente. A análise de IB, porém, indica tais espécies como sinônimas. Os caracteres morfológicos de *D. oxycerca* e *D. procerum* corroboram com a primeira hipótese, uma vez que há grande similaridade entre as espécies, apoiada pela proporção das setas cefálicas em relação ao diâmetro cefálico, a posição do anfídio em relação à extremidade anterior, o comprimento da cauda, espículas longas e a posição da vulva em relação ao comprimento total. No entanto, as diferenças, além de morfométrica, são também de caráter estrutural (forma do gubernáculo) (Warwick *et al.*,

1998). Esta descontinuidade entre coesão genética e filogenética e diferenças na anatomia de um órgão que faz parte do aparelho reprodutivo (gubernáculo), pode estar refletindo um fenômeno evolutivo recente, não amplamente detectado pela evidência molecular de uma região conservada, mas fortemente evidente para uma estrutura copulatória.

Os dados evidenciados nas análises evolutivas (MP e IB; Figuras 07 e 08) indicam que *Daptonema* pode não ser um grupo estritamente natural, devido à parafilia detectada e sustentada pela relação filogenética mais próxima de *Daptonema normandicum* com o clado de *Theristus*. A topologia de Neighbor-Joining parece sustentar tal parafilia, uma vez que as mesmas relações, neste caso, genéticas, foram observadas. Nicholas & Trueman (2002) baseados em caracteres morfológicos evidenciaram que *Daptonema* apareceu como um grupo polifilético, porém, Bhadury *et al.* (2006), em seu estudo com o gene 18S, *Daptonema* apareceu como uma linhagem monofilética, contudo *Daptonema normandicum* não estava entre as espécies de Xyalidae estudadas. Em termos mais específicos, *D. normandicum* deveria ser incluída como uma espécie de *Theristus*, dada a maior similaridade genética e evolutiva. As análises ainda reforçam a estreita relação destes gêneros, porém, destacam igualmente a necessidade de uma profunda revisão taxonômico-sistemática em ambos os táxons, incluindo evidências moleculares e morfoanatômicas. Tal orientação vem de encontro inclusive ao que é proposto para os representantes da família Xyalidae (Wieser, 1956; Lorenzen, 1977; Warwick *et al.*, 1998; Nicholas & Trueman, 2002; Meldal *et al.*, 2007).

È importante salientar que o emprego de métodos moleculares não empobrece o campo da sistemática, como vem sendo afirmado, mas eles devem ser tratados como parte dos dados para análises das relações entre os táxons (Blaxter e Floyd, 2003). As dificuldades encontradas na taxonomia de Nematoda reforçam a necessidade da sinergia entre as tradicionais diagnoses morfológicas observadas por microscopia com as análises moleculares (Bhadury *et al.*, 2006). Com esta conduta pretende-se minimizar a superabundância de sinônimos e nomes dúbios, resultantes de práticas taxonômicas passadas (Dayrat, 2005), e dar novo ímpeto na descoberta da biodiversidade (Tautz *et al.*, 2003).

6.3. Estrutura Populacional

Daptonema é um dos 15 gêneros presentes em todos os ambientes prospectados da costa brasileira (Venekey, 2007). Na Bacia do Pina, *Daptonema*, junto com *Terschelingia* e *Spirinia*, foram os gêneros mais abundantes em todos os períodos climáticos estudados (Castro, 2003). A mesma dominância genérica foi observada no Canal de Santa Cruz, litoral norte de Pernambuco (Silva, 2004), no entanto, outros estudos também mostraram a dominância desses gêneros em estuários de regiões temperadas (Hodda & Nicholas, 1986; Soetaert *et al.*, 1994; Li & Vincx, 1993).

A densidade populacional de *Daptonema* sp. nov. foi superior no período de menor regime pluviométrico, contudo, Alongi (1990) afirma que em espécies depositívoras, como é o caso da espécie aqui retratada, é esperado um maior crescimento demográfico no período chuvoso, devido ao maior aporte orgânico nesta época do ano.

A estrutura da população de *Daptonema* sp. nov. apresentou-se dominada pelos juvenis e com uma maior participação de fêmeas do que de machos em ambos os períodos do ano. Este mesmo padrão foi detectado por Silva (2004) em relação à nematofauna do canal de Santa Cruz, porém, na Bacia do Pina Castro (2003) observou uma dominância de fêmeas. Esteves *et al.* (2003; 2004) também constatou que houve uma dominância de fêmeas na população de *Oncholaimus cobbi* e *Comesoma arenae* da Coroa Grande, uma planície de maré localizada na Baía de Sepetiba (RJ).

Segundo Manachini (1997) o modelo para a distribuição das populações de Nematoda é apresentado na proporção de machos: fêmeas: juvenis (1:1:2). Este modelo não se aplica à *Daptonema* sp. nov. na Bacia do Pina, já que nos dois períodos climáticos estudados houve diferença significativa quanto a proporção do machos, fêmeas e juvenis, não seguindo, portanto, o modelo proposto pelo autor. Porém, é difícil comparar dados sobre estrutura de populações nematofaunísticas em ambientes naturais, pois segundo Heip *et al.* (1982), os estudos sobre gerações de Nematoda geralmente são extraídos de resultados obtidos através de cultivo, nos quais os fatores abióticos são controlados.

