Gisele Rodrigues Tiseo

**Conformação gonadal, caracterização histoquímica e
ultraestrutural da gônada masculina e
espermatozoides em espécies de águas-vivas
(Cubozoa e Scyphozoa, Medusozoa, Cnidaria)**

**Gonadal structure, histochemistry and ultrastructural
characterization of male gonad and sperm of
jellyfish species (Cubozoa and Scyphozoa,
Medusozoa, Cnidaria)**

**São Paulo
2016**

Conformação gonadal, caracterização histoquímica e
ultraestrutural da gônada masculina e
espermatozoides em espécies de águas-vivas
(Cubozoa e Scyphozoa, Medusozoa, Cnidaria)

Gonadal structure, histochemistry and ultrastructural
characterization of male gonad and sperm of
jellyfish species (Cubozoa and Scyphozoa,
Medusozoa, Cnidaria)

Gisele Rodrigues Tiseo

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

Orientador: Prof. Dr. André Carrara Morandini

São Paulo
2016

Agradecimentos

Agradeço a agência de fomento FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo Proc. MS 2014/08785-0, Proc. BEPE 2015/15527-0 e Proc. Temático 2011/50242-5) pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Instituto Oceanográfico, CEBIMar e Universidade de São Paulo pela infra-estrutura utilizada.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Carrara Morandini pela amizade, apoio, sugestões e compreensão ao longo desses dois anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Peter L. Harrison, da Southern Cross University, Austrália, por ter me recebido em seu laboratório e grupo de pesquisa e auxiliado no desenvolvimento do projeto BEPE. Obrigada pela oportunidade de conhecer novas fronteiras e pelo intercâmbio de conhecimento.

Agradeço de todo o coração aos técnicos Lea Taylor, Paul Kelly, Maxine Daves e Barbara Harrison pela amizade e auxílio nas coletas, preparações das amostras e infinitas conversas. Obrigada por serem minha pequena “família” no exterior.

Ao Prof. Jamie Seymour por ter me recebido em seu laboratório na James Cook University em Cairns, Austrália. Agradeço pelo auxílio nas coletas e troca de conhecimento.

Aos alunos de pós-graduação do Prof. Jamie Seymour – Robert Courtney e Sally Browning pela ajuda nas coletas em Queensland e curta convivência.

Ao Prof. Dr. Alberto Ribeiro responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências.

Aos integrantes do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Genética – Camila e Alexandre – pelas discussões produtivas e dicas de terminologias. Aos técnicos Márcio Valentim Cruz e Sheila Carmo pelos cafés e amizade. E ao técnico de microscopia eletrônica de transmissão Waldir Caldeira pela amizade e auxílio em todas as preparações de ultraestrutura.

Aos técnicos do Laboratório de Histologia do Departamento de Zoologia, Enio Mattos e Phillip Lenktaitis obrigada pela amizade e auxílio nas preparações de histologia.

Aos integrantes do Laboratório de Cultivo e Estudos em Cnidaria – Júlia Beneti, Renato Nagata, Henrique Alves, Clarissa Garbi Molinari, Priscila Cunha, Leandro Santos, Max Maronna, Mayara Jordão, Edgar Gamero, Jonathan Lawley e Flávia Murari – pela convivência, amizade, ajudas em coletas, discussões produtivas e apoio. Muito obrigada por tudo!

Aos meus amigos (e respectivos) que sempre estão (e estarão) lá por mim – Jaqueline Mariano, Bruna Gasbarra, Laianne Mendes, Roberto Radesca, Jefferson Platini, Pedro Henrique, Renata Bannitz, Carla Peres de Paula, Luiza Saad, Bruna Trevisan, Amanda Yano, Thalma e integrantes da República SF. Muito obrigada pela amizade e suporte!!!

Aos amigos do Departamento de Zoologia e do Curso de Verão em Zoologia – Rachel, Rafael Henrique, Adriana, Mariane, Carol, Guilherme, Alipio, Ana Bolatto, Caio's, Gabriel, Isabela, Jorge, Ligia, Marilia, Amanda, Pedro's, Stefania, Thalles, Victor, Loboda, Licia, Kleber, Karla Soares, Karla Paresque, Carolina Nisa, Anderson Tama, Flávia Pentean e Juliana Bertacini – obrigada pela amizade, convivência e risadas!

Agradeço ao meu namorado – Lucas Natri – pelo apoio, cumplicidade e compreensão (mesmo nas épocas malucas de entrega de relatório). Obrigada por estar presente mesmo à distância e me fazer feliz.

Por fim, agradeço à minha família – Marcos, Marli e Jessica – sem vocês nada em minha vida faria sentido e nada seria possível. A realização de mais este trabalho só foi possível graças ao eterno apoio e suporte que vocês me proporcionam diariamente. Amo vocês incondicionalmente e agradecerei por fazer parte desta família hoje e sempre!

Sumário

Resumo.....	6
Abstract	8
Introdução Geral.....	10
Ciclo de Vida, Reprodução sexuada e descrição do Sistema reprodutor masculino.....	12
Espermiotaxonomia.....	15
Considerações Finais.....	19
Referências	24

Resumo

A filogenia dos diferentes grupos de Cnidaria permanece de certa forma pouco resolvida, uma vez que não há um consenso de quais são as relações entre as diferentes classes e ordens que compõem o filo. A espermiotaxonomia vem sendo utilizada como critério filogenético em diversos grupos de Metazoa. Para Cnidaria são poucos os trabalhos descrevendo a morfologia do sistema reprodutor masculino e do espermatozoide em nível de microscopia de luz e de microscopia eletrônica de transmissão. Exemplares das espécies *Tamoya haplonema* e *Chiropsalmus quadrumanus* (Cubozoa), *Lychnorhiza lucerna* e *Chrysaora lactea* (Scyphozoa), foram coletados próximos ao Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo e junto às bases do Instituto Oceanográfico da USP (Base de Cananéia e Base de Ubatuba) nos meses de agosto a outubro de 2014 e de abril a junho de 2015. Amostras das espécies *Carukia barnesi*, *Chironex fleckeri* e *Chiropsella bronzie* (Cubozoa) e *Cassiopea* sp. (Scyphozoa) foram coletadas ao longo da costa leste australiana de março a maio de 2016. Para a descrição histológica e histoquímica da gônada masculina, amostras do tecido gonadal foram fixadas em paraformaldeído 4% preparado com água do local da coleta e tampão fosfato de sódio 0,2M por 24 horas e as amostras foram processadas de acordo com o protocolo para historesina. Fragmentos da gônada masculina foram fixados em solução Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% e 0,08% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4) e solução de Glutaraldeído (2.5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1M em água do mar filtrada a vácuo, pH 7.2-7.4). Em seguida as amostras foram processadas de acordo com protocolo de microscopia eletrônica transmissão. Na presente dissertação é descrito de forma comparada o processo de espermatogênese dos cubozoários *T. haplonema* e *C. quadrumanus* através da histologia e histoquímica evidenciando o ciclo gonadal de ambos (capítulo 1). Descreve-se a espermatogênese e morfologia do espermatozoide, através da microscopia de luz e ultraestrutura para as espécies de Cubozoa *T. haplonema*, *C. quadrumanus*, *Carukia barnesi*, *Chironex fleckeri* e *Chiropsella bronzie* (Capítulo 2). Para as espécies de Scyphozoa *Lychnorhiza lucerna*, *Chrysaora lactea* e *Cassiopea* sp. descreve-se o processo de

espermatogênese através da microscopia de luz e da microscopia eletrônica de transmissão, além do aspecto macroscópico da gônada masculina (Capítulo 3). Adicionalmente, nas considerações finais, é ressaltada a morfologia comparada dos espermatozoides de todas as espécies aqui estudadas evidenciando possíveis características únicas de cada classe, enumerando eventuais caracteres diagnósticos dos espermatozoides das espécies estudadas (Capítulo 4).

