

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

GISELE ORLANDI INTROÍNI

**ULTRA-ESTRUTURA DOS ESPERMATOZÓIDES DE
BRACHIDONTES DARWINIANUS, *B. SOLISIANUS* E
ISOGNOMON BICOLOR E ESTUDO CROMOSSÔMICO DE *B.*
DARWINIANUS E *I. BICOLOR* (MOLLUSCA, BIVALVIA)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GISELE ORLANDI INTROÍNI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural
na área de Biologia Celular.

Shirlei Maria Récco Pimentel

Orientadora: **Profa. Dra. Shirlei Maria Récco Pimentel**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	3C.
Nº CHAMADA	1/UNICAMP
	In 8u
V	EX
TOMBO BC/	64010
PROC.	169,00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	01/06/05
Nº CPD	

file - in 351041

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

In 8u
In889u

Introíni, Gisele Orlandi

Ultra-estrutura dos espermatozoides de *Brachidontes darwinianus*, *B. solisianus* e *Isognomon bicolor* e estudo cromossômico de *B. darwinianus* e *I. bicolor* (Mollusca, Bivalvia) / Gisele Orlandi Introíni. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Shirlei Maria Recco Pimentel.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Ultraestrutura. 2. *Brachidontes*. 3. *Isognomon*. 4. Mytilidae.
5. Espermatozóide. I. Shirlei Maria Recco Pimentel.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

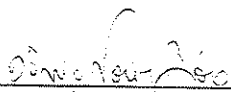
Campinas, 24 de fevereiro de 2005

BANCA EXAMINADORA

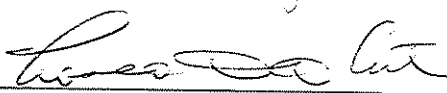
Profa.Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (Orientadora)


Assinatura

Profa.Dra. Sônia Nair Bão


Assinatura

Profa.Dra. Fosca Pedini Pereira Leite


Assinatura

Profa.Dra. Karina Carvalho Mancini

Assinatura

Dedico esta tese de mestrado a Maria do Carmo Orlandi, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro concedido pelo CNPq e pela Capes, através das bolsas de mestrado, pelo PROAP para a compra de materiais indispensáveis para a realização de meus experimentos e pela FAEPEX que permitiu a minha participação em um Congresso Mundial de Malacologia.

A professora doutora Shirlei Maria Recco Pimentel, por ter me aceitado como orientada, acreditado e incentivado meu trabalho, concedido todo o respaldo para a concretização daquilo que havíamos proposto no projeto de mestrado e, sobretudo, por todas as diretrizes sugeridas quando surgiam dúvidas sobre qual caminho seguir.

A professora doutora Cláudia Alves de Magalhães, por todos os ensinamentos sobre moluscos, especialmente em seus aspectos ecológicos, pela amizade, dedicação e ajuda durante o desenvolvimento do presente trabalho.

As professoras doutoras Sônia Nair Bão, Fosca Pedini Pereira Leite e Karina Carvalho Mancini, componentes da banca examinadora da presente tese, por todas as pertinentes considerações.

Ao Banco de Microorganismos Marinhos, do Instituto Oceanográfico, da USP, pela concessão de soluções com microalgas para alimentação dos exemplares de bivalves analisados.

Ao Odair e a Ana Cristina por me ensinarem, de maneira paciente e gentil, determinadas técnicas de microscopia eletrônica e monitorarem as minhas atividades enquanto eu não me sentia segura para desenvolvê-las sozinha.

A Klélia, pelo apoio técnico nos momentos em que solicitei sua ajuda e por se preocupar constantemente com a manutenção adequada das condições laboratoriais.

A todos aqueles que trabalharam comigo, compartilhando o mesmo ambiente de trabalho, Carmen, Eduardo, Gabriel, Liliam, Marta, Paula, Sérgio e Yeda, pelo respeito e amizade que sempre demonstraram.

As minhas amigas Maria Inês Hermenegildo, Maria José de Resende, Sônia Lourenço Pereira e Adail Proni Barsotti por confiarem em mim e por serem tão especiais em minha vida.

Ao meu querido Alberto da Silva Moraes por ser meu companheiro e amigo; sendo estas palavras empregadas em suas definições mais abrangentes. Não é meu amigo unicamente nos momentos de risos, mas em todas as horas, demonstrando sempre cumplicidade, respeito, sensibilidade e acima de tudo, amor.

Ao meu pai, Gil Nobre Introíni, *in memoriam*.

A minha desconcertante e imprevisível irmã, Simone Orlandi Introíni, pela alegria, amizade e por sempre acreditar em mim, incentivando-me.

E finalmente, a minha mãe, Maria do Carmo Orlandi, pela força que ela me proporciona quando as dificuldades surgem, por chorar comigo quando eu choro, por rir comigo nos momentos de conquista, enfim por compartilhar a minha vida com todas os seus sabores e encantos.

“É com o coração que se vê corretamente. O essencial é invisível aos olhos”.

Antonie de Saint-Exupéry

RESUMO	X
ABSTRACT	XII
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. ASPECTOS GERAIS DA TAXONOMIA DOS MOLUSCOS BIVALVES	1
2. O ESPERMATOZÓIDE DOS BIVALVES	2
3. O ESPERMATOZÓIDE DOS MYTILIDAE	5
4. ESTUDOS CITOGENÉTICOS DE BIVALVES	7
5. <i>BRACHIDONTES DARWINIANUS</i> E <i>B. SOLISIANUS</i>	9
6. <i>ISOGNOMON BICOLOR</i>	10
OBJETIVOS	12
ARTIGO I	13
SPERMATOZOAN MORPHOLOGY OF <i>BRACHIDONTES DARWINIANUS</i> AND <i>B. SOLISIANUS</i> (BIVALVIA, MYTILIDAE) FROM THE SOUTHERN BRAZILIAN COAST	14
ABSTRACT	15
INTRODUCTION	16
MATERIAL AND METHODS	17
RESULTS	19
DISCUSSION	20
ACKNOWLEDGMENTS	23
REFERENCES	25
ARTIGO II	36
SPERM MORPHOLOGY OF <i>ISOGNOMON BICOLOR</i> (MOLLUSCA, BIVALVIA, ISOGNOMONIDAE)	37
ABSTRACT	38
INTRODUCTION	40
MATERIAL AND METHODS	40
RESULTS	42
DISCUSSION	43
ACKNOWLEDGMENTS	45
REFERENCES	47
ARTIGO III	54
CHROMOSOMAL NUMBER OF TWO BRAZILIAN SPECIES OF BIVALVES: <i>BRACHIDONTES DARWINIANUS</i> AND <i>ISOGNOMON BICOLOR</i>	55
ABSTRACT	56
INTRODUCTION	57
MATERIAL AND METHODS	58
RESULTS	59

DISCUSSION	59
ACKNOWLEDGEMENTS	60
REFERENCES	60
CONCLUSÕES GERAIS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Resumo