Warwick & Price (1979) verificaram no Estuário do Lynher, Inglaterra, uma grande quantidade de juvenis esteve presente nas amostras coletadas ao longo de todo o ano e que a ocorrência de fêmeas grávidas não esteve relacionada com as estações. O presente estudo também evidenciou que as fêmeas grávidas integraram a população nos dois períodos climáticos analisados, porém, no período seco as densidades foram superiores, ao contrário do

que mostraram Castro (2003) e Neres (2006). Dados não publicados mostraram a presença de fêmeas grávidas da espécie nova no Rio Botafogo (Venekey, Comunicação pessoal) e no Rio Carrapicho (Alves, Comunicação pessoal), litoral norte de Pernambuco.

6.4. Estratégia Reprodutiva

Pode-se observar que após o nascimento de toda a prole as fêmeas apresentaram as paredes corporais distendidas, porém, os órgãos estavam intactos. Tal fato descarta a hipótese de *endotokia matricida*, uma vez que nesta estratégia reprodutiva os filhotes ingerem o alimento e os tecidos da progenitora, e como resultando ela morre (Johnigk & Ehlers, 1999). Portanto, em *Daptonema* sp. nov. foi observado a ovoviviparidade, evento comum a nematódeos parasitas (Chitwood & Chitwood, 1974), entretanto, o que torna o fenômeno peculiar é a incubação de ovos e juvenis em vários estágios de desenvolvimento, já que o esperado seria a presença de juvenis em um único estágio. Esta característica só foi descrita para *Monhystera disjuncta* (Chitwood & Murphy, 1964; Hopper, 1969; Gerlach & Schrage, 1971), que apesar de pertencer da mesma ordem de *Daptonema* sp. nov. (Monhysterida), integra outra superfamília (De Ley *et al.*, 2006).

Assim como Augustine (1937), em seu estudo com um nematódeo parasita, observou-se que dentro do útero os ovos e embriões estavam envoltos por uma membrana delicada, mas que nenhuma membrana esteve presente sobre as juvenis na região vaginal, indicando uma parcial incubação intra-uterina. O autor ainda menciona ter observado os envoltórios já rompidos na região distal do útero, entretanto, em *Daptonema* sp. nov. este não foi evidente.

Constatou-se que a quantidade de filhotes estava diretamente relacionada com o comprimento da fêmea, sendo essa uma característica também observada em hermafroditas de *Heterorhabdits* ssp. que realizam *endotokia matricida* (Ehlers, 2001), estratégia também relacionada ao desenvolvimento intra-uterino.

Walton (1923) observou que em algumas espécies de nematódeos parasitas ocorre um parcial desenvolvimento intra-uterino, com o estágio de mórula, por exemplo, sendo realizado antes dos ovos serem eliminados. O mesmo foi evidenciado para fêmeas jovens e com menor tamanho de *Monhystera disjuncta* (Chitwood & Murphy, 1964), porém, em *Daptonema* sp. nov., apesar de ter sido visualizadas fêmeas só com ovos em diferentes estágios, não se pôde observar se tal fato seria atribuído ao início do processo de incubação ou se esse fenômeno também está relacionado a espécie nova, já que não foi possível mantê-las em cultivo.

Segundo Clutton-Brock (1991), a incubação intra-uterina entre os invertebrados está associada aos recursos efêmeros e a ambientes adversos a vida. Chen & Caswell-Chen (2004), em suas observações em *Caenorhabditis elegans*, corroboram tal hipótese e ainda relatam que o desenvolvimento interno da prole é um traço da história das espécies que aumenta seu poder adaptativo, de modo a realçar sua sobrevivência. Bouwman *et al.* (1983) observou que *Pareudiplogaster pararmatus*, nematódeo ovovivíparo de água doce, foi o membro mais importante da nematofauna em uma área exposta à poluição orgânica. Os autores ainda atribuíram sua abundância a estratégia reprodutiva desenvolvida pela espécie, uma vez que ela propiciará a sua sobrevivência sob condições extremas, tornando-se dominante com o desaparecimento dos competidores menos resistente. Tal caráter também pode ser atribuído a *Daptonema* sp. nov., já que a Bacia do Pina é um local com altos índices de eutrofização e poluição orgânica (Sommerfield *et al.*, 2003) e a espécie nova é um dos representantes mais abundantes (Neres, 2006).

Os resultados estatísticos obtidos através da Correlação de Spearman (Tabela 06) mostraram que nenhum fator ambiental apresentou uma correlação significativa com o fenômeno reprodutivo de *Daptonema* sp. nov..

Mesmo não sendo significativa, a maior correlação foi obtida com o microfitobentos, que esteve em maior quantidade no período seco. Assim, pode-se pensar que a diminuição na densidade de fêmeas grávidas no período chuvoso pode estar relacionada à diminuição do microfitobentos no substrato, uma vez que as microalgas fazem parte da fonte alimentar de *Daptonema*. Este gênero está classificado como grupo trófico 1B, segundo Wieser (1953), relativo aos comedores não seletivos de partículas como detritos, bactérias e microalgas. Bouwman *et al.* (1984), porém, observou em cultivo que *Daptonema setosum* se alimentou apenas de diatomácias.

A matéria orgânica, apesar de também ser uma fonte de alimento para a espécie e estar em maior teor no período chuvoso, não apresentou uma correlação positiva com o fenômeno, porém Höss *et al.* (2001) relataram que o teor orgânico exerceu uma forte influência na reprodução de *Caenorhabditis elegans*, podendo refletir em um efeito benéfico ou inibitório.

Foi também evidenciada uma correlação negativa com a temperatura. Este parâmetro, contudo, influenciou o crescimento e reprodução em outras populações de nematódeos marinhos e estuarinos (Moens & Vincx, 2000a; 2000b) e em *Monhystera disjuncta* foi o fator chave para o desencadeamento da ovoviviparidade (Gerlach & Schrage, 1971). Rodrigues (2002) mostrou que a temperatura na bacia do Pina foi evidenciada como possível regulador

da estrutura da comunidade da meiofauna e da nematofauna, mesmo que as variações não ultrapassassem de 0,5°C entre as estações prospectadas. Diz Alongi (1987) que este fator é de extrema importância nos estuários tropicais e lembra que ele está intimamente relacionado com a disponibilidade e o aproveitamento do oxigênio pelas espécies.