Palavras-chave: Cnidaria, medusas, reprodução, espermiotaxonomia, espermatozoide, MET.

Abstract

The phylogeny of the different groups of cnidarians remains elusive, since there is no consensus of what are the relationships between the different classes and orders that comprise the phylum. The spermiotaxonomy has been used as phylogenetic criteria in different groups of Metazoa. For Cnidaria there are few studies describing the morphology of the male reproductive system and sperm at the level of light microscopy and transmission electron microscopy. Specimens of the species *Tamoya haplonema* and *Chiropsalmus quadrumanus* (Cubozoa), *Lychnorhiza lucerna* and *Chrysaora lactea* (Scyphozoa), were collected near the Marine Biology Center of the University of São Paulo and near the bases of the Oceanographic Institute of USP (Cananéia and Ubatuba Bases) from August to October 2014 and from April to June 2015. Samples of the species *Carukia barnesi*, *Chironex fleckeri* and *Chiropsella bronzie* (Cubozoa) and *Cassiopea* sp. (Scyphozoa), were collected along the Australian east coast from March to May 2016. For histological and histochemistry description of the male gonads, samples were fixed in 4% paraformaldehyde prepared with water from the collection site and sodium phosphate buffer 0.2M for 24 hours. After that, the samples were processed following the protocol for historesin. Fragments of male gonads were fixed in modified Karnovsky solution (2.5% glutaraldehyde and 0.08% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4) and glutaraldehyde (2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1M sodium in seawater vacuum Millipore filtered, pH 7.2-7.4). Then the samples were processed according to transmission electronic microscopy protocol. In this dissertation it is described the comparative spermatogenesis of the cubozoans *T. haplonema* and *C. quadrumanus*, under histology and histochemistry, showing the gonadal cycle (Chapter 1). We also describe the spermatogenesis and sperm morphology, under light microscopy and ultrastructure, for the Cubozoa species *T. haplonema*, *C. quadrumanus*, *Carukia barnesi*, *Chironex fleckeri* and *Chiropsella bronzie* (Chapter 2). For the Scyphozoa species, *Lychnorhiza lucerna*, *Chrysaora lactea* and *Cassiopea* sp., we describe the spermatogenesis process, under light transmission electronic microscopy, describing the macroscopic structure of the male gonad (Chapter 3). Additionally, in

the final chapter, it is highlighted the comparative morphology of sperm of all species studied, evidencing possible unique features of each class, enumerating possible sperm characters (Chapter 4).

Key-words: Cnidaria, jellyfish, reproduction, spermiotaxonomy, sperm, histology, MET.

Introdução Geral

O filo Cnidaria é considerado um grupo monofilético composto por dois grandes clados, Anthozoa e Medusozoa (Collins 2002; Collins et al. 2006), sendo esta divisão bem suportada por caracteres morfológicos e moleculares (Schuchert 1993; Bridge et al. 1995; Odorico and Miller 1997; Collins 2002; Daly et al. 2007; Kayal et al. 2013; Zapata et al. 2015). Seus representantes formam um grupo diverso de animais relativamente simples caracterizados pela presença da cnida (Odorico and Miller 1997; Collins 2002; Daly et al. 2007; Collins 2009; Reft and Daly 2012) e diversidade do ciclo de vida com a presença ou ausência da alternância de gerações (Bridge et al. 1995).

A filogenia dos diferentes grupos de Cnidaria ainda permanece de certa forma pouco resolvida, uma vez que não há um consenso de quais são as relações entre as diferentes classes e ordens que compõem o filo. Os problemas classificatórios em Cnidaria têm atraído o interesse de zoólogos (Werner 1973a) e são diversos os trabalhos que apresentam teorias e hipóteses filogenéticas tentativas para classificar o grupo. As principais divergências concernem na problemática sobre: a diversificação dos ciclos de vida e qual dos dois estágios ou formas corporais (pólipo ou medusa) seria o mais basal (Werner 1973a; Werner 1973b; Bridge et al. 1992; Schuchert 1993; Bridge et al. 1995; Odorico and Miller 1997); na relação entre as quatro das atuais classes de Medusozoa (Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa e Staurozoa); e entre os subgrupos de Hydrozoa e ordens de Scyphozoa (Marques and Collins 2004; Dawson 2004; Collins et al. 2006; Daly et al. 2007; Kayal et al. 2012; Kayal et al. 2013; Zapata et al. 2015).

Kayal et al. (2013) ampliaram a amostragem dos genomas mitocondriais já apresentados para Cnidaria a fim de reavaliar as relações filogenéticas dentro do filo. Suas análises, baseadas em dados de mitogenômica apoiaram relações já propostas, como o monofiletismo do subfilo Medusozoa, das classes Cubozoa, Staurozoa e Hydrozoa, da subclasse Discomedusae e das ordens Carybdeida e Chirodropida. Porém, certos agrupamentos propostos anteriormente foram refutados como Scyphozoa uma vez que Discomedusae se agrupa com Hydrozoa, e os demais grupos de

Medusozoa que não formam nenhum grupo observado em trabalhos anteriores. Embora os autores apresentem a segunda filogenia mais atual de Cnidaria, esta ainda apresenta inconsistências, levando os próprios a afirmarem que as relações mostradas entre os diferentes táxons que compõem o filo são hipotéticas e sujeitas a testes. Deste modo, estudos específicos nos diferentes grupos podem promover uma melhor compreensão das relações entre os Cnidaria como um todo.

Existem aproximadamente 200 morfoespécies descritas de Scyphozoa ao redor do mundo (Daly et al. 2007). Destas, 22 espécies são registradas no Brasil (Mianzan and Cornelius 1999; Marques et al. 2003; Morandini et al. 2005) e 38 na Austrália (Gershwin et al. 2010). A Classe Scyphozoa compreende dois grupos: as subclasses Coronamedusae (ordem Coronatae) e Discomedusae (ordens Semaestomeae e Rhizostomeae) (Calder 2009). A classe distingue-se dos demais Medusozoa pela presença da estrobilização, órgãos sensoriais marginais (ropálios) e o estágio de éfira (Marques and Collins 2004; Collins et al. 2006; Daly et al. 2007).

Dentro de Cnidaria, a classe Cubozoa é a que possui menor número de espécies descritas, 36 (Daly et al. 2007). As cubomedusas são nadadoras ágeis e extremamente eficientes (Collins et al. 2011; Colin et al. 2013) caracterizadas por exibirem quatro ropálios perradiais, contendo olhos complexos com ocelos, corpos vítreos, lentes, córneas e retinas e, em cada um dos cantos da umbrela nota-se uma extensão espessa da margem denominada pedálio (Pearse and Pearse 1978; Daly et al. 2007). A classe é dividida em duas ordens Chirodropida e Carybdeida sendo que nesta última, cada pedálio porta somente um único tentáculo (Bentlage and Lewis 2012).

No Brasil as espécies de Scyphozoa *Lychnorhiza lucerna* (Rhizostomeae) e, *Chrysaora lactea* (Semaestomeae) são abundantes (Morandini et al. 2005; Nogueira Júnior et al. 2010). As cubomedusas *Tamoya haplonema* (Carybdeida) e *Chiropsalmus quadrumanus* (Chirodropida) possuem abundância menor, mas são relativamente comuns (Nogueira Júnior et al. 2010).