Numerosos estudos têm demonstrado a relevância da morfologia dos espermatozóides para determinação da filogenia no filo Mollusca. Adicionalmente, o estudo da morfologia e do número de cromossomos tem correspondido a uma eficiente ferramenta para a identificação de espécies, de híbridos e, menos usualmente, de populações. O presente trabalho analisou a ultra-estrutura dos espermatozóides de duas espécies do gênero *Brachidontes* e uma espécie do gênero *Isognomon*. As espécies *B. darwinianus* e *I. bicolor* foram também estudadas citogeneticamente. Moluscos pertencentes ao gênero *Brachidontes* vivem na zona entre marés de enseadas e baías e se fixam pelo bisso ao substrato rochoso, formando aglomerados de centenas de indivíduos. *Brachidontes solisianus* encontra-se distribuído da Costa Atlântica do México até o Uruguai e *B. darwinianus* é encontrado do Rio de Janeiro a Patagônia. Na costa do Estado de São Paulo, populações dessas duas espécies que exibem caracteres conquiológicos muito semelhantes, compartilham áreas em comum. A utilização da forma da concha como característica para separar mitilídeos é questionável, pois suas conchas, por possuírem grande plasticidade, podem apresentar variações morfológicas devido às influências ambientais. A espécie *I. bicolor* é encontrada no litoral brasileiro com distribuição do Rio Grande do Norte até Santa Catarina. O extremo norte da distribuição da espécie é Bermudas, com ocorrência pelo litoral da Flórida, Golfo do México e Caribe. Acredita-se que *I. bicolor* tenha sido sistematicamente, e de longa data, confundido com *I. alatus*. A grande similaridade nas características externas da concha de *I. alatus* e *I. bicolor*, a variabilidade intra-específica na forma de ambas espécies, mais o fato de terem hábitos e habitats semelhantes, podem conduzir a equívocos de identificação. Os espécimes ocorrem desde o supralitoral até sete metros de profundidade no infralitoral. Os espermatozóides de *B. darwinianus*, *B. solisianus* e *I. bicolor*, como aqueles produzidos por muitas espécies de bivalves, apresentam uma morfologia típica de animais marinhos que lançam seus gametas fertilizando seus ovos na

água do mar. Os gametas masculinos de *B. darwinianus*, de *B. solisianus* e de *I. bicolor* contém: acrossomo conspícuo (cônico e alongado em *Brachidontes* e arredondado em *Isognomon*); núcleo esferiforme condensado; um par de centríolos e 4-5 mitocôndrias situadas na peça intermediária e um axonema portador de 9 pares de microtúbulos ao redor de um par central. A estrutura geral do espermatozóide de *Brachidontes* é bastante semelhante a de outras espécies da mesma sub-família e parece agrupar esse gênero adequadamente na classificação atualmente aceita, ou seja, sub-família Modiolinae. A única característica que permite distinguir o espermatozóide destas duas espécies é o comprimento do acrossomo. A presença de um prolongamento acrossomal em *B. solisianus* pode significar um aumento da eficiência reprodutiva e deste modo contribuir para a maior distribuição geográfica desta espécie. Em relação a ultra-estrutura do espermatozóide de *I. bicolor*, estudos sobre a biologia da fertilização desta espécie são necessários para melhor compreender o significado biológico da presença de um filamento axial no espaço subacrossomal e de grânulos de glicogênio na peça intermediária. Considerando o fato de que esta espécie apresenta ampla distribuição geográfica e que tem se tornado uma espécie invasora em muitas regiões, especialmente no Brasil, seria interessante, verificar se estas características morfológicas do espermatozóide são capazes de proporcionar aumento na eficiência reprodutiva. A análise citogenética revelou a presença de $2n = 30$ cromossomos para *B. darwinianus* e $2n = 28$ cromossomos para *I. bicolor*. Os resultados obtidos foram comparados com cariótipos de outros bivalves. Os números encontrados são comuns dentro da família Mytilidae e super-família Pteriacea, respectivamente, deste modo, estas espécies estão adequadamente classificadas, de acordo com os caracteres cromossômicos estudados.

Abstract

Although bivalve species are well known anatomically, the taxonomic relationships among many of the species in this class are controversial. Numerous investigations have demonstrated the usefulness of sperm morphology in evaluating molluscan phylogeny. In this work, we used transmission and scanning electron microscopy to study the structure of mature spermatozoa from three bivalves, *Brachidontes darwinianus*, *Brachidontes solisianus* and *Isognomon bicolor* from the southeastern Brazilian coast, and compared them with those of other bivalves, particularly other members of the sub-class Pteriomorphia. The Giemsa-stained karyotypes of *B. darwinianus* and *I. bicolor* were also determined and compared with those of other bivalves. The genus *Brachidontes* has a wide geographic distribution and is particularly abundant in the intertidal zone of many rocky shores along the Brazilian coast, often in areas with strong water currents. *Brachidontes darwinianus* occurs from the state of Rio de Janeiro, Brazil, to Patagonia, in Argentina, whereas *B. solisianus* is distributed from Mexico to Uruguay. The spermatozoa of both species were of the primitive or ect-aquasperm type. In both species, the spermatozoan head contained a spheroidal nucleus capped by a conical acrosome with an anterior extension. No actin was detected in the subacrosomal region. However, immunocytochemical staining identified actin throughout the sperm nucleus of both species. The chromatin was highly electron-dense, homogenous and compact, and the nuclei contained randomly distributed, electron-lucent regions formed by invaginations of the nuclear envelope. These invaginations were detected by E-PTA staining for glycoproteins at low pH. The midpiece region consisted of five spherical mitochondria grouped in a ring around a pair of short cylindrical centrioles. The flagellum exhibited the typical 9+2 microtubule structure (nine double outer tubules + two single central tubules). The only marked difference in the morphology of spermatozoa from these two species was the longer anterior extension of the acrosomal vesicle in *B. solisianus*. This elongated acrosome may facilitate penetration of the jelly coat and cytoplasm of

large oocytes and could increase the efficiency of fertilization. The resulting enhanced reproductive success could account for the wider geographic distribution of *B. solisianus*. *Isognomon bicolor* is distributed throughout many countries in the Americas. This species has an epifaunal existence and is usually found attached by its byssus to jetty pilings or growing in crevices on rocky shores exposed to strong water currents. The spermatozoa of this species were of the primitive or ect-aquasperm type. The sperm head consisted of a round-to-oval, electron-dense nucleus (with an anterior fossa) capped by a small acrosome that contained an outer electron-dense and inner electron-lucent region. The subacrosomal region had a thin filament that could play an important role in fertilization. Immunocytochemical analysis revealed the presence of actin throughout the nucleus of *I. bicolor* sperm, but no actin was detected in the subacrosomal area. Hence, the chemical nature of the amorphous material and of the tenuous filament present in the subacrosomal area remains unknown. The midpiece contained four or five spherical mitochondria surrounding the centriole apparatus. Deposits of electron-dense granules, considered to be perimitochondrial glycogen, were observed around the centrioles and mitochondria. The flagellum had the typical 9+2 microtubular pattern. All of the *B. darwinianus* specimens studied had a diploid number of $2n=30$ chromosomes whereas those of *I. bicolor* had a diploid number of $2n=28$. This chromosomal number is relatively common among closely related species of *Brachidontes* and *Isognomon*.