Soetaert *et al.*(1995) observou que *Daptonema* foi um dos gêneros mais abundantes nos cinco estuários prospectados e esteve presente em uma ampla faixa de salinidade 5 a 30ppm. O impacto da salinidade no desenvolvimento e reprodução vem sendo estudado apenas em poucas espécies de nematódeos estuarinos (Tietjen *et al.*, 1970; Tietjen & Lee, 1972, 1977; Warwick, 1981; Vranken, 1985). Tietjen & Lee (1972), observaram que tanto o aumento quanto a diminuição do conteúdo iônico reflete no ciclo de vida de *Monhystera denticulata* duplicando o tempo geração. Moens & Vincx (2000b) relataram alterações na fecundidade em virtude do estresse salino para duas espécies estuarinas, *Pellioditis marina* e *Diplolaimelloides meyli*. O presente estudo constatou que a salinidade não apresentou uma correlação significativa ($p < 0,05$) com a incidência de ovoviviparidade em *Daptonema* sp. nov., contudo, tal relação foi positiva como visto para o microfitobentos.

Os resultados aqui relatados não obtiveram um suporte estatístico para considerar a ocorrência da ovoviviparidade na espécie nova de *Daptonema* em virtude das variações dos fatores ambientais ao longo dos períodos estudados. Porém, antes de adotar o fenômeno como uma característica biológica da espécie inerente aos fatores abióticos, seria importante realizar um estudo com a espécie em cultivo, onde tais fatores podem ser controlados e isolados. Além disso, outros fatores, não considerados neste estudo, podem ser incluídos na análise (disponibilidade de oxigênio, ph, poluentes, entre outros).

7. CONCLUSÕES

- Nenhuma espécie de *Daptonema* já descrita apresentou uma estreita relação com a espécie nova, quanto aos caracteres morfológicos.
- *Daptonema* sp. nov. distingue-se das demais espécies do gênero por apresentar uma acentuada redução das setas cefálicas em relação ao diâmetro na região cefálica e a forma da espícula em linha reta.
- Como os representantes de *Daptonema* possuem a espícula curvada, muitas vezes em ângulo, a forma da espícula de *Daptonema* sp. nov. exige uma emenda na descrição do gênero.
- O gene 18S mostrou ser um bom marcador para distinção entre gêneros e espécies de Xyalidae.
- O gene 18S foi eficiente na identificação de espécies não nomeadas.
- *Daptonema* sp. nov. desmonstrou ser uma linhagem genética e evolutivamente distinta.
- A parafilia detectada em *Daptonema* e *Theristus* sugere que *D. normandicum* deveria ser incluída como uma espécie de *Theristus*, dada a maior similaridade genética e evolutiva.
- *Daptonema* sp. nov. realiza ovoviviparidade, estratégia reprodutiva comum a nematódeos parasitas, entretanto, o que torna o evento peculiar é a presença de ovos e juvenis em vários estágios de desenvolvimento, característica esta descrita apenas para uma espécie de Nematoda marinho.
- Na tentativa de reconstruir a história da estratégia reprodutiva aqui detectada, sugere-se que a mesma seja considerada como uma homoplasia, uma vez que parece ter ocorrido duas vezes independentemente ao longo da diversificação da ordem Monhysterida
- A ocorrência da ovoviviparidade na espécie nova de *Daptonema* não esteve correlacionada às variações dos fatores ambientais estudados ao longo dos períodos analisados. Porém, antes de adotar o fenômeno como uma característica reprodutiva da espécie que não sofre influência das variações ambientais, seria importante realizar um estudo com a espécie em cultivo, onde tais fatores podem ser controlados e isolados. Além disso, outros fatores como disponibilidade de oxigênio, ph e poluentes, poderiam ser incluídos na análise.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALESHIN, V. V.; KEDROVA, O. S.; MILYUTINA, I. A.; VLADYCHENSKAYA, N. S.; PETROV, N. B. (1998). Relationships among nematodes based on the analysis of 18S rRNA gene sequences: molecular evidence for monophyly of chromadorian and secernentian nematodes. **Russian Journal of Nematology**. 6(2): 175-184.
- ALONGI, D. M. (1987). Intertidal zonation and seasonality of meiobenthos in tropical mangrove estuaries. **Marine Biology**. 95: 447-458.
- ALONGI, D. M. (1990). Community dynamics of free-living nematodes in some tropical mangrove and sandflat habitat. **Bulltin of Marine Science**, Miami, 46(2): 358-373.
- AUGUSTINE, D. L. (1937). Observations on living “sheathed” microfilariae in the capillary circulation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 31(1): 55-60.
- AVISE, J. C. (1989). Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. **Evolution**. 43: 1192-1208.
- BALIADI, Y.; YOSHIGA, T.; KONDO, E. (2004). Infectivity and post-infection development of infective juveniles originating via *endotokia matricida* in entomopathogenic nematodes. **Journal Applied Entomology and Zoology**. 39(1): 61-69.
- BHADURY, P.; AUSTEN, M. C.; BILTON, D. T.; LAMBSHEAD, P. J. D.; ROGERS, A. D.; SMERDON, G. R. (2006). Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. **Marine Ecology Progress Series**. 320: 1-9.
- BLAXTER, M. L. (2001). Molecular analysis of Nematoda evolution. *In*: **Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology**. M. W. Kennedy and W. Harnett (eds.). CABI Publishing. 1-24 p.
- BLAXTER, M. L. (2004). The promise of a DNA taxonomy. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. 359: 669-679.