Na Austrália as espécies do gênero *Cassiopea* normalmente são encontrados com a umbrellas apoiada no substrato e a superfície oral para cima (Bigelow 1900; Morandini et al. 2016b) e podem ser encontradas em Lizard Island lagoon e em Vlashoff Cay (Cairns) (Templeman and Kingsford

2010; Templeman and Kingsford 2012). As cubozoas *Carukia barnesi*, *Chironex fleckeri* e *Chiropselaa bronzie* são relativamente abundantes junto a Grande Barreira de Recifes de Coral em Queensland, leste da Austrália (Williamson et al. 1996; Fenner and Hadok 2002; Tibballs 2006; Gershwin and Kingsford 2008; Kingsford et al. 2012).

Ciclo de Vida, Reprodução sexuada e descrição do Sistema reprodutor masculino

O ciclo de vida metagenético ocorre em quatro das cinco classes de Cnidaria: Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa e Staurozoa (Bridge et al. 1995; Odorico and Miller 1997; Marques and Collins 2004; Morandini et al. 2016a). De um modo geral o ovo fertilizado se desenvolve em uma larva plânula que ao assentar se diferencia em um pólip. O pólip – estágio bentônico – se reproduz assexuadamente dando origem a uma ou mais medusas livre-natantes dióicas, que quando adultas se reproduzem sexuadamente (Morandini et al. 2014). Em Scyphozoa o pólip é denominado cifístoma e pode reproduzir-se assexuadamente originando outros pólipos (brotamento ou formação de cistos) ou originar uma ou mais medusas jovens através de fissões transversais (estrobilização) (Arai 1997; Adler and Jarms 2009). A estrobilização tradicionalmente é caracterizada como sendo polidisco – com a formação de muitos discos e várias medusas; ou monodisco – em que somente uma éfira é formada por vez (Bigelow 1900; Morandini et al. 2004; Holst et al. 2007; Schiariti et al. 2008). As ordens Coronatae e Semaestomeae apresentam um padrão polidisco e Rhizostomeae um padrão monodisco. No entanto, estudos sobre o ciclo de vida de algumas espécies ressaltam que nem todos os membros de Rhizostomeae estrobilizam no padrão monodisco e eram denominados polidisco (*e.g.* tabela 1 de Schiariti et al. 2008). Apesar de o número de éfiras ser maior que um, ele pode ser considerado baixo (2-10). Com isso alguns autores sugerem a utilização de um termo adicional para melhor definir esse processo encontrado: oligodisco (Fuentes et al. 2011).

Dentro de Scyphozoa, das cerca de 200 espécies descritas, 49 tem seu ciclo de vida conhecido (24,5%; Jarms 2010) e destes 47 são metagenéticos. O ciclo de vida de *L. lucerna*,

Cassiopea sp. e *C. lactea* seguem o padrão para Scyphozoa. A estrobilização polidisco produz sempre três éfiras em *L. lucerna* e de 2 a 10 éfiras em *C. lactea*, e sempre é monodisco em *Cassiopea* sp. (Bigelow 1900; Morandini et al. 2004; Schiariti et al. 2008).

O ciclo de vida dos cubozoários *T. haplonema* e *C. quadrumanus* ainda não foi descrito. Porém, para os cubozoários *Chironex fleckeri* e *Carukia barnesi* Southcott (1956), Yamaguchi and Hartwick (1980) e Courtney et al. (2016) descrevem o ciclo de vida enfatizando o padrão metagenético e evidenciando diferenças no processo assexuado em que um pólipó se metamorfoseia em uma única cubomedusa (Werner 1973a; Werner 1973b; Werner 1975; Straehler-pohl and Jarms 2011).

O gonocorismo ocorre na maioria dos cifozeários (Berrill 1949) e Cubozoa é a única classe exclusivamente gonocórica (Fautin 1992). No entanto, espécies de cifomedusas como *Chrysaora hysoscella* e do gênero *Cassiopea* são conhecidas por apresentarem hermafroditismo e gonocorismo (Berrill 1949; Hofmann and Hadfield 2002). Para a maioria dos cnidários dióicos, indivíduos de sexos diferentes são macroscopicamente indistinguíveis, porém algumas características distintivas relacionadas à diferenciação sexual podem estar presentes em indivíduos maduros: são as próprias gônadas ou estruturas associadas a elas (Fautin 1992). Em alguns casos em Scyphozoa e Cubozoa as gônadas podem ser diferenciadas quando maduras pela coloração (Werner 1973a; Fautin 1992; Lucas and Reed 2010; Iguchi et al. 2010; Schiariti et al. 2012). Na espécie *L. lucerna* os ovários normalmente possuem coloração marrom claro ou escuro e os testículos coloração esbranquiçada ou esverdeada (Schiariti et al. 2012). A espécie *C. lactea* apresenta variação na coloração gonadal podendo ser esbranquiçada, marrom-amarelada ou rosa pálido (Morandini and Marques 2010), sem evidenciar um padrão de cor por sexo. Para Cubozoa, Werner (1973b) afirma que as colorações gonadais dos dois sexos diferem quando observadas através de finos tecidos transparentes de algumas medusas.

O ‘órgão’ reprodutivo dos cnidários é descrito como um espaço preenchido com células germinativas em desenvolvimento que migraram da endoderme ou ectoderme para a mesogléia

(Miller 1983). Para Scyphozoa, Anthozoa e Cubozoa o testículo é originado de células intersticiais da gastoderme, as quais migram para o interior da mesogléia originando os folículos testiculares. No interior dos folículos ocorrem os processos de espermatogênese e espermiogênese, sendo os espermatozoides maduros liberados (Conant 1898; Miller 1983; Harrison and Jamieson 1988). A classe Scyphozoa apresenta duas estratégias de liberação dos espermatozoides: livres ou em grupos e empacotados. Os espermatozoides livres são liberados na água via poro localizado na gastroderme (Tiemann and Jarms 2010) ou por ruptura da parede do folículo (Morandini and Silveira 2001; Ikeda et al. 2011). Os espermatozoides também podem estar agrupados e serem liberados em pacotes (*spermatozeugmata*) (e.g. Kikinger 1992). Em Cubozoa, são poucos os trabalhos abordando o processo de espermatogênese e a estratégia de liberação do espermatozoide. Werner (1973b) descreveu *spermatozeugmata* para a espécie *T. cystophora* e García-Rodríguez (2015) para a espécie *Alatina alata* e alguns autores reportam a presença de espermatóforos em *Copula sivickisi* (Hartwick 1991; Straehler-Pohl et al. 2014; Marques et al. 2015). García-Rodríguez (2015) descreve o sistema reprodutor masculino de *C. quadrumanus* e *T. haplonema*, caracterizando a estrutura gonadal macroscópica, a conformação geral e o epitélio gonadal, porém não descreve o processo de espermatogênese para as espécies do litoral brasileiro, uma vez que somente encontrou espécimes imaturos, não sendo possível identificar todas as figuras celulares características do processo de espermatogênese. Porém, reporta o tipo de estratégia de liberação para *T. haplonema* (espécime de New Jersey) como sendo por ruptura do epitélio folicular. Adicionalmente, a autora também descreve a morfologia gonadal para as cubomedusas *Morbakka virulenta*, *Alatina alata* e *Copula sivickisi*, descrevendo a estratégia de liberação dos espermatozoides e alguns aspectos reprodutivos para estas últimas espécies. Domo mesmo modo, Southcott (1956) descreve a organização gonadal para *Chironex fleckeri* evidenciando certa sazonalidade graus de maturação gonadal.