Introdução Geral

Considerando a diversidade biológica o objeto central da Sistemática, seus problemas são: (1) a descrição da diversidade biológica, (2) busca de ordem ou padrões capazes de agrupar espécies distintas, (3) compreensão dos processos que são responsáveis pela criação deste incrível mosaico biológico (seleção e evolução), (4) apresentação de um sistema geral de referência sobre a diversidade biológica. É quase desnecessário enfatizar o fato de que o conhecimento descritivo para a Sistemática é fundamental para qualquer inferência e é a única base de dados para recuperar a informação histórica dos grupos (AMORIM, 2001).

Os filogeneticistas tecem a história evolutiva dos grupos selecionando e conectando descrições de fragmentos da diversidade biológica. As linhas que usualmente empregam para conectar esses fragmentos podem ser facilmente removidas a medida em que outras descrições de espécies são elaboradas. Pesquisadores procuram, recortam e colam os mais diversos dados obtidos com o intuito de edificar os cladogramas mais parcimoniosos.

1. ASPECTOS GERAIS DA TAXONOMIA DOS MOLUSCOS BIVALVES

Os moluscos bivalves são portadores de um corpo lateralmente comprimido com duas conchas externas conectadas dorsalmente. As valvas são unidas por um ligamento elástico parcialmente calcificado e mantidas juntas por um ou dois músculos adutores. Não há aparelho bucal ou radular e os lobos do manto são unidos ou livres ventralmente. A ampla cavidade do manto estende-se em cada lado da massa visceral e apresenta um par de ctenídios (brânquias) suspensos. As brânquias podem ser desenvolvidas, lameladas ou plicadas. A boca e o ânus são localizados em regiões opostas do corpo e o intestino é tipicamente convoluto. Um par de palpos labiais ciliados conecta as brânquias à boca, sendo responsável pela condução de partículas alimentares para esta.

Estas modificações a partir de condições plesiomórficas de moluscos dificultam o estabelecimento de um quadro filogenético para a classe Bivalvia. Os problemas são gerados pelas dificuldades em definir homologias de certas estruturas significativas para a taxonomia de bivalves que não são presentes nas outras classes de moluscos (GIRIBET e WHEELER, 2002).

2. O ESPERMATOZÓIDE DOS BIVALVES

Nos anos recentes, a ultra-estrutura dos espermatozóides tem sido extensivamente utilizada para solucionar inúmeros problemas taxonômicos e filogenéticos nos Metazoa. A especificidade da ultra-estrutura dos espermatozóides foi inicialmente observada em mamíferos e subseqüentemente confirmada para outros grupos animais (KAFANOV e DROZDOV, 1998). Numerosos estudos têm demonstrado a relevância da morfologia dos espermatozóides para determinação da filogenia no filo Mollusca. Particularmente, muitas investigações revelaram que espécies intimamente relacionadas (muito semelhantes) podem ser diferenciadas através do estudo da ultra-estrutura do espermatozóide, conferindo legitimidade a determinadas espécies (BERNARD e HODGSON, 1985; HEALY, 1989, 1995; ECKELBARGER *et al.*, 1990; GUERRA *et al.*, 1994; REUNOV e HODGSON, 1994; SOUZA e OLIVEIRA, 1994; KAFANOV e DROZDOV, 1998; GWO *et al.*, 2002).

Os espermatozóides de moluscos estão inseridos na categoria dos mais distintos morfologicamente dentre os Metazoa. Atualmente acredita-se que a morfologia dos gametas masculinos seja correlacionada com o modo de fertilização (KAFANOV e DROZDOV, 1998), a estrutura da membrana do ovo e o desenvolvimento direto ou indireto (presença de estágio larval). Em geral, animais aquáticos que liberam seus gametas na água que os envolve apresentam espermatozóides considerados *primitivos*, em oposição, animais com fertilização interna produzem espermatozóides *modificados* (KOMARU e KONISHI, 1996).

FRANZÉN (1977) afirmou que a maioria das espécies de bivalve produz espermatozóides ditos primitivos. Estes são portadores de uma pequena cabeça redonda ou cônica, uma peça intermediária contendo 4-5 mitocôndrias esféricas e uma cauda composta por nove duplas ao redor de uma dupla central de microtúbulos (GUERRA *et al.*, 1994). Contudo, há inúmeras descrições de espermatozóides de bivalves que revelam caracteres morfológicos diferentes daqueles apresentados no tipo *primitivo* (ECKELBARGER *et al.*, 1990; KOMARU e KONISHI, 1996). A presença de núcleo alongado e a perda da peça intermediária são características dos espermatozóides de *Codakia orbicularis*, *Scrobicularia plana*, *Tellina rostrata* e *Corbicula sandai*. Nestas espécies, os oócitos são maiores que aqueles produzidos pelas espécies com espermatozóides primitivos.

Características morfológicas de algumas estruturas de espermatozóides podem ser explicadas pela mudança no modo ou local no qual os oócitos são fertilizados. Acredita-se especialmente que a vesícula acrossomal seja a estrutura mais diretamente afetada por determinadas modificações, considerando-se o fato de que o acrossomo encontra-se marcadamente reduzido ou mesmo ausente em muitas espécies de bivalves que exibem cuidado parental (GARRIDO e GALLARDO, 1996). Espécies com cuidado parental são aquelas que protegem os indivíduos em estágio larval no interior da cavidade do manto até o momento em que estas larvas estejam preparadas para serem liberadas no ambiente aquático. De acordo com Popham (1979), a significativa redução do acrossomo de espermatozóides de espécies unionoides (bivalves com cuidado parental que fertilizam os óvulos no interior da cavidade do manto) pode estar correlacionada com uma mudança no ambiente de fertilização e possivelmente devido à existência de oócitos com uma camada gelatinosa relativamente delgada (quando comparada com oócitos provenientes de espécies que não apresentam cuidado das larvas). A espécie *Corbicula fluminae* produz espermatozóides biflagelados. A morfologia do espermatozóide de *C. leana* é altamente modificada. As modificações incluem: a presença de dois flagelos, a alongação da cabeça, a não distinção da peça intermediária e a existência de uma estrutura membranosa

envolvendo o flagelo (*wing-like structure*) (KOMARU e KONISHI, 1996). Komaru e Konishi (1996) afirmaram que uma possível razão para a existência de uma cabeça alongada em espermatozóides de bivalves é o fato de que esta forma é mais eficiente para penetração na espessa camada gelatinosa e amplo citoplasma do óvulo. Em *C. leana* e *C. sandai*, os diâmetros dos óvulos são 167 μ m e 130 μ m, respectivamente, em oposição às espécies *Macra chilensis*, *Mytilus edulis* e *Crassostrea gigas*, cujas dimensões dos óvulos variam entre 50 e 70 μ m (ISHIKAWA e NUMAMIYA, 1988).