- BLAXTER, M. & FLOYD, R. (2003). Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. **Trends in Ecology and Evolution**. 18: 268.
- BLAXTER, M. L.; DE LEY, P.; GAREY, J. R.; LIU, L. X.; SCHELDEMANN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANXETEREN, J. R.; MACKAY, L. Y.; DORRIS, M.; FRISSE, L. M.; VIDA, J. T.; THOMAS, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**. 392 (6671): 71–75.
- BOUWMAN, L. A. (1983). Systematic, ecology and feeding biology of estuarine nematodes. **Biologisch Onderzoek Ems-Dollard Estuarium**. Publicaties en Verlagen 3.
- BOUWMAN, L. A.; ROMEYN, K.; KREMER, D. R.; VAN-ES, F. B. (1983). Occurrence and feeding biology of some nematode species in Aufwuchscommunities. *In: Systematics, ecology and feeding biology of estuarine nematodes*. BOEDE publications en verslagen 3: 107-127.
- BOUWMAN, L. A.; ROMEYN, K.; KREMER, D. R.; VAN-ES, F. B. (1984). Occurrence and feeding biology of some nematode species in estuarine aufwuchscommunities. **Cahiers de Biologie Marine de Roscoff**. 25: 287-303.
- CASTRO, F. J. V. (2003). **Variação temporal de meiofauna e da Nematofauna em uma área médiolitorânea da Bacia do Pina (Pernambuco, Brasil)**. Recife, Tese (Doutorado em Oceanografia) – Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 110p.
- CHEN, J. & CASWELL-CHEN, E. P. (2004). Facultative Vivipary is a Life-History Trait in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Nematology**. 36(2):107-113.
- CHITWOOD, B. G. (1933). A revised classification of the Nematoda. **Journal of Parasitology**. 20(2): 131.
- CHITWOOD, B. G. (1937). A revised classification of the Nematoda. *In: Papers on Helminthology*, 30 Year Jubileum K.J. Skrjabin. All-Union Lenin Academy of Agricultural Sciences, Anon (ed.), Moscow, p. 67–80.

- CHITWOOD, B. G. & CHITWOOD, M. B. (1950). **An Introduction to Nematology**, second ed. Monumental Printing Company, Baltimore, MD. 372 p.
- CHITWOOD, B. G. & CHITWOOD, M. B. (1974). **Introduction to Nematology**. University Park Press.
- CHITWOOD, B. C. & MURPHY, D. G. (1964). Observations on two marine Monhysterids – their classification, cultivation and behavior. **Transactions of the American Microscopical Society**. 83: 311-329.
- CLUTTON-BROCK, T. H. (1991). **The Evolution of parental care**. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- COIMBRA, A. L. S.; COSTA, K. M. P.; MACEDO, S. J. (1987). Estudo ecológico da Bacia do Pina. Características físico-químicas da água. *In*: Encontro Brasileiro de Oceanografia Química. **Resumos**. Recife, UFPE, p. 21.
- COLIJN, F. & DIJKEMA, K. S. (1981). Species composition of benthic diatoms and distribution of chlorophyll a on a intertidal flat in the Dutch Waaden Sea. **Marine Ecology Progress Series**. 14: 9-21.
- COOB, N. A. (1920). One hundred new nemas (type species of 100 new genera). **Contributions to Science of Nematology**. 9: 217-343.
- COOMANS, A. (1979). A proposal for a more precise terminology of the body regions of a nematode. **Annales de la Societe Royale Zoologique de Belgique**. 108: 115-117.
- COOMANS, A. (2000). Nematode systematics: past, present and future. **Nematology**. 2(1): 3-7.
- COOMANS, A. (2002). Present status and future of nematode systematics. **Nematology**. 4: 573-582.
- COOMANS, A. & EYUALEM-ABEBE (2006). Order Monhysterida. *In*: **Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy**. A. Eyuaem, I. Andrassy, W. Traunspurger (eds.). CABI Publishing, Massachusetts. p. 574-603.

- COULL, B. C. (1988). Ecology of the marine meiofauna. *In: Introduction to the study of meiofauna*. Higgins, R. P. & Thiel, H. (eds). Smithsonian Institution Press. p. 18-38.
- DAYRAT, B. (2005). Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**. 85: 407-415.
- DECRAEMER, W. & SMOL, N. (2006). Orders Chromadorida, Desmodorida and Desmocolocida. *In: Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy*. A. Eyualem, I. Andrassy, W. Traunspurger (eds.). CABI Publishing, Massachusetts. p. 497-573.
- DE GRISSE, A. T. (1969). Redescription ou modification de quelques techniques utilisés dans l'étude des nématodes phytoparasitaires. **Mededelingen Rijksfakulteit Landbouwwetenschappen Gent** 34: 251-369.
- DE LEY, P. (2000). Lost in worm space: phylogeny and morphology as road maps to nematode diversity. **Nematology**. 2: 9-16.
- DE LEY, P. (2006). A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. *In: WormBook*. The *C. elegans* Research Community (eds.), p. 1-8.
- DE LEY, P. & BLAXTER, M. L. (2002). Systematic position and phylogeny. *In: The Biology of Nematodes*, D.L. Lee, ed., London: Taylor and Francis, p. 1-30.
- DE LEY, P. & BLAXTER, M. (2004). A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. **Nematology Monographs and Perspectives**. 2: 633-653.
- DE LEY, I. T.; DE LEY, P.; VIERSTRAETE, A.; KARSSSEN, G.; MOENS M. (2002). Phylogenetic analyses of *Meloidogyne* small subunit rDNA. **Journal of Nematology**. 34(4): 319-27.
- DE LEY, P.; DE LEY, I. T.; MORRIS, K.; EYUALEM-ABEBE; MUNDO-OCAMPO, M.; YODER, M.; HERAS, J.; WAUMANN, D.; ROCHA-OLIVARES, A.; BURR, A. H. J.; BALDWIN J. G. AND THOMAS, W. K. (2005). An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. 360: 1945-1958.