Espermiotaxonomia

A espermiotaxonomia vem sendo utilizada como critério de suporte para inferências filogenéticas por diversos autores em vários grupos dentro de Metazoa (Franzén 1956) como Trematoda – Platyhelminthes (Jamieson and Daddow 1982), Polychaeta e Oligochaeta – Annelida (Jamieson 1983; Rota and Lupetti 1997), Decapoda – Crustacea (Jamieson 1994; Guinot et al. 1997; Benetti et al. 2008; Buranelli and Mantelatto 2012) e Gastropoda e Bivalvia – Mollusca (Introíni et al. 2013; Giménez 2013). Em Cnidaria trabalhos como os de Miller (1983) e Harrison and Jamieson (1988) apresentam, em sua revisão, a morfologia geral da ultraestrutura do espermatozoide de todas as classes exceto Cubozoa.

Franzén (1956) propôs que há uma relação definida entre a morfologia do espermatozoide e a biologia de fertilização. Porém o autor não faz uma descrição ultraestrutural dos espermatozoides, sendo as comparações feitas com base em observações em nível de microscopia de contraste de fase. De acordo com o autor foi proposto que espermatozoides com cabeça arredondada, acrossomo esférico, peça intermediária pequena, poucas (quatro) mitocôndrias, flagelos livres e longos, são características “primitivas”. Este é geralmente associado com a ocorrência de fertilização externa. Espermatozoides com morfologia da cabeça alongada e peça intermediária com mitocôndrias em espiral são classificados como modificados, sendo associados à fecundação interna. Porém, Rouse and Pitt (2000) citam que, em Cnidaria, talvez esta relação esteja equivocada, uma vez que vários espermatozoides que se enquadram na morfologia “primitiva” apresentam fecundação interna ou vice-versa.

No nível de microscopia de luz pode-se observar a morfologia geral do espermatozoide de Cnidaria é composto por cabeça redonda-ovalada, cônica ou alongada, peça intermediária visível com um flagelo ancorado à parte posterior (Franzén 1956; Harrison and Jamieson 1988). Já ao microscópio eletrônico de transmissão observa-se certa simetria na cabeça do espermatozoide, com a presença do núcleo e de pequenas vesículas situadas na região anterior deste, que podem ser precursoras da vesícula acrossomal existente nos espermatozoides da maioria dos metazoários

(Hinsch and Clark Jr. 1973; Hinsch 1974; Miller 1983; Harrison and Jamieson 1988). A peça intermediária é pequena geralmente com quatro ou mais mitocôndrias ao redor de um par de centríolos, o proximal e o distal. É a partir do centríolo distal que se origina o longo flagelo típico no espermatozoide da maioria dos metazoários, contendo o arranjo usual de microtúbulos (9 + 2) e vários elementos acessórios, compondo o axonema (Miller 1983; Harrison and Jamieson 1988; Corbelli et al. 2003).

De acordo com Harrison and Jamieson (1988) são poucas as informações ultraestruturais do espermatozoide em Cnidaria sendo a maioria dos estudos realizados nas classes Anthozoa (97 espécies) e Hydrozoa (31 espécies). Em Scyphozoa o autor informa sobre a descrição ultraestrutural de espermatozoides de nove espécies, incluindo um da ordem Coronatae, cinco da ordem Semaestomeae e três Rhizostomeae. Porém, atualmente sabe-se que esse número aumentou para pelo menos 12 espécies incluindo cinco Rhizostomeae, cinco Semaestomeae e dois Coronatae (Afzelius and Franzén 1971; Hinsch and Clark Jr. 1973; Hinsch 1974; Rouse and Pitt 2000). Para Cubozoa, Werner (1973a) faz uma descrição generalizada do espermatozoide de *Trypedalia cystophora* e Corbelli et al. (2003) descrevem a ultraestrutura do espermatozoide de *Carybdea marsupialis*, sendo somente estes dois trabalhos referentes a classe.

Em Discomedusae, o espermatozoide é caracterizado por apresentar núcleo cônico alongado, pequenas vesículas eletrondensas na cabeça e peça intermediária sempre com quatro mitocôndrias, centríolos proximal e distal, sendo o último com complexo pericentriolar formando um colar que envolve a porção proximal do flagelo. A ordem Coronatae compartilha certos caracteres com Discomedusae como, por exemplo, organelas idênticas na peça intermediária, mas destaca-se pela presença de um núcleo cônico relativamente pequeno (Harrison and Jamieson 1988).

Ainda que sejam poucos os trabalhos em Cubozoa, Corbelli et al. (2003) ressaltam possíveis autapomorfias do espermatozoide de Cubozoa como a presença de processos intersecundários, a forma do apêndice “spur” que forma o aparato pericentriolar, e a forma dos processos

pericentriolares terciários. Porém, os próprios autores evidenciam que os espermatozoides de Cubozoa são parecidos com os de Scyphozoa e Hydrozoa.

Apesar de a abordagem utilizada nesta dissertação ser a mesma para as diferentes espécies de medusas estudadas, o detalhamento metodológico não pode ser o mesmo para todas elas. Além disso optou-se para apresentar o texto como se fossem artigos independentes e em formato para serem submetidos para publicação. Dessa forma, a dissertação encontra-se dividida em 4 capítulos, a saber, **Capítulo 1: “Spermatogenesis in the cubozoans *Tamoya haplonema* Müller, 1859 and *Chiropsalmus quadrumanus* (Müller, 1859), highlighting the gonadal cycle”**, **Capítulo 2: “Spermatogenesis and sperm morphology in cubozoans from SE Brazilian and Australian coasts”**, **Capítulo 3: “Histochemistry and ultrastructure of spermatogenesis in *Lychnorhiza lucerna*, *Chrysaora lactea* and *Cassiopea* sp.”** e **Capítulo 4 “Considerações Finais”**.

No **Capítulo 1** descrevemos o processo de espermatogênese para os cubozoários *Tamoya haplonema* e *Chiropsalmus quadrumanus* com base nos resultados obtidos através da análise histológica e histoquímica. Adicionalmente, utilizando como base as amostras gonadais em diferentes estágios de maturação gonadal, foi possível descrevermos os diferentes estágios do ciclo gonadal dessas espécies, sendo esse o primeiro registro detalhado nesse nível para a classe.

No **Capítulo 2** é descrito o processo de espermatogênese utilizando técnicas histológicas, histoquímicas e ultraestruturais para as espécies de Cubozoa *Tamoya haplonema* e *Chiropsalmus quadrumanus* do Brasil, além das espécies *Carukia barnesi*, *Chironex fleckeri* e *Chiropsella bronzie* coletadas na Austrália.

No **Capítulo 3** descrevemos de modo comparativo o processo de espermatogênese nas espécies *Lychnorhiza lucerna*, *Cassiopea* sp. e *Chrysaora lactea* com base em análises histológicas, histoquímicas e ultraestruturais da gônada masculina. Adicionalmente, também incluímos neste manuscrito a descrição macroscópica da gônada masculina de *Lychnorhiza lucerna*, bem como sua disposição dentro da cavidade gastrovascular, complementando resultados previamente publicados por Schiariti et al. (2012).

Ao final, o **Capítulo 4** apresenta as considerações finais desta dissertação comparando os dados da morfologia gonadal, histológicos e histoquímicos das espécies de Cubozoa e Scyphozoa aqui estudadas (exemplares do Brasil e Austrália). Finalmente, os dados descritivos do espermatozoide de todas as espécies trabalhadas foram compilados e comparados ressaltando possíveis sinapomorfias.

Nesta dissertação foi apresentada a estrutura gonadal, a espermatogênese e foi descrito o espermatozoide de cinco espécies da classe Cubozoa e três espécies da classe Scyphozoa. Estes resultados são de ampla contribuição para o entendimento da reprodução sexuada desses organismos.