Em contrapartida, Healy (1989) demonstrou que tanto o gênero marinho *Neotrigonia* (com fertilização externa) quanto unionoides de água doce apresentam espermatozóides portadores de morfologia acrossomal muito semelhante. Adicionalmente, alguns estudos de ultra-estrutura de espermatozóide têm mostrado que espécies (que cuidam de suas larvas) das famílias Teredinidae (POPHAM, 1974), Dreissenidae (FRANZÉN, 1983) e Galeommatidae (FOIGHIL, 1985; ECKELBARGER *et al.*, 1990) apresentam uma vesícula acrossômica cônica e conspícua. Considerando-se a elevada divergência, entre os autores acima mencionados, quanto à relação entre a morfologia de espermatozóides e as características do óvulo e do local no qual acontece a fertilização, torna-se essencial a necessidade de estudos sobre a fertilização de inúmeras espécies de bivalves, para a compreensão do significado biológico do núcleo e/ou acrossomo alongado em certas espécies.

Espermatozóides de *Cardita muricata* (Carditidae), *Eucrassatella cumingii*, *E. kingicola* e *Talabrica aurora* (Crassatelidae) diferem do tipo clássico de espermatozóide que fertiliza os óvulos na água (*aquasperm*) devido ao fato de apresentarem uma longa vesícula acrossomal e um núcleo alongado. Adicionalmente, a região da peça intermediária destas espécies apresenta um arranjo de 8 (raramente 7 ou 9) mitocôndrias agrupadas em volta de um bastão elétron-denso, o qual é contínuo com o centríolo distal. O centríolo proximal é ausente no espermatozóide maduro de crassatelídeos e carditídeos. Esta situação contrasta com a presença de um centríolo proximal não modificado em todos os

outros bivalves cuja ultra-estrutura dos espermatozóides foi investigada (HEALY, 1995).

Os gametas masculinos dos bivalves comensais *Divariscintilla yoyo*, *Divariscintilla troglodytes* e *Scintilla* sp. (Galeommatoidea) apresentam assimetria rotacional e depósitos de glicogênio perimitocondriais. Estes caracteres não são comuns na classe a qual pertencem e podem refletir especializações de fertilização e cuidado das larvas, os quais são freqüentes entre os Galeommatoidea (ECKELBARGER *et al.*, 1990). Muitos trabalhos defendem a idéia de que a morfologia alterada de espermatozóides de bivalves pode estar relacionada a hermafroditismo com possível auto-fecundação e proteção dos estágios larvais (ECKELBARGER *et al.*, 1990; REUNOV e HODGSON, 1994; KOMARU e KONISHI, 1996; KAFANOV e DROZDOV, 1998).

3. O ESPERMATOZÓIDE DOS MYTILIDAE

O acrossomo das espécies, estudadas até a presente data, da família Mytilidae é invaginado posteriormente, criando um espaço subacrossomal (BERNARD e HODGSON, 1985; REUNOV e HODGSON, 1994; KAFANOV e DROZDOV, 1998). Quanto ao bastão axial em acrossomos de espermatozóides intactos, as espécies analisadas de Mytilidae podem ser nitidamente classificadas em dois grupos menores: aqueles que não possuem bastão axial (subfamília Modiolinae) e aqueles que apresentam esta estrutura (subfamília Mytilinae). Portanto, os Mytilidae recentes são reunidos em duas subfamílias: Modiolinae e Mytilinae (KAFANOV e DROZDOV, 1998).

O bastão axial do acrossomo corresponde a um feixe de filamentos de actina, o qual, durante a reação acrossomal constitui a base para a formação do filamento acrossomal. Devido ao fato de que a reação acrossomal tem uma importante função na fertilização e no início da ontogênese, assume-se que a presença ou ausência do bastão axial é de grande importância taxonômica. A

ausência desta estrutura sugere evidências de que os gametas com esta morfologia são mais *primitivos*.

Os acrossomos de muitos invertebrados marinhos são constituídos por um *perforatorium* encapsulado por uma vesícula. O *perforatorium* parece formado por feixes de finos filamentos de actina como demonstrado por tratamentos com faloidina. Análises de espermatozóides de bivalves, em microscópio eletrônico, revelaram que os filamentos de actina podem estar organizados na forma de um bastão axial (como na subfamília Mytilinae) ou dispostos próximos a superfície nuclear. A presença de filamentos de actina em diferentes regiões da cabeça do espermatozóide, sobretudo na periferia do acrossomo ou na fossa subacrossomal, tem sido descrita em mamíferos (GUERRA *et al.*, 1994).

A organização das mitocôndrias ao redor dos centríolos é basicamente constante entre os bivalves. No entanto, o número de mitocôndrias mostra variações substanciais entre determinadas espécies. É freqüente a presença de 5 mitocôndrias na peça intermediária, como ocorre nos gêneros *Adula*, *Crenomytilus*, *Musculita*, *Mytilus*, *Perna* e *Septifer* (família Mytilidae), *Neotrigonia* (Trigoniidae), *Circe*, *Gafrarium* e *Pitar* (Veneridae), *Corbicula* (Corbiculidae). Já *Modiolus curilensis* apresenta 12-14 mitocôndrias; esta espécie não apenas faz parte da família Mytilidae, como também é integrante da mesma subfamília na qual o gênero *Brachidontes* encontra-se inserido atualmente (BERNARD *et al.* 1988; HEALY, 1989; REUNOV e HODGSON, 1994; KOMARU e KONISHI, 1996; KAFANOV e DROZDOV, 1998; GWO *et al.*, 2002). O número de mitocôndrias não apresenta relevância filogenética dentre os Pteriomorphia, pois espécies muito próximas evolutivamente podem apresentar números de mitocôndrias completamente diferentes. Adicionalmente, algumas espécies pertencentes a famílias distantes como Mytilidae e Veneridae (GIRIBET e WHEELER, 2002), por exemplo, exibem o mesmo número de elementos mitocondriais disposto ao redor dos centríolos.

4. ESTUDOS CITOGENÉTICOS DE BIVALVES

O ambiente marinho contém uma diversidade de grupos animais que não é encontrada em nenhum outro ambiente do planeta. Entretanto, com algumas poucas exceções, o conhecimento citogenético da maioria dos invertebrados marinhos é rudimentar e, em muitos casos, inexistente. Em apenas dois *taxa* de invertebrados marinhos, os moluscos bivalves e os poliquetos, a nossa compreensão sobre caracteres cromossômicos atingiu uma dimensão relevante (DIXON e WILSON, 2000).