- DE LEY, P.; DECRAEMER, W.; EYUALEM-ABEBE, (2006). Introduction: Summary of present knowledge and research addressing the ecology and taxonomy of freshwater nematodes. *In: Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy*. A. Eyualem, I. Andrassy, W. Traunspurger (eds.). CABI Publishing, Massachusetts. p. 3-30.
- DE LUCA, F.; REYES, A.; GRUNDER, J.; KUNZ, P.; AGOSTINELLI, A.; DE GIORGI, C.; LAMBERTI, F. (2003). Phylogeny and sequence variation in the ribosomal DNA of six species of *Longidorus* (Nematoda). **Journal of Nematology**. 35(3): 334.
- DEPREZ, T. *et al.*, (2005). Nemys. World Wide Web electronic publication. www.nemys.ugent.be. Acessado em 2007.
- DERYCKE, S; FONSECA, G.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J.; VINCX, M.; MOENS, T. (2008) .Disentangling taxonomy within the *Rhabditis (Pellioiditis) marina* (Nematoda, Rhabditidae) species complex using molecular and morphological tools. **Zoological Journal of the Linnean Society**. 152: 1-15.
- DORRIS, M.; DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. (1999). Molecular Analysis of Nematode Diversity and the Evolution of Parasitism. **Parasitology Today**. 15(5): 188-193.
- EHLERS, R. U. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 56: 623-633.
- ELMEGREN, R. (1976). Baltic benthos communities and the role of meiofauna. **Contribution Askö Laboratory University of Stockolm, Sweden**, 14: 1-31.
- ESTEVEZ, A. M.; MARIA, T. F.; WANDENESS, A. P. (2003). Population structure of *Oncholaimus cobbi* (Nematoda: Oncholaimidae) in a tropical tidal flat. **Journal of the Marine Biological Association of the Kingdom**. 83: 903-904.
- ESTEVEZ, A. M.; MARIA, T. F.; WANDENESS, A. P. (2004). Population structure of *Comesoma arenae* (Nematoda: Comesomatidae) in a Brazilian tropical tidalflat, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. 21(4): 775-777.
- FEITOSA, F. A. N. (1988). **Produção primária do fitoplâncton relacionada com parâmetros bióticos e abióticos da Bacia do Pina (Recife – Pernambuco, Brasil)**.

Recife, Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, 220 p.

FITCH, W. (1977). On the Problem of Discovering the Most Parsimonious Tree. **The American Naturalist**. 111(978): 223-257.

FLEEGER, J. W. & DECHO, A. W. (1987). Spatial variability of interstitial meiofauna: a review. **Stygologia**. 3(1): 35-54.

FOUCHER, A. L. J. L.; BONGERS, T.; NOBLE, L. R.; WILSON, M. J. (2004). Assessment of nematode biodiversity using DGGE of 18S rDNA following extraction of nematodes from soil. **Soil Biology & Biochemistry**. 36: 2027-2032.

FOUCHER, A. & WILSON, M. (2002). Development of a polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis technique to study nematode species biodiversity using the 18s rDNA gene. **Molecular Ecology Notes**. 2: 45–48;

GARCIA-VARELA, M.; MULLIN, P. G.; HARRIS, T. S.; SZALANSKI, A. L.; POWERS, T. O.; ADAMS, B. J. (2003). A phylogenetic analysis of the order Tylenchida (Nematoda) based on 18s RNA ribosomal DNA sequences: Characters, support, and tests of systematic hypotheses. **Journal of Nematology**. 35(3): 339.

GERLACH, S. A. (1954). Freilebende Nematoden aus der Lagoa Rodrigo de Freitas (Rio de Janeiro). **Zoologischer Anzeiger**. 153: 135-143.

GERLACH, S. A. (1956a). Brasilianische Meeres-Nematoden I (Ergebnisse eines Studienaufenthaltes na der Universität São Paulo). **Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo**. 1/2: 3-69.

GERLACH, S. A. (1956b). Die Nematodenbeseiedlung des tropischen Brandungsstrandes von Pernambuco, Brasilianische Meeres Nematoden II. **Kieler Meeresforschungen**. 12(2): 202-218.

GERLACH, S. A. (1957a). Marine Nematoden aus dem Mangrove-Gebiet von Cananea (Brasilianische Meeres-Nematoden III). Abh. Math. – Naturw. Kl. **Academie der Wissenschaften Mainz**. 5: 129-176.