A idéia inicial do trabalho era descrever a morfologia do espermatozoide de forma comparativa e buscando esclarecer possíveis relações filogenéticas dos representantes de ambas as classes. Como a espermiotaxonomia tem sido utilizada para evidenciar diferenças entre os espermatozoides de espécies próximas, e para membros de Scyphozoa e Cubozoa, quase não se tem dados da morfologia ultraestrutural dos espermatozoides, o foco principal eram os detalhes ultraestruturais dos gametas masculinos. Para tal, visando obter resultados ultraestruturais de qualidade, o esforço amostral foi grande, utilizando a coleta de amostras de animais vivos e de rápida preservação. Uma vez que o esforço amostral já era grande, foram coletadas amostras tanto para ultraestrutura quanto para histologia e isso nos possibilitou descrever não somente a morfologia dos espermatozoides, como também o processo de espermatogênese a nível histológico e ultraestrutural.

É importante ressaltar que o estudo de representantes das classes Cubozoa e Scyphozoa apresenta dificuldades. Representantes de ambas as classes produzem grande quantidade de muco que dificulta a separação dos tecidos alvos. A manutenção dos animais vivos em laboratório apresenta dificuldade uma vez que, necessita-se de aquários circulares não tão facilmente (e muitas vezes com custo inacessível) encontrados, alimentação diária intensa dependente do tamanho do indivíduos encontrados (indivíduos menores podem ser alocados em aquários menores e demandam menos investimento na alimentação, indivíduos grandes precisam ser alocados em aquários maiores se alimentando mais que o dobro do que os pequenos). Dentro desta problemática, as cubomedusas

são as mais difíceis de se manter em laboratório, pois são nadadoras e predadoras ativas, não sobrevivendo muito mais do que 48 horas em ambientes confinados.

O estudo da estrutura gonadal histológica em Cubozoa nos permitiu encontrar padrões como a organização folicular, sendo estes circundados por um epitélio de origem gastrodérmica e com características únicas descritas para os representantes da classe, a saber: as vesículas não reativas a nenhum corante histoquímico testado e com material granular ao MET. Através do estudo da espermatogênese sincronizada para das espécies de cubozoários, também foi possível identificar um grau de maturação gonadal cíclico que justifica o comportamento reprodutivo dos representantes desta classe e também certa sazonalidade para se encontrar indivíduos maduros.

Do mesmo modo que encontramos padrões na organização gonadal histológica de Cubozoa, para as três espécies de Scyphozoa, podemos dizer que a gônada masculina também tem organização característica. Em *L. lucerna*, *Cassiopea* sp. e *C. lactea* a gônada é composta por um epitélio germinal. Este, por sua vez, é dividido em camada externa e interna, sendo interiorizado pela mesogléia. A espermatogênese não-sincronizada de *L. lucerna* e *C. lactea* pode estar atrelada ao comportamento reprodutivo desses organismos que apresentam fecundação externa. Do mesmo modo que a espermatogênese sincronizada de *Cassiopea* sp. está associada com a produção e possível transferência de *spermatozeugmata*.

Ao estudar a morfologia dos espermatozoides de quatro das cinco espécies de Cubozoa, observamos que o número de mitocôndrias (seis) pode ser uma das características do espermatozoide de Cubozoa, bem como a presença de vesículas na região lateral ao núcleo (ver Tabela 1 para detalhes). Parece ser padrão para o espermatozoide de Scyphozoa a presença de quatro mitocôndrias, a ausência de vesículas na peça intermediária e também ausência do *spurr* no aparato pericentriolar. Algumas das características encontradas como a ligação entre os centríolos proximal e distal, em *Tamoya haplonema*, e a presença da vesícula nuclear em *Chrysaora lactea*, são típicas de espermatozoides de representantes de outras classes. Estudos ultraestruturais do

espermatozoide de mais espécies de Cnidaria só acrescentariam às análises comparativas e a delimitação de características únicas dos espermatozoides de cada classe.

Algumas questões ainda permanecem indefinidas como a composição histoquímica das vesículas encontradas no epitélio gastrodermal de Cubozoa e também a composição da secreção em que os espermatozoides de *Cassiopea* sp. estão imersos, formando a estrutura *spermatozeugmata*. Além disso, ainda são muitas as espécies que não possuem a morfologia do espermatozoide descrita, bem como a estratégia de liberação (se livres na coluna d'água, em *spermatozeugmata* ou espermatóforos), tipo de produção (se sincronizada ou não) e o comportamento reprodutivo (fertilização interna e externa).

Tabela 1: Comparação entre espermatozoides de Cubozoa e Scyphozoa espécies estudadas na presete dissertação com espermatozoide de outras espécies já descrito na literatura.

Classe Scyphozoa								Classe Cubozoa					
Características	Rhizostomeae			Semeaostomeae			Coronatae	Carybdeida			Chirodropida		
	<i>Lychnorhiza lucerna</i> ¹	<i>Rhizostoma pulmo</i> ²	<i>Cassiopea sp.</i> ¹	<i>Chrysaora lactea</i> ¹	<i>Chrysaora hysoscella</i> ²	<i>Aurelia aurita</i> ^{2;3}	<i>Nausithoe sp.</i> ⁴	<i>Tamoya haplonema</i> ¹	<i>Carukia barnesi</i> ¹	<i>Carybdea marsupialis</i> ⁵	<i>Chiropsalmus quadrumanus</i> ¹	<i>Chironex fleckeri</i> ¹	<i>Chiropsella bronzie</i> ¹
Comprimento da cabeça	2,01 ± 0,41	-	1,9 ± 0,15	2,17 ± 0,61	-	-	-	3,7 ± 0,41	-	3,84 ± 0,34	2,98 ± 0,28	2,47 ± 0,17	2,73 ± 0,42
Diâmetro da cabeça	2,05 ± 0,61	-	1,59 ± 0,29	1,89 ± 0,57	-	-	-	2,54 ± 0,24	-	-	1,82 ± 0,16	1,95 ± 0,25	2,38 ± 0,38
Comprimento da peça intermediária	0,92 ± 0,26	-	0,75 ± 0,11	0,95 ± 0,25	-	-	-	1,03 ± 0,23	-	1,1	0,73 ± 0,14	0,68 ± 0,14	0,78 ± 0,08
Diâmetro da peça intermediária	2,40 ± 0,54	-	1,35 ± 0,19	2,32 ± 0,75	-	-	-	2,23 ± 0,20	-	2,41 ± 0,36	1,87 ± 0,25	1,99 ± 0,27	2,18 ± 0,30
Comprimento do núcleo	1,9 ± 0,35	-	1,76 ± 0,17	1,88 ± 0,59	-	-	-	3,4 ± 0,48	-	2,83 ± 0,27	2,75 ± 0,29	2,23 ± 0,23	2,48 ± 0,4
Diâmetro do núcleo	1,6 ± 0,49	-	1,31 ± 0,21	1,61 ± 0,43	-	-	-	2,21 ± 0,19	-	1,84 ± 0,27	1,57 ± 0,14	1,59 ± 0,04	2,1 ± 0,32
Morfologia da cabeça	Ovoide ^{a*}	Alongado ^b	Alongado ^{b*}	Ovoide ^{c*}	Ovoide ^c	Alongado ^b	Ovoide ^c	Ampuliforme ^{a*}	Ovoide [*]	Ovoide ^{b?}	Forma de bala ^{c*}	Forma de bala ^{c*}	Ovoide ^{b*}
Razão nuclear	1,29 ± 0,52	-	1,4 ± 0,29	1,22 ± 0,45	-	-	-	1,5 ± 0,21	-	1,54	1,82 ± 0,18	1,48 ± 0,21	1,19 ± 0,24
Vesícula nuclear	Ausente ^{a*}	Não observado ^b	Ausente ^{a*}	Presente ^{c*}	Não observado ^b	Ausente ^a	Presente ^c	Ausente ^{a*}	-	Ausente ^{a?}	Ausente ^{a*}	Ausente ^{a*}	Ausente ^{a*}
Cromatina	Granular ^a	Granular ^a	Granular ^a	Granular ^a	Granular ^a	Eletrodensa ^b	Granular ^a	Granular ^a	-	Granular ^{a?}	Granular ^a	Granular ^a	Granular ^a
Membrana nuclear externa	Ausente ^{a*}	Não observado ^b	Presente ^{c*}	Ausente ^{a*}	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^{a*}	-	Ausente ^{a?}	Ausente ^{a*}	Ausente ^{a*}	Ausente ^{a*}
Número de mitocôndrias	4 ^{a*}	Não observado ^b	4 ^{a*}	4 ^{a*}	4 ^a	4 ^a	4 ^a	6 ^{b*}	-	6 ^{b*}	6 ^{b*}	6 ^{b*}	6 ^{b*}
Vesículas acima do núcleo	Presente ^{a*}	Presente ^a	Não observado ^{b*}	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^{a*}	-	Presente ^a	Presente ^{a*}	Presente ^{a*}	Presente ^{a*}
Diâmetro das vesículas	0,16 ± 0,02	-	-	0,12 ± 0,04	-	-	-	0,09 ± 0,03	-	-	0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,009	0,12 ± 0,023
Vesícula lateral do núcleo	Ausente ^{a*}	Ausente ^a	Presente ^{b*}	Ausente ^{a*}	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Presente ^{a*}	-	Presente ^a	Presente ^{a**}	Não observado ^{b*}	Não observado ^{b*}
Centríolo proximal	Presente ^{a*}	Presente ^a	Presente ^{a*}	Presente ^{a*}	Presente ^a	Não observado ^b	Presente ^a	Ausente ^{a*}	-	Ausente ^a	Ausente ^{a*}	Ausente ^{a*}	Ausente ^{a*}
Centríolo distal	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	-	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a
Aparato Pericentriolar	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	-	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a
Processo primário	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Não observado ^{b*}	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^{a*}	-	Presente ^a	Presente ^{a*}	Não observado ^{b*}	Não observado ^{b*}
Processo interprimário	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Não observado ^{b*}	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	-	Presente ^a	Presente ^a	Não observado ^{b*}	Não observado ^{b*}
Bandas estriadas maiores	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Não observado ^{b*}	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Presente ^a	Presente ^a	Ausente ^{a*}	-	Presente ^b	Ausente ^{c*}	Não observado ^{c*}	Não observado ^{c*}