Os cromossomos podem ser estudados como uma manifestação morfológica do genoma devido à visualização microscópica de seus tamanhos, formas, número e comportamento durante a mitose e a meiose (THIRIOT-QUIEVREUX, 2002). O estudo da morfologia e número de cromossomos tem correspondido a uma eficiente ferramenta para a identificação de espécies, de híbridos e, menos usualmente, de populações (GOSLING, 1992).

Particularmente, as famílias Mytilidae e Ostreidae têm sido intensamente investigadas quanto aos caracteres citogenéticos, permitindo comparações citotaxonômicas cada vez mais acuradas. Os principais tecidos utilizados para obtenção de metáfases são as brânquias e as gônadas (RODRÍGUEZ *et al.*, 1983; IEYAMA, 1994, 1996; PARK e BURCH, 1995; MARTÍNEZ-LAGE *et al.*, 1996; HOLAND *et al.*, 1999; LEITÃO *et al.*, 1999; TORREIRO *et al.*, 1999). Evidentemente, há épocas do ano nas quais o número de indivíduos sexualmente maduros nas populações de bivalves é maior, entretanto, normalmente, a maioria das populações apresenta exemplares reprodutivamente ativos durante todo o ano. Este fato explica porque as gônadas são utilizadas para o emprego das técnicas de obtenção cromossômica. As brânquias correspondem à outra estrutura amplamente utilizada para os estudos citogenéticos. O processo contínuo de filtração da água para obtenção de partículas alimentares torna os ctenídios tecidos submetidos a constante reposição celular. Alguns autores alimentam durante semanas os exemplares de bivalves com soluções de

determinadas algas como *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*, com o objetivo de elevar o número de divisões somáticas (MARTÍNEZ-LAGE *et al.*, 1996; TORREIRO *et al.*, 1999).

Em geral, nos tecidos dos invertebrados marinhos, existe naturalmente um número pequeno de células em divisão. Estas células são encontradas circundadas por grande número de núcleos interfásicos em preparações citogenéticas. A taxa de crescimento dos bivalves depende das estações do ano, ou seja, da temperatura; além disso, estes moluscos são portadores de pequena quantidade de tecidos hemocitopoiéticos - centros meristemáticos de divisão celular (DIXON e WILSON, 2000). Estes fatores minimizam as possibilidades de obtenção de metáfases cromossômicas a partir de tecidos adultos como brânquias, gônadas e manto. Em uma tentativa de transpor as limitações mencionadas, numerosos estudos têm utilizado preparações cromossômicas a partir de células embrionárias ou larvais (DIXON e WILSON, 2000). Há inúmeras formas de induzir a liberação de gametas pelos bivalves: choques mecânicos e térmicos, alterações na salinidade, introdução de substâncias ao meio no qual se encontram os moluscos, injeção de certos agentes no interior dos indivíduos, entre outras. Entre os agentes químicos que atuam como indutores da liberação de gametas, podem ser citadas as soluções de hidróxido de amônia, aplicadas diretamente nos exemplares (RODRÍGUEZ-ROMERO e GASCA-MONTES de OCA, 1998). A serotonina induz tanto a maturação de oócitos como a liberação de gametas em bivalves. As drogas maleato de fluvoxamina, fluoxetina e paroxetina (comumente utilizadas para o tratamento de depressão humana) agem desencadeando aumento da neurotransmissão da serotonina através da inibição das proteínas transportadoras que capturam a serotonina nas regiões sinápticas. A substância maleato de fluvoxamina é o mais poderoso indutor conhecido de liberação de gametas em bivalves (FONG, 1998).

Uma outra alternativa adotada por alguns pesquisadores é o cultivo celular *in vitro* (CORNET, 1993, 1995; DIXON e WILSON, 2000). A grande maioria das técnicas empregadas para o estudo cromossômico de bivalves envolve

preparações citológicas obtidas diretamente de tecidos de indivíduos adultos. Estas técnicas apresentam vantagens: são rápidas e com baixos custos. Mas, apresentam desvantagens: fornecem um reduzido número de metáfases com qualidade consistente. Para transpor essas limitações, métodos de cultivo celular de bivalves foram desenvolvidos para aquisição de elevada produção de mitoses com boa qualidade (CORNET, 1995).

5. BRACHIDONTES DARWINIANUS E B. SOLISIANUS

Moluscos pertencentes ao gênero *Brachidontes* são pequenos, com as conchas medindo em média dois centímetros de comprimento (TANAKA e MAGALHÃES, 1999). Vivem na zona entre marés de enseadas e baías e se fixam pelo bisso ao substrato rochoso, formando aglomerados de centenas de indivíduos.

Brachidontes solisianus encontra-se distribuído da Costa Atlântica do México até o Uruguai e *B. darwinianus* é encontrado do Rio de Janeiro a Patagônia (RIOS, 1995). Na costa do Estado de São Paulo, populações dessas duas espécies compartilham áreas em comum.

A utilização da forma da concha como característica para separar mitilídeos é questionável, pois suas conchas, por possuírem grande plasticidade podem apresentar variações morfológicas devido às influências ambientais (SEED, 1967). Alterações nas proporções das conchas, devido à densidade de indivíduos, também são comuns e foram demonstradas em *Modiolus demissus* (LENZ, 1967) e em outros mitilídeos (BROWN *et al.*, 1976).

Em *Brachidontes*, as características morfológicas das conchas, que são normalmente usadas para distinguir espécies, também variam de acordo com as condições ambientais (KLAPPENBACH, 1965; NALESSO *et al.*, 1992). Esses autores analisaram *Brachidontes darwinianus* e concluíram que esta espécie apresenta grande flexibilidade fenotípica; além da plasticidade na morfologia externa da concha; também foi demonstrado que *B. darwinianus* apresenta

adaptações fisiológicas reversíveis em relação ao limite de tolerância a variação de salinidade (NALESSO *et al.*, 1992).

Entretanto, considerando que seria muito útil poder identificar *Brachidontes* por características morfológicas das conchas, Tanaka e Magalhães (1999) analisaram *B. darwinianus* e *B. solisianus* coletados em seis áreas de simpatria no sudeste do Brasil. Os indivíduos foram medidos e avaliados quanto ao comprimento, altura, largura da concha e outras características. Esses autores concluíram que todas as relações alométricas variavam de acordo com o local, exceto a relação altura/comprimento. Outras características geralmente selecionadas para separar essas espécies, como o ângulo formado pela margem ventral da concha e o ligamento ou a distância do músculo bissal e o ligamento ou, ainda, o número de estrias radiais, não se mostraram adequadas pois variaram durante a ontogenia ou de acordo com o ambiente. Assim, segundo aqueles autores, uma única característica (relação altura/comprimento) não seria suficiente para separar essas espécies, sendo, portanto, necessária a combinação de vários caracteres.