- GERLACH, S. A. (1957b). Die Nematodenfauna des Sandstrandes na der küste von Mittelb (Brasilianische Meeres-Nematoden IV). **Mittheihungen aus der Zoologischen Mueum in Berlim**. 33(2): 411-459.
- GERLACH, S. A. & SCHRAGE, M. (1971). Life cycles in marine meiobenthos. Experiments at various temperatures with *Monhystera disjuncta* and *Theristus pertenuis* (Nematoda). **Marine Biology**. 9: 274-280.
- HALL, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41: 95-98.
- HALL, B. G. (2001). **Phylogenetics Trees Made Easy. A How to Manual for Molecular Biologists**. Sinauer Associates. Inc. Sunderland, Masssachusetts, 179p.
- HAMMOND, P. M. (1992). Species inventory. *In: Global Diversity, Status of the Earth's Living Resources*. Chapman & Hall, London, p. 17-39.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B**. 270: 313–321.
- HEIP, C.; VINCX, M.; SMOL, N.; VRANKEN, G. (1982). The systematics and ecology of free-living marine nematodes. Helminthological Abstracts – Series B, **Plant Nematology**. 51: 1-31.
- HEIP, C.; VINCX, M.; VRANKEN, G. (1985). The ecology of marine nematodes. **Oceanography and Marine Biology: an Annual Review**. 2: 399-489.
- HODDA, M. & NICHOLAS, W. L. (1986). Temporal changes in litoral meiofauna from the Hunter River estuary. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**. 37: 729-741
- HOLTERMAN, M. H. M.; VAN DEN ELSEN, S. J. J.; VAN MEGEN, H. H. B.; VAN DER WURFF, A. W. G.; HELDER, J. (2003). Phylogeny of the phylum Nematoda based on small subunit ribosomal DNA sequences. **Journal of Nematology**. 35(3): 343.
- HOLTERMAN, M.; VAN DER WURFF, A.; VAN DEN ELSEN, S.; VAN MEGEN, H.; BONGERS, T.; HOLOVACHOV, O.; BAKKER, J.; HELDER, J. (2006). Phylum-Wide

- Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships among Nematodes and Accelerated Evolution toward Crown Clades. **Molecular Biology and Evolution**. 23(9):1792-1800.
- HOPPER, B. B. E. (1969). Marine nematodes of Canada II: Marine nematodes from the Minas Basin-Scors Bay area of the bay of Fundy, Nova Scotia. **Canadian Journal of Zoology**. 46: 655-661
- HÖSS, S.; BERGTOLD, M.; HAITZER, M.; TRAUNSPURGER, W.; STEINBERG, C. E. W. (2001). Refractory dissolved organic matter can influence the reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). **Freshwater Biology**. 46: 1-10.
- HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetics trees. **Bioinformatics Applications Note**. 17(8): 754-755.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J. P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**. 294: 2310-2314.
- HUGOT, J. P.; BAUJARD, P.; MORAND, S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. **Nematology**. 3: 199-208.
- JOHNIGK, S. A. & EHLERS, R. U. (1999). *Endotokia matricia* in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. **Nematology**. 1: 717-726.
- KAMPFER, S. & STURMBAUER, C.; OTT, J. (1998). Phylogenetic analysis of rDNA sequences from adenophorean nematodes and implications for the Adenophorea-Secernentea controversy. **Invertebrate Biology**. 117(1): 29-36.
- KIONTKE, K.; CHIOU, S.; GAVIN, N. G.; RAYNES, Y.; FITCH, D. H. A. (2003). Molecular phylogeny and morphological evolution of rhabditid nematodes. **Journal of Nematology**. 35(3): 347.
- LAMBSHEAD, P. L. D. (1993). Recent developments in marine benthic biodiversity research. **Océanis**. 19(6): 5-24.
- LAMBSHEAD, P. J. D. (2004). Marine nematode biodiversity. *In*: **Nematode morphology, physiology and ecology**. Chen, Z. X.; Chen, S. Y.; Dickson, D. W. (eds.), Tsinghua: Tsinghua University Press. 1: 438-492.

- LI, J.; VINCX, M. (1993). The temporal variation of intertidal nematodes in the Westerschelde I – The importance of an estuarine gradient. **Netherlands Journal of Aquatic Ecology**. 27(2-4): 319-326.
- LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. (2003). The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**. 18: 65-66.
- LITVAITIS, M. K.; BATES, J. W.; HOPE, W. D.; MOENS, T. (2000). Inferring a classification of the Adenophorea (Nematoda) from nucleotide sequences of the D3 expansion segment (26/28S rDNA). **Canadian Journal of Zoology**. 78(6): 911-922.
- LORDELLO, L. G. E. & ZEM, A. C. (1977). Ocorrência de endotoquia matricida em um nematóide da família Rhabditidae. *In* **II Reunião de Nematologia**. Publicação n.2, Sociedade Brasileira de Nematologia. Piracicaba-SP, Brasil, p. 41-43.
- LORENZEN, C. J. (1967). Determination of chlorophyll and pheopigments spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**. 12: 343-346.
- LORENZEN, S. (1977). Revision der Xyalidae (freilebende Nematoden) auf der Grundlage einer kritischen Analyse von 56 Arten aus Nord-und Ostsee. **Veröffentlichungen des Institut für Meeresforschungen Bremerhaven**. 16: 197-261.
- LORENZEN, S. (1978). The system of the Monhysteroidea (Nematodes) – a new approach. **Zoologische Jahrbücher Systematik**. 105: 515-536.
- LORENZEN, S. (1981). Entwurf eines phylogenetischen Systems der freilebenden Nematoden. **Veröffentlichungen des Institut für Meeresforschungen Bremerhaven**, Supplement, 7: 1-449.
- LORENZEN, S. (1994). **The Phylogenetic Systematic of free living nematodes**. Translation of Lorenzen, S. (1981) by Platt, H. M. (ed.), The Ray Society, vol. 162, London.
- MAGGENTI, A. (1981). **General Nematology**, Springer-Verlag, New York.
- MAGGENTI, A. R. (1983). Nematode higher classification as influenced by species and families concepts. *In*: **Concepts of Nematode Systematics**, Stone, A.R.; Platt, H.M.; Khalil, L.F. (eds.), Academic Press, London, p. 25-40.