Processo secundário	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Não observado ^{b*}	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Não observado ^b	Presente ^a	Não observado ^{a*}	-	Presente ^b	Não observado ^{a*}	Não observado ^{a*}	Não observado ^{a*}
Processo terciário	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Não observado ^{b*}	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Não observado ^b	Presente ^a	Não observado ^{a*}	-	Presente ^b	Não observado ^{a*}	Não observado ^{a*}	Não observado ^{a*}
Spurr	Não observado ^a	Não observado ^a	Não observado ^a	Não observado ^a	Ausente ^b	Não observado ^a	Ausente ^b	Não observado ^a	-	Presente ^b	Não observado ^a	Não observado ^a	Não observado ^a
Lamelas	Não observado ^{a*}	Não observado ^a	Não observado ^{a*}	Not observed ^{a*}	Não observado ^a	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^{a*}	-	Ausente ^{a?}	Ausente ^{a*}	Ausente ^{a*}	Ausente ^{a*}
Poli-ribosomos	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Presente ^{a*}	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Ausente ^c	Ausente ^c	Presente ^{a*}	-	Ausente ^{b?}	Presente ^{a*}	Presente ^{a*}	Não observado ^{b*}
Complexo de Golgi	Presente ^{a*}	Não observado ^b	Presente ^{a*}	Ausente ^{c*}	Não observado ^b	Ausente ^c	Ausente ^c	Ausente ^{a*}	-	Ausente ^{a?}	Ausente ^{a*}	Ausente ^{a*}	Presente ^{b*}
Vesículas na peça intermediária	Presente ^a	Não observado ^b	Presente ^a	Presente ^a	Não observado ^b	Ausente ^c	Presente ^a	Não observado ^{a*}	-	Presente ^b	Não observado ^{a*}	Não observado ^{a*}	Presente ^{b*}
Estrutura do flagelo	9 + 2 ^a	9 + 2 ^a	9 + 2 ^a	9 + 2 ^a	9+2 ^a	9+2 ^a	9+2 ^a	9 + 2 ^a	-	9 + 2 ^a	9 + 2 ^a	9 + 2 ^a	9 + 2 ^a

¹ Este estudo; ² Hedwig e Schafer (1986); ³ Hinsch (1974); ⁴ Afzelius e Franzen (1974); ⁵ Corbelli et al. (2003).

Letras diferentes indicam variação entre as espécies; * = diferenças entre as espécies do presente estudo; ? = Não descrito e observado na figura publicada.

Referências

- Adler L, Jarms G (2009) New insights into reproductive traits of scyphozoans: special methods of propagation in *Sanderia malayensis* GOETTE, 1886 (Pelagiidae, Semaestomeae) enable establishing a new classification of asexual reproduction in the class Scyphozoa. *Mar Biol* 156:1411–1420. doi: 10.1007/s00227-009-1181-6
- Afzelius BA, Franzén A (1971) The Spermatozoon of the Jellyfish *Nausithoe*. *J Ultrastruct Res* 37:186–199.
- Arai MN (1997) A Functional Biology of Scyphozoa. Chapman & Hall, London
- Benetti AS, Santos DC, Negreiros-Fransozo ML, Scelzo MA (2008) Spermatozoal ultrastructure in three species of the genus *Uca* Leach, 1814 (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Micron* 39:337–343. doi: 10.1016/j.micron.2007.04.004
- Bentlage B, Lewis C (2012) An illustrated key and synopsis of the families and genera of carybdeid box jellyfishes (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeida), with emphasis on the “Irukandji family” (Carukiidae). *J Nat Hist* 46:2595–2620. doi: 10.1080/00222933.2012.717645
- Berrill NJ (1949) Developmental analysis of scyphomedusae. *Biol Rev* 24:393–409.
- Bigelow RP (1900) The anatomy and development of *Cassiopea xamachana*. *Mem Bost Soc Nat Hist* 5:192–254.
- Bridge D, Cunningham CW, DeSalle R, Buss LW (1995) Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Mol Biol Evol* 12:679–689.
- Bridge D, Cunningham CW, Schierwater B, et al (1992) Class-level relationships in the phylum Cnidaria: Evidence from mitochondrial genome structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8750–8753.
- Buranelli R, Mantelatto F (2012) Reproductive apparatus of the male giant hermit crab *Petrochirus diogenes* (Anomura, Diogenidae): morphology and phylogenetic implications. *Aquat Biol* 16:241–251. doi: 10.3354/ab00453
- Calder DR (2009) Cubozoan and Scyphozoan jellyfishes of the Carolinian biogeographic province,

southeastern USA. Royal Ontario Museum Contributions in Science, Toronto

Colin SP, Costello JH, Katija K, et al (2013) Propulsion in Cubomedusae: Mechanisms and Utility.

PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0056393

Collins A, Schuchert P, Marques A, et al (2006) Medusozoan Phylogeny and Character Evolution

Clarified by New Large and Small Subunit rDNA Data and an Assessment of the Utility of

Phylogenetic Mixture Models. Syst Biol 55:97–115. doi: 10.1080/10635150500433615

Collins AG (2002) Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. J Evol Biol

15:418–432.

Collins AG (2009) Recent Insights into Cnidarian Phylogeny. Smithson Contrib to Mar Sci 38:139–

149.