6. ISOGNOMON BICOLOR

A família Isognomonidae está constituída pelos seus dois únicos gêneros viventes, *Crenatula* (Lamarck, 1804) e *Isognomon* (Solander, 1786). O primeiro gênero reúne espécies desprovidas de bisso e vivendo associadas a esponjas, e o segundo reúne espécies bissadas que se fixam a substratos firmes, incluindo vegetação de manguezais (MARTINS, 2000). No Atlântico Oeste, o gênero *Crenatula* está representado por *Crenatula avicularis* (Lamarck, 1804) e *Isognomon* por *I. alatus* (Gmelin, 1791), *I. radiatus* (Anton, 1839) e *I. bicolor* (C.B. Adams, 1845).

A espécie *Isognomon bicolor* é encontrada no litoral brasileiro com distribuição do Rio Grande do Norte até Santa Catarina. O extremo norte da distribuição da espécie é Bermudas, com ocorrência pelo litoral da Flórida, Golfo

do México e Caribe (MARTINS, 2000). Acredita-se que *I. bicolor* tenha sido sistematicamente, e de longa data, confundido com *I. alatus*. A grande similaridade nas características externas da concha de *I. alatus* e *I. bicolor*, a variabilidade intra-específica na forma de ambas espécies, mais o fato de terem hábitos e habitats semelhantes, podem conduzir a equívocos de identificação (MARTINS, 2000; DOMANESCHI e MARTINS, 2002).

Os espécimes ocorrem desde o supralitoral, onde vivem no interior de poças de maré, até sete metros de profundidade no infralitoral. Entretanto, no mesolitoral, uma maior concentração de indivíduos é observada. Em costões amplos, de grande declividade, banhados por ondas de baixo impacto e correndo paralelas a superfície da rocha, são encontradas as maiores densidades de indivíduos, formando uma faixa distinta e disputando espaços na faixa de *Brachidontes* e ostras (MARTINS, 2000).

A literatura aponta para *I. bicolor* alturas entre 28 mm e 38 mm enquanto que para *I. alatus* as alturas são muito superiores, atingindo valores entre 76 mm e 90 mm. A concavidade das valvas dos exemplares de *I. bicolor* é bastante acentuada, já as valvas de *I. alatus* são rasas, com concavidade não significativa. *Isognomon bicolor* apresenta revestimento nacarado restrito a área côncava, enquanto a área marginal é constituída exclusivamente por camada prismática. Nos indivíduos pertencentes à espécie *I. alatus*, a superfície nacarada ultrapassa a área côncava podendo se estender sobre a área marginal até próxima à margem livre das valvas, restringindo a camada exclusivamente prismática a uma faixa periférica bastante estreita (MARTINS, 2000).

O primeiro registro de um Isognomonidae no Brasil ocorreu no Atol das Rocas e foi descrito como *I. alatus* (MATHEWS e KEMPF, 1970). Entretanto, diante das similaridades entre as duas espécies e sabendo-se que *I. bicolor* tem sido durante anos confundido com *I. alatus*, não existe certeza em relação a qual das espécies é encontrada no Atol das Rocas. A espécie *I. alatus* já foi analisada citogeneticamente, sendo o seu cariótipo diplóide composto por 28 cromossomos (RODRÍGUEZ *et al.*, 1983).

Objetivos

O presente trabalho analisou a ultra-estrutura dos espermatozóides de duas espécies do gênero *Brachidontes* (Mollusca, Bivalvia, Pteriomorphia, Mytiloida, Mytilidae, Modiolinae) e uma espécie do gênero *Isognomon* (Mollusca, Bivalvia, Pteriomorphia, Isognomonidae) contribuindo deste modo para a descrição de um diminuto fragmento da diversidade biológica e para a sistemática de Bivalves. Adicionalmente, as espécies *Brachidontes darwinianus* e *Isognomon bicolor* foram estudadas citogeneticamente.

Artigo I

(Aceito para publicação em *Invertebrate Reproduction and Development*)

Spermatozoan morphology of *Brachidontes darwinianus* and *B. solisianus* (Bivalvia, Mytilidae) from the southern Brazilian coast

¹Gisele Orlandi Introíni, ²Cláudia Alves de Magalhães, ¹Odair Aguiar-Jr, ¹Alexandre José C. Quaresma, ³José Lino-Neto and ¹Shirlei M. Recco-Pimentel

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, SP, Brasil

²Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, SP, Brasil

³Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36571-000 Viçosa, MG, Brasil

Running title: Spermatozoa of two species of *Brachidontes*

Key words: Bivalvia, Mytilidae, mussel, spermatozoa, ultrastructure, nuclear invagination, nuclear actin.

Send correspondence to: Shirlei M. Recco-Pimentel; shirlei@unicamp.br; Fax: +55-19-37886111.

ABSTRACT

Numerous investigations have demonstrated the usefulness of sperm morphology in evaluating molluscan phylogeny. In this work, we used transmission and scanning electron microscopy to study the structure of mature spermatozoa from two bivalves, *Brachidontes darwinianus* and *B. solisianus*, and compared them with those of other bivalves, particularly other mytilids. These two species have a wide geographic distribution and are particularly abundant in the intertidal zone of many rocky shores along the Brazilian coast, often in areas with strong water currents. *Brachidontes darwinianus* occurs from the state of Rio de Janeiro, Brazil, to Patagonia, in Argentina, whereas *B. solisianus* is distributed from Mexico to Uruguay. The spermatozoa of both species were of the primitive type or ect-aquasperm form. In both species, the spermatozoan head contained an spheroidal nucleus capped by a conical acrosome with an anterior extension. No actin was detected in the subacrosomal region. However, immunocytochemical staining identified actin throughout the nucleus of the sperm of both species. The chromatin was strongly electron-dense, homogenous and compact. The nuclei contained randomly distributed, electron-lucent regions formed by invaginations of the nuclear envelope. These invaginations were detected by E-PTA staining for glycoproteins at low pH. The mid-piece region consisted of five spherical mitochondria grouped in a ring around a pair of short cylindrical centrioles. The flagellum exhibited the typical 9+2 microtubule structure (9 double outer tubules + 2 single central tubules). These findings, together with conchological characteristics, can be used to distinguish between *B. darwinianus* and *B. solisianus*. The only marked difference in the morphology of spermatozoa from these two species was the longer anterior extension of the acrosomal vesicle in *B. solisianus*. This elongated acrosome may facilitate penetration of the jelly coat and cytoplasm of large oocytes and could increase the efficiency of fertilization. The resulting enhanced reproductive success could account for the wider geographic distribution of *B. solisianus*.

INTRODUCTION

Mussels belonging to the genus *Brachidontes* are small (average length = 2 cm) and have sculptured radial ribs with crenulated margins and short ligaments. *Brachidontes* species are common in the intertidal zone of rocky shores and mangroves. *Brachidontes darwinianus* and *B. solisianus* have a triangular shape and antero-posterior ventral flattening that are adaptations to habitats where there is considerable wave drag (Tanaka and Magalhães 1999). These two species have a wide geographic distribution and are particularly abundant along the Brazilian coast, often in areas with strong water currents. *Brachidontes darwinianus* occurs from the state of Rio de Janeiro, Brazil, to Patagonia, in Argentina, whereas *B. solisianus* is distributed from Mexico to Uruguay (Rios 1995).