- MAIA, P. R. (1995). **Composição e densidade fitoplânctonica na Bacia do Pina, Recife-PE**. 1995. Recife, Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, 135 p.
- MALAKHOV, V. V. (1994). **Nematodes - Structure, Development, Classification, and Phylogeny**. Hope, D. (ed.), Smithsonian Institution Press, Washington and London, 286p.
- MALLET, J. & WILLMOTT, K. (2003). Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? **Trends in Ecology and Evolution**. 18(2): 57-59.
- MANACHINI, B. (1997). **Biodiversity of Nematoda assemblage Antarctic sea bed**. Thesis of International Nematology Course. Universiteit Gent, 73p.
- MAY, R. M. (1988). How many species are there on Earth? **Science**. 241: 1441-1449.
- MELDAL, B. H. M.; DEBENHAM, N. J.; DE LEY, P.; DE LEY, I. T.; VANXETEREN, J. R.; VIERSTRAETE, A. R.; BERT, W.; BORGONIE, G.; MOENS, T.; TYLER, P. A.; AUSTEN, M. C.; BLAXTER, M. L.; ROGERS, A. D.; LAMBSHEAD, P. J. D. (2007). An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. **Molecular Phylogenetics Evolutions**. 42: 622-636.
- MEYL, A. H. (1956). Beiträge zur freilebenden Nematodenfauna Brasiliens, 1: Archt neue Nematodenarten der überfamilie Dorylaimoidea. **Nematologia**. 1: 311-325.
- MEYL, A. H. (1957). Beiträge zur freilebenden Nematodenfauna Brasiliens, 2: Weitere neue oder wening bekannte Nematodenarten. **Kieler Meresforschungen**. 13: 125-133.
- MOENS, T.; TRAUNSPURGER, W.; BERGTOLD, M. (2006). Ecology of free-living benthic Nematodes. *In*: **Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy**. A. Eyualem, I. Andrassy, W. Traunspurger (eds.). CABI Publishing, Massachusetts. p. 105-131.
- MOENS, T. & VINCX, M. (1998). On the cultivation of free-living marine and estuarine Nematode. **Helgoländer Meeresuntersuchungen**. 52(2): 115-139.
- MOENS, T. & VINCX, M. (2000a). Temperature, salinity and food thresholds in two brackishwater bacterivorous nematode species: assessing niches from food absorption and respiration experiments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 243: 137–154.

- MOENS, T. & VINCX, M. (2000b). Temperature and salinity constraints on the life cycle of two brackish-water nematode species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 243: 115-135.
- MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; SAINT, C. P. (2002). Molecular biology techniques in parasite ecology. **International Journal for Parasitology**. 32: 551-562.
- NADLER, S. A. (1992). Phylogeny of some ascaridoid nematodes, inferred from comparison of 18S and 28S rRNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**. 9: 932-944.
- NADLER, S. A.; DE LEY, P.; MUNDO-OCAMPO, M.; SMYTHE, A. B.; STOCK, S. P.; BUMBARGER, D.; ADAMS, B. J.; DE LEY, I. T.; HOLOVACHOV, O.; BALDWIN, J. G. (2006). Phylogeny of Cephalobina (Nematoda): Molecular evidence for recurrent evolution of probolae and incongruence with traditional classifications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 40: 696-711.
- NASCIMENTO, F. C. R. (2001). **Aspectos ecológicos da comunidade fitoplanctônica da Bacia do Pina associados com alguns parâmetros abióticos (climatológicos e hidrológicos)**. Recife, Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Departamento de oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 114p.
- NERES, P. F. (2006). **A precipitação pluviométrica pode causar o fenômeno de endotokia matricida em Nematoda estuarino?** Recife, Monografia (Graduação em ciências biológicas -bacharelado). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 39p.
- NICHOLAS, W. L. & TRUEMAN, J. W. H. (2002). The taxonomy of the family Xyalidae Chitwood, 1951 (Monhysterida: Nematoda): a cladistic analysis. **Nematology**. 4 (4): 453-470.
- PEGOVA, A. N.; KRASNOVA, E. D.; ALESHIN, V. (2004). Evidence from the small and large ribosomal RNA structure suggest that *Anoplostoma rectospiculum* Gal'tsova, 1976 (Nematoda: Anoplostomatidae) is a member of the superfamily Enoploidea, not Oncholaimoidea. **Nematology**. 6(3): 413-421.
- POINAR, G. O. (1983). The Natural History of Nematodes. **The Journal of Parasitology**. 69(3): 477.

- POWERS, T. (2004). Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**. 42: 367-83.
- RODRIGUES, A. C. L. (2002). **Variação espacial da meiofauna com ênfase à nematofauna na Bacia do Pina, Pernambuco, Brasil**. Recife. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco. 92p.
- ROGERS, A. D. & LAMBSHEAD, P. J. D. (2004). Molecular studies of nematode diversity; past, present and future. *In: Nematology Monographs and Perspectives Volume 2*. Cook, R.; Hunt, D. J. (eds) Brill Academic Publishing, Hendon, VA.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics Applications Note**. 19(12): 1572-1574.
- RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. (2005). **Zoologia dos invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca, 1168p.
- SAITOU, N. & NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. 4: 406-425.
- SCOTLAND, R.; HUGHES, C.; BAILEY, D.; WORTLEY, A. (2003). The Big Machine and the much-maligned taxonomist. **Systematics and Biodiversity**. 1: 139-143.
- SHARMA, J. (1985). **A study of the nematode fauna of three estuaries in the Netherlands**. PhD Thesis. Rijksuniversiteit Gent: Gent, Belgium. 279 p.
- SHARMA, J.; SUN, L.; HOPE, W. D.; FERRIS, V. R. (2006). Phylogenetic Relationships of the Marine Nematode Family Comesomatidae. **Journal of Nematology**. 38(2): 229-232.
- SILVA, M. C. (2004). **A Meiofauna como Estoque Alimentar para Peixes Juvenis (Gobiidae e Gerreidae) do Canal de Santa Cruz, Itamaracá, Pernambuco com Ênfase aos Nematoda Livres**. Recife, Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, 92p.
- SILVA-CUNHA, M. G. G.; FEITOSA, F. A.; ALMEIDA, C. D. P. (1990). Diatomáceas da Bacia do Pina (PE). *In: XIV Reunião Nordestina de Botânica*. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, p. 28.