Collins AG, Bentlage B, Gillan W, et al (2011) Naming the bonaire banded box jelly, *Tamoya*

ohboya, n. sp. (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeida: Tamoyidae). Zootaxa 2753:53–68. doi:

10.11646/zootaxa.2753.1.1

Conant FS (1898) The cubomedusae. Johns Hopkins University

Corbelli A, Avian M, Marotta R, Ferraguti M (2003) The spermatozoon of *Carybdea marsupialis*

(Cubozoa, Cnidaria). Invertebr Reprod Dev 43:95–104. doi: 10.1080/07924259.2003.9652528

Courtney R, Browning S, Seymour J (2016) Early Life History of the “Irukandji” Jellyfish *Carukia*

barnesi. PLoS One 11:e0151197. doi: 10.1371/journal.pone.0151197

Daly M, Brugler MR, Cartwright P, et al (2007) The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic

patterns and diversity 300 years after Linnaeus. Zootaxa 1668:127–182.

Dawson MN (2004) Some implications of molecular phylogenetics for understanding biodiversity

in jellyfishes, with emphasis on Scyphozoa. Hydrobiologia 530–531:249–260. doi:

10.1007/s10750-004-2659-3

Fautin DG (1992) Cnidaria. In: Adiyodi KG, Adiyodi RG (eds) Reproductive Biology of

Invertebrates (Sexual Differentiation and Behaviour). pp 31–52

Fenner PJ, Hadok JC (2002) Fatal envenomation by jellyfish causing Irukandji syndrome. Med J

Aust 177:362–363.

Franzén A (1956) On spermiogenesis. morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. Zool Bidr Uppsala 31:355–482.

Fuentes V, Straehler-Pohl I, Atienza D, et al (2011) Life cycle of the jellyfish *Rhizostoma pulmo* (Scyphozoa: Rhizostomeae) and its distribution, seasonality and inter-annual variability along the Catalan coast and the Mar Menor (Spain, NW Mediterranean). Mar Biol 158:2247–2266. doi: 10.1007/s00227-011-1730-7

García-Rodríguez J (2015) Anatomia associada ao comportamento reprodutivo de Cubozoa. Universidade de São Paulo

Gershwin L, Kingsford MJ (2008) Pelagic Cnidaria and Ctenophora. In: Hutchings P, Kingsford M, Hoegh-Guldberg O (eds) The Great Barrier Reef: Biology, Environment and Management. CSIRO Publishing, Collingwood, pp 188–198

Gershwin L, Zeidler W, Davie PJF (2010) Medusae (Cnidaria) of Moreton Bay, Queensland, Australia. Mem Queensl Museum 54:47–108.

Giménez J (2013) Spermatogenesis and sperm morphology in *Trophon geversianus* (Gastropoda: Muricidae). J Mar Biol Assoc United Kingdom 93:1881–1886. doi: 10.1017/S0025315413000581

Guinot D, Jamieson BGM, Tudge CC (1997) Ultrastructure and relationships of spermatozoa of the freshwater crabs *Potamon fluviatile* and *Potamon ibericum* (Crustacea, Brachyura, Potamidae). J Zool 241:229–244.

Harrison PL, Jamieson B (1988) Cnidaria and Ctenophora. In: Adiyodi KG, Adiyod RG (eds) Reproductive Biology of Invertebrates. Vol IX Part A, Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny. Wiley & Sons, New York, pp 21–95

Hartwick RF (1991) Observations on the anatomy, behavior, reproduction and life-cycle of the cubozoan *Carybdea sivickisi*. Hydrobiologia 216/217:171–179. doi: 10.1007/978-94-011-3240-4

- Hinsch GW (1974) Comparative ultrastructure of cnidarian sperm. *Am Zool* 14:457–465. doi: 10.1093/icb/14.2.457
- Hinsch GW, Clark Jr. WH (1973) Comparative fine structure of Cnidaria spermatozoa. *Biol Reprod* 8:62–73.
- Hofmann DK, Hadfield MG (2002) Hermaphroditism, gonochorism, and asexual reproduction in *Cassiopea* sp.—an immigrant in the islands of Hawai'i. *Invertebr Reprod Dev* 41:215–221. doi: 10.1080/07924259.2002.9652754
- Holst S, Sötje I, Tiemann H, Jarms G (2007) Life cycle of the rhizostome jellyfish *Rhizostoma octopus* (L.) (Scyphozoa, Rhizostomeae), with studies on cnidocysts and statoliths. *Mar Biol* 151:1695–1710. doi: 10.1007/s00227-006-0594-8
- Iguchi N, Lee HE, Yoon WD, Kim S (2010) Reproduction of the giant jellyfish, *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae), in 2006–2008 as peripherally-transported populations. *Ocean Sci J* 45:129–138. doi: 10.1007/s12601-010-0011-6
- Ikeda H, Ohtsu K, Uye S (2011) Structural changes of gonads during artificially induced gametogenesis and spawning in the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *J Mar Biol Assoc United Kingdom* 91:215–227. doi: 10.1017/S0025315410001244
- Introíni GO, Passos FD, Recco-Pimentel SM (2013) Comparative study of sperm ultrastructure of *Donax hanleyanus* and *Donax gemmula* (Bivalvia: Donacidae). *Acta Zool* 94:261–266. doi: 10.1111/j.1463-6395.2012.00565.x
- Jamieson BGM (1983) The ultrastructure of the spermatozoon of the oligochaetoid polychaete *Questa* sp. (Questidae, Annelida) and its phylogenetic significance. *J Ultrastructure Res* 84:238–251. doi: 10.1016/S0022-5320(83)80004-5
- Jamieson BGM (1994) Phylogeny of the Brachyura with Particular Reference to the Podotremata: Evidence from a Review of Spermatozoal Ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philos Trans R Soc Biol Sci* 345:373–393. doi: 10.1098/rstb.1994.0116

- Jamieson BGM, Daddow LM (1982) The ultrastructure of the spermatozoon of *Neochasmus* sp. (Cryptogonimidae, Digenea, Trematoda) and its phylogenetic significance. *Int J Parasitol* 12:547–559. doi: 10.1016/0020-7519(82)90051-0
- Jarms G (2010) The early life history of Scyphozoa with emphasis on Coronatae: a review with a list of described Life cycles. *Verh Naturwiss Ver Hambg* 45:17–31.
- Kayal E, Bentlage B, Collins AG, et al (2012) Evolution of Linear Mitochondrial Genomes in Medusozoan Cnidarians. *Genome Biol Evol* 4:1–12. doi: 10.1093/gbe/evr123
- Kayal E, Roure B, Philippe H, et al (2013) Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *BMC Evol Biol* 13:5. doi: 10.1186/1471-2148-13-5
- Kikinger R (1992) *Cotylorhiza tuberculata* (Cnidaria: Scyphozoa) - Life History of a stationary population. *Mar Ecol* 13:333–362. doi: 10.1111/j.1439-0485.1992.tb00359.x
- Kingsford MJ, Seymour JE, O’Callaghan MD (2012) Abundance patterns of cubozoans on and near the Great Barrier Reef. *Hydrobiologia* 690:257–268. doi: 10.1007/s10750-012-1041-0
- Lucas CH, Reed AJ (2010) Gonad morphology and gametogenesis in the deep-sea jellyfish *Atolla wyvillei* and *Periphylla periphylla* (Scyphozoa : Coronatae) collected from Cape Hatteras and the Gulf of Mexico. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* 90:1095–1104. doi: 10.1017/S0025315409000824
- Marques AC, Collins AG (2004) Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebr Biol* 123:23–42. doi: 10.1111/j.1744-7410.2004.tb00139.x
- Marques AC, García J, Lewis Ames C (2015) Internal fertilization and sperm storage in cnidarians: a response to Orr and Brennan. *Trends Ecol Evol* 30:435–436. doi: 10.1016/j.tree.2015.06.002
- Marques AC, Morandini AC, Migotto AE (2003) Synopsis of knowledge on Cnidaria Medusozoa from Brazil. *Biota Neotrop* 3:1–18.
- Mianzan HW, Cornelius PFS (1999) Cubomedusae and Scyphomedusae. In: Boltovskoy D (ed) *South Atlantic Zooplankton Vol 1*. Backhuys Publishers, Leiden, pp 513–559
- Miller RL (1983) Cnidaria. In: Adiyodi KG, Adiyodi RG (eds) *Reproductive Biology of*