Young individuals of these two species are difficult to distinguish. A good taxonomic predictor is the presence of radial ribs over the entire shell surface in *B. darwinianus*, while in *B. solisianus* these ribs are present only at the posterior margin of the shell. The number of ribs in *B. darwinianus* varies depending on the salinity of the water, with mussels from rivers having more ribs than those from the sea. On exposed shores, the shells are frequently more eroded, and this increases the difficulty in distinguishing *B. darwinianus* and *B. solisianus* (Nalesso et al. 1992; Tanaka and Magalhães 1999).

Recruits of both species are not distinguishable using shell characteristics, but the shell height:length ratio allows discrimination between adults of *B. darwinianus* and *B. solisianus* (Tanaka and Magalhães 1999). However, morphological characters are of little value in classifying mytilids because of extensive variations in shell plasticity. In species with planktonic development, the uncertainty of the recruitment site favors extensive phenotypic expression (Seed 1968). Phenotypic plasticity is adaptive for organisms that inhabit unpredictable sites and/or have a wide geographic range. These considerations apply to the species of *Brachidontes* because of the existence of a planktonic dispersal phase. Morphological characters, such as shell sculpturing and geometry, are frequently

complex and usually determined by many *loci* that can themselves be polymorphic (Berger 1983). Hence, it is inappropriate to consider only conchological features to distinguish between *B. darwinianus* and *B. solisianus*.

Several studies on sperm ultrastructure within the Bivalvia have confirmed the usefulness of sperm characters for taxonomic and phylogenetic analyses at and above the species level (Bernard and Hodgson 1985; Bernard et al. 1988; Healy 1989; Guerra et al. 1994; Sousa and Oliveira 1994; Reunov and Hodgson 1994; Healy 1995; Komaru and Konishi 1996; Kafanov and Drozdov 1998; Healy et al. 2001; Gwo et al. 2002). The primary goals of the present study were to describe the comparative sperm ultrastructure of *B. darwinianus* and *B. solisianus* and to compare the results obtained with available information on the Mytilidae.

MATERIAL AND METHODS

Adult specimens of the mussels *Brachidontes darwinianus* and *B. solisianus* were collected from Ubatuba bay (predominantly from Dura beach), on the southern Brazilian coast. The mussels were transported to the laboratory where they were maintained in seawater at 20°C.

Light Microscopy

A suspension of spermatozoa was fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.5) at 4°C, for 15 min, stained with 10% Giemsa and observed with an Olympus BX60 light microscope.

Scanning Electron Microscopy

A drop of sperm suspension was placed on a coverglass, prefixed with 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.5) at 4°C for 15 min, and postfixed with 1% OsO₄ for 10 min, before rinsing with

cacodylate buffer. The specimens were dehydrated in a graded ethanol series, critical point dried, coated with gold, and observed with a JSM 5800 LV microscope. In addition, after dehydration, some testes were freeze-fractured in liquid nitrogen, and then submitted to the same procedure described above.

Transmission Electron Microscopy

The testes were prefixed as described above for 5 h. The tissues were rinsed three times with cacodylate buffer and then post-fixed with 1% OsO₄ in the same buffer, for 1 h. The tissues were dehydrated in a graded acetone series and embedded in EPON 812 resin. Ultrathin sections stained with aqueous uranyl acetate and lead citrate were examined with a Zeiss Leo 906 transmission electron microscope.

Ultrastructural Cytochemistry

For phosphotungstic acid staining, ultrathin sections of glutaraldehyde-fixed tissues were collected in copper grids, stained for 20 min, and washed in distilled water.

Ultrastructural Immunocytochemistry

The testes were cut into fragments and fixed in the solution mentioned above for 5 h at 4° C. The tissue fragments were washed in buffer, dehydrated in acetone, and embedded in LRWhite resin. Ultrathin sections were collected on nickel grids and pre-incubated in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 0.05% glycine and 1% bovine serum albumin for 10 min at room temperature. After several rinses in the same buffer, non-specific binding was blocked with 0.05 M Tris-HCl containing 1% bovine serum albumin and 0.05% Tween for 30 min, followed by incubation for 1 h with an antibody against smooth muscle α -actin

(mono clone α -SMA), diluted 1:100 (Novocastra Laboratories Ltd. – England). After washing with 0.05 M Tris-HCl containing 0.5% bovine serum albumin, the grids were incubated for 1 h with respective labeled secondary antibody (rabbit anti-mouse-IgG-Au-conjugate, 10 nm) at a dilution of 1:50 (Sigma-Aldrich Co, USA). After incubation, the grids were washed with 0.05 M Tris-HCl and distilled water. The preparations were observed without counterstaining (Ferreira 2003). In addition, some nickel grids were submitted to a negative control (without the antibody against smooth muscle α -actin). The authors made a negative control with the goal of verify the possible occurrence of non-specific binding.

RESULTS

The spermatozoa of both species were of the primitive type or ect-aquasperm form (Fig. 1, 13, 25 - 28). In both species, the sperm head contained a nucleus capped by a conical acrosome with an anterior extension (Fig. 2, 3, 14, 15). The main axis of the nucleus of *B. darwinianus* sperm was perpendicular to the longitudinal section of the sperm, whereas the main axis of the nucleus of *B. solisianus* was parallel to the longitudinal section of the sperm (Table 1, Fig. 29). The acrosome of both species showed two distinct regions: the vesicle base was stained by E-PTA (phosphotungstic acid staining), whereas the acrosomal apex was not stained (Fig. 4, 16). The subacrosomal region between the vesicle base and the apical region of the nucleus was filled with a fibrillar material (Fig. 2, 3, 14, 15). No actin was detected in the subacrosomal region. However, immunocytochemical staining identified actin throughout the nucleus of the sperm of both species (Fig. 23, 24). The chromatin was strongly electron-dense, homogenous and compact. The nuclei contained randomly distributed, electron-lucent regions formed by invaginations of the nuclear envelope (Fig. 2, 5, 14). These invaginations were detected by E-PTA staining for glycoproteins at low pH (Fig. 4, 16). The midpiece region consisted of five spherical mitochondria grouped in a ring around a pair of short cylindrical centrioles (Fig. 6 - 8, 10, 17, 18, 20). The

flagellum exhibited the typical 9+2 microtubule structure (Fig. 9 – 12, 19 – 22). The only marked difference in the morphology of the spermatozoa between these two species was the longer anterior extension of the acrosomal vesicle in *B. solisianus*. These findings, together with conchological characteristics, can be used to distinguish between *B. darwinianus* and *B. solisianus*.

Table 1. Morphometric and numerical data of some sperm structures in the two species of bivalves studied (n= 5 individuals from each species).