- SILVA, J. A. B. & MELLO, R. L. S. (1991). Informações preliminares sobre a malaofauna do rio Capibaribe e da Bacia do Pina, Recife-PE. *In: Congresso Nordestino de Ecologia, IV*. Recife, Sociedade Nordestina de Ecologia. p. 17.
- SITES, J. W. & MARSHALL, J. C. (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. **Trends in Ecology and Evolution**.18: 462–470.
- SOETAERT, K.; HERMAN, P. M. J.; KROMKAMP, J. (1994). Living in the twilight: estimating net phytoplankton growth in the West-erscheld estuary (The Netherlands) by means of an ecosystem model (MOSES). **Journal of Plankton Research**. 16: 1277-1301.
- SOETAERT, K.; VINCX, M.; WITTOECK, J.; TULKENS, M. (1995). Meiobenthic distribution and nematode community structure in five European estuaries. **Hydrobiologia**. 311: 185-206.
- SOMERFIELD, P. J.; FONSECA-GENEVOIS, V.; RODRIGUES, A. C. L.; CASTRO, F. J. V.; SANTOS, G. A. P. (2003). Factores affecting meiofaunal community structure in the Pina Basin, in urbanized embayment on the coast of Pernambuco, Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. 83: 1209-1213.
- SUDHAUS, W. (1976). Vergleichende Untersuchungen zur Phylogenie. Systematik, Ökologie, Biologie und Ethlogie der Rhabditidae (Nematoda). **Zoologica**. 43: 1-229.
- SWOFFORD, D. L. (2000). **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b4a**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H. & VOGLER, A. P. (2003). A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**. 2(18): 70-74.
- TIETJEN, J. H.; LEE, J. J.; RULLMAN, J.; GREENGART, A.; TROMPETER, J. (1970). Gnotobiotic culture and physiological ecology of the marine nematode *Rhabditis marina* Bastian. **Limnology and Oceanography**. 15, 535-543.
- TIETJEN, J. H. & LEE, J. J. (1972). Life cycles of marine nematodes. Influence of temperature and salinity on the development of *Monhystera denticulata* Timm. **Oecologia**. 10: 167-176.

- TIETJEN, J. H. & LEE, J. J. (1977). Life history of marine nematodes. Influence of temperature and salinity on the reproductive potential of *Chromadorina germanica* Bu'tschli. **Mikrofauna Meeresboden**. 15: 263-270.
- VEREKEY, V. (2007). **Atualização do conhecimento taxonômico dos Nematoda na costa brasileira e sua ecologia na praia de Tamandaré-PE (Brasil)**, Recife, Tese (Doutorado em Oceanografia), Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 139p.
- VITIELLO, P. (1967). Nématodes libres marins de Roscoff. I. Description de cinq espèces nouvelles. **Cahiers Biologie Marine**. 8: 403-416.
- VRANKEN, G. (1985). **Een autoecologische studie van brakwaternematoden**. Ph.D. Thesis, University of Gent, Belgium, 282 p.
- VRANKEN, G.; HERMAN, P. M. J.; HEIP, C. (1988). Studies of the life-history and energetics of marine and brackish-water nematodes. I. Demography of *Monhystera disluncta* at different temperature and feeding conditions. **Oecologia**. 77: 296-301.
- WALTON, A. C. (1923). Some new and little known nematodes. **Journal of parasitology**. 10(2): 59-70.
- WARWICK, R. M. (1981). The influence of temperature and salinity on energy partitioning in the marine nematode *Diplolaimelloides brucei*. **Oecologia**. 51: 318-325.
- WARWICK, R. M. (1984). Species size distribution in marine benthic communities. **Oecologia**. 61: 32-41.
- WARWICK, R. M.; HOWARD, M. P.; SOMERFIELD, P. J. (1998). **Free-living Marine Nematodes – Part III Monhysterids**. Synopses of the British Fauna (New Series). Eds. R. S. K. Barnes e J. H. Cothers. 296p.
- WARWICK, R. M. & PRICE, R. (1979). Ecological and metabolic studies on free-living nematodes from an estuarine mud-flat. **Estuarine and Coastal Marine Science**. 9: 257-271.
- WETZEL, R. G. E. & LIKENS, G. E. (1990). **Limnological analysis**. New York, Springer-Verlag. 2nd. 338p.

Neres, P. F. Análises morfológica e filogenética de *Daptonema* sp. nov...

WIESER, W. (1953). Die Beziehungen zwischen Mundhöhlengestalt, Ernährungsweise und Vorkommen bei freilebenden marinen nematoden. **Arkive Zoologisch**, ser II. 4: 439-484.

WIESER, W. (1956). Free-living marine nematodes III. Axonolaimoidea and Monhysteroidea. **Acta Universitatis Lundensis**. 52(13): 1-115.