Invertebrates. Vol II Spermatogenesis and Sperm Function. Wiley & Sons, New York, pp 23–69

Morandini AC, Ascher D, Stampar SN, Ferreira JF V. (2005) Cubozoa e Scyphozoa (Cnidaria: Medusozoa) de águas costeiras do Brasil. Iheringia Série Zool 95:281–294. doi: 10.1590/S0073-47212005000300008

Morandini AC, Custódio MR, Marques AC (2014) Phylum Porifera and Cnidaria. In: Gopalakrishnakone P, Haddad V, Kem WR, et al. (eds) Marine and Freshwater Toxins. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 1–24

Morandini AC, Marques AC (2010) Revision of the genus *Chrysaora* Péron & Lesueur, 1810 (Cnidaria: Scyphozoa). Zootaxa 2464:1–97.

Morandini AC, Schiariti A, Stampar SN, et al (2016a) Succession of generations is still the general paradigm for scyphozoan life cycles. Bull Mar Sci 92:343–351. doi: 10.5343/bms.2016.1018

Morandini AC, Silveira FL Da (2001) Sexual reproduction of *Nausithoe aurea* (Scyphozoa, Coronatae). Gametogenesis, egg release, embryonic development, and gastrulation*. Sci Mar 65:139–149. doi: 10.3989/scimar.2001.65n2139

Morandini AC, Silveira FL da, Jarms G (2004) The life cycle of *Chrysaora lactea* Eschscholtz, 1829 (Cnidaria, Scyphozoa) with notes on the scyphistoma stage of three other species. Hydrobiologia 530–531:347–354. doi: 10.1007/s10750-004-2694-0

Morandini AC, Stampar SN, Maronna MM, Da Silveira FL (2016b) All non-indigenous species were introduced recently? The case study of *Cassiopea* (Cnidaria: Scyphozoa) in Brazilian waters. J Mar Biol Assoc United Kingdom in press:1–8. doi: 10.1017/S0025315416000400

Nogueira Júnior M, Nagata RM, Haddad MA (2010) Seasonal variation of macromedusae (Cnidaria) at North Bay, Florianópolis, southern Brazil. Zool (Curitiba, Impresso) 27:377–386. doi: 10.1590/S1984-46702010000300009

Odorico DM, Miller DJ (1997) Internal and external relationships of the Cnidaria: implications of primary and predicted secondary structure of the 5' –end of the 23S-like rDNA. Proc R Soc B

Biol Sci 264:77–82. doi: 10.1098/rspb.1997.0011

Pearse JS, Pearse VB (1978) Vision in Cubomedusan Jellyfishes Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1745820>

Vision in Cubomedusan Jellyfishes. Science (80-) 199:458.

Reft AJ, Daly M (2012) Morphology, distribution, and evolution of apical structure of nematocysts in hexacorallia. J Morphol 273:121–136. doi: 10.1002/jmor.11014

Rota E, Lupetti P (1997) An ultrastructural investigation of *Hrabeiella* Pizl & Chalupský, 1984 (Annelida). II. The spermatozoon. Tissue Cell 29:603–609. doi: 10.1016/S0040-8166(97)80061-4

Rouse GW, Pitt K (2000) Ultrastructure of the sperm of *Catostylus mosaicus* and *Phyllorhiza punctata* (Scyphozoa , Cnidaria): Implications for sperm terminology and the inference of reproductive mechanisms. Invertebr Reprod Dev 38:23–34.

Schiariti A, Christiansen E, Morandini AC, et al (2012) Reproductive biology of *Lychnorhiza lucerna* (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae): Individual traits related to sexual reproduction. Mar Biol Res 8:255–264. doi: 10.1080/17451000.2011.616897

Schiariti A, Kawahara M, Uye S, Mianzan HW (2008) Life cycle of the jellyfish *Lychnorhiza lucerna* (Scyphozoa: Rhizostomeae). Mar Biol 156:1–12. doi: 10.1007/s00227-008-1050-8

Schuchert P (1993) Phylogenetic analysis of the Cnidaria. J Zool Syst Evol Res 31:161–173.

Southcott RV (1956) Studies on Australian Cubomedusae, including a new genus and species apparently harmful to man. Aust J Mar Freshw Res 7:254–283.

Straehler-Pohl I, Garm A, Morandini AC (2014) Sexual dimorphism in Tripedaliidae (Conant 1897) (Cnidaria, Cubozoa, Carybdeida). Zootaxa 3785:533. doi: 10.11646/zootaxa.3785.4.3

Straehler-pohl I, Jarms G (2011) Morphology and life cycle of *Carybdea morandinii*, sp. nov. (Cnidaria), a cubozoan with zooxanthellae and peculiar polyp anatomy. Zootaxa 2755:36–56.

Templeman MA, Kingsford MJ (2010) Trace element accumulation in *Cassiopea* sp. (Scyphozoa) from urban marine environments in Australia. Mar Environ Res 69:63–72. doi:

10.1016/j.marenvres.2009.08.001

- Templeman MA, Kingsford MJ (2012) Variation in soft tissue chemistry among scyphozoan and cubozoan jellyfishes from the Great Barrier Reef, Australia. *Hydrobiologia* 690:279–290. doi: 10.1007/s10750-012-1051-y
- Tibballs J (2006) Australian venomous jellyfish, envenomation syndromes, toxins and therapy. *Toxicon* 48:830–859. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.07.020
- Tiemann H, Jarms G (2010) Organ-like gonads, complex oocyte formation, and long-term spawning in *Periphylla periphylla* (Cnidaria, Scyphozoa, Coronatae). *Mar Biol* 157:527–535. doi: 10.1007/s00227-009-1338-3
- Werner B (1975) Bau und Lebensgeschichte des Polypen von *Tripedalia cystophora* (Cubozoa, class. nov., Carybdeidae) und seine Bedeutung für die Evolution der Cnidaria. *Helgoländer wiss Meeresunters* 27:461–504.
- Werner B (1973a) New Investigations on Systematics and Evolution of the Class Scyphozoa and the Phylum Cnidaria. *Publ Seto Mar Biol Lab* 20:35–61. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Werner B (1973b) Spermatozoen und Paarungsverhalten bei *Tripedalia cystophora* (Cubomedusae). *Mar Biol* 18:212–217. doi: 10.1007/BF00367987
- Williamson JA, Fenner PJ, Burnett JW, Rifkin JF (1996) *Venomous & Poisonous Marine Animals: A Medical and Biological Handbook*. Surf Life Saving Australia and University of New South Wales Press, Sydney
- Yamaguchi M, Hartwick R (1980) Early Life history of the sea wasp, *Chironex fleckeri* (Class Cubozoa). In: Tardent P, Tardent R (eds) *Development and cellular biology of coelenterates*. Elsevier, Amsterdam, North-Holland, pp 11–16
- Zapata F, Goetz FE, Smith SA, et al (2015) Phylogenomic Analyses Support Traditional Relationships within Cnidaria. *PLoS One* 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0139068