Species	Acrosome length	Nucleus length	Nucleus width	Head length	Number of mitochondria
<i>B. darwinianus</i>	1.19 – 1.67	1.13 – 1.62	1.25 – 1.97	2.33 – 3.29	5
<i>B. solisianus</i>	1.80 – 3.63	1.19 – 1.86	1.00 – 1.55	2.99 – 5.42	5

All morphometric measurements are in μm and are shown as the range, except for number of mitochondria.

DISCUSSION

The spermatozoa of *Brachidontes darwinianus* and *B. solisianus* conform to the aquatic or aquasperm type, usually referred to as primitive sperm (Franzén 1977, Jamieson 1987, Rouse and Jamieson 1987). Aquasperm occur in animals that release spermatozoa into the surrounding water and are typically characterized by a conical acrosome, a short nucleus, a midpiece composed of spherical mitochondria grouped in a ring around a pair of short centrioles, and a simple flagellum (Healy et al. 2001).

The only marked difference in the morphology of the spermatozoa between these two species was the longer anterior extension of the acrosomal vesicle in *B. solisianus*. Morphological features and development of some sperm organelles seem to be explained by the change in the style and place where oocytes are fertilized; specially the acrosomal vesicle seems to be the organelle most directly

affected by certain modifications since it appears markedly reduced or even absent among some brooding bivalve species (Garrido and Gallardo 1996).

According to Popham (1979) the greatly reduced size of the acrosome in unionoid sperm may be correlated with a modified fertilization environment and possibly a thinner jelly coat of unionoid eggs (compared with oocytes of non-brooding species of bivalves). Komaru and Konishi (1996) stated that one possible reason for an elongated sperm head in some bivalves is that this shape is more efficient for penetration into the jelly coat and cytoplasm of the larger oocytes; for instance, in *Corbicula leana* and *C. sandai* the oocytes diameters are 167 μm and 130 μm , respectively, whereas in the species *Mactra chilensis*, *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas* egg size ranges from 50 to 70 μm (Ishikawa and Numamiya, 1988).

In opposition, Healy (1989) showed that the marine genus *Neotrigonia* - with external fertilization - and the fresh-water unionoids - brooding bivalves which fertilize within the mantle cavity - both have the same acrosomal features. In addition, some previous ultrastructural studies have showed that brooding species of the Teredinidae (Popham 1974), Dreissenidae (Franzén 1983) and Galeommatidae (Foighil 1985; Eckelbarger et al. 1990) all have a conspicuous and conical acrosome.

The present study states that the elongated acrosome of *Brachidontes solisianus* may facilitate penetration of the jelly coat and cytoplasm of large oocytes and could increase the efficiency of fertilization. The resulting enhanced reproductive success could account for the wider geographic distribution of *B. solisianus*. However, the relatively high divergence between the analyses mentioned above (Popham 1974, 1979; Franzén 1983; Foighil 1985; Ishikawa and Numamiya 1988; Healy 1989; Eckelbarger et al. 1990; Garrido and Gallardo 1996; Komaru and Konishi 1996) becomes essential the necessity of further studies on the fertilization biology in *Brachidontes darwinianus* and *B. solisianus* to better comprehend the biological significance of the elongated acrosome of these species.

Hence, the morphological feature of the spermatozoa, together with conchological characteristics, can be used to distinguish between *B. darwinianus* and *B. solisianus*.

The sperm of *B. darwinianus*, *B. solisianus*, *B. virgilae* (Bernard et al. 1988), and *B. semistriatus* (Reunov and Hodgson 1994) have a small head capped by a conical acrosomal vesicle, a midpiece with essentially the same organization in all species, and a flagellum, with the typical 9+2 arrangement of microtubules. However, in the sperm of *B. virgilae*, the long anterior extension of the acrosome is absent.

PTA staining at low pH for glycoproteins has been used to show different staining characteristics in the acrosomes of various species (Sousa and Oliveira 1994). However, in this study, no difference between *B. darwinianus* and *B. solisianus* sperm was detected by this technique. However, E-PTA staining revealed invaginations of the nuclear envelope in the sperm of both species. Gwo et al. (1997) and Healy et al. (2001) proposed that the electron-lucent areas present in the nucleus were lacunae. Lately, invaginations of the nuclear envelope were described in several cell types, and it was suggested that these invaginations were a common manifestation of nuclei, indicating that the nuclear envelope was a dynamic and fluid structure (Fricker et al. 1997; Johnson et al. 2003), even in such differentiated cells as spermatozoa. The function of these cytoplasmic, actin-filled, nuclear invaginations remains speculative.

According to Johnson et al. (2003) the inability to visualize nuclear actin with phalloidin suggested that this actin was not filamentous. Indeed, some authors have shown that the diffuse actin in the nucleoplasm is monomeric actin, and that the structures resembling filaments must contain monomeric rather than polymerized actin (Johnson et al. 2003). Immunocytochemistry revealed the presence of actin in the nucleus of the sperms of *B. darwinianus* and *B. solisianus*, which was easily distinguishable from chromatin.

Based on the absence/presence of an acrosomal rod, the members of the recent Mytiloidea have been grouped into two subfamilies: Modiolinae and

Mytilinae. Morphological features of the spermatozoa (absence of an acrosomal rod) of *B. darwinianus* and *B. solisianus* indicate that these species can be considered members of the subfamily Modiolinae. However, this classification is controversial since some authors have used conchological characteristics to place *Brachidontes* in the Mytilinae (Kafanov and Drozdov 1998; Distel 2000; Chichvarkhin 2002).

Molecular studies have shown that the subfamilies Mytilinae and Modiolinae are polyphyletic, suggesting that the mytiliform and/or modioliform body plans have evolved independently in at least two mytilid lineages. It seems reasonable that mytiliform body plan could have evolved independently and convergently in the phylogenetically distinct *Mytilus* and *Brachidontes* lineages as a consequence of their common adaptation to an epibyssate existence (Distel 2000).

Convergent evolution of the body plan has been invoked to explain the fact that the genus *Brachidontes* has been considered as a member of the subfamily Modiolinae (based on molecular data and sperm morphology). Probably, further examination of the phylogenetic relationships within *Brachidontes* could explain the evolution of the body plans within this lineage and their relationships to the other mytiliform taxa, e.g., *Septifer*, *Perna*, *Stavelia*, and *Trichomya* (Chichvarkhin 2002).

In conclusion, structural features of sperm (specially the size of the anterior extension of the acrosome) were successfully used to identify *B. darwinianus* and *B. solisianus*. In addition, acrosomal morphology (such as, absence of an axial rod) showed characteristic features that may be useful in the future to provide information on the systematic relationships of these mussels.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to Dr. Paulo Pinto Joazeiro for providing the infrastructure necessary to do the immunocytochemical analyses, Suzana Moraes (Department of Histology and Embryology, UNICAMP) for doing the schematic illustrations of the sperm and Stephen Hyslop (Department of Pharmacology,

UNICAMP) for reviewing an earlier version of the manuscript. This work was supported by CNPq, CAPES and FAEPEX/UNICAMP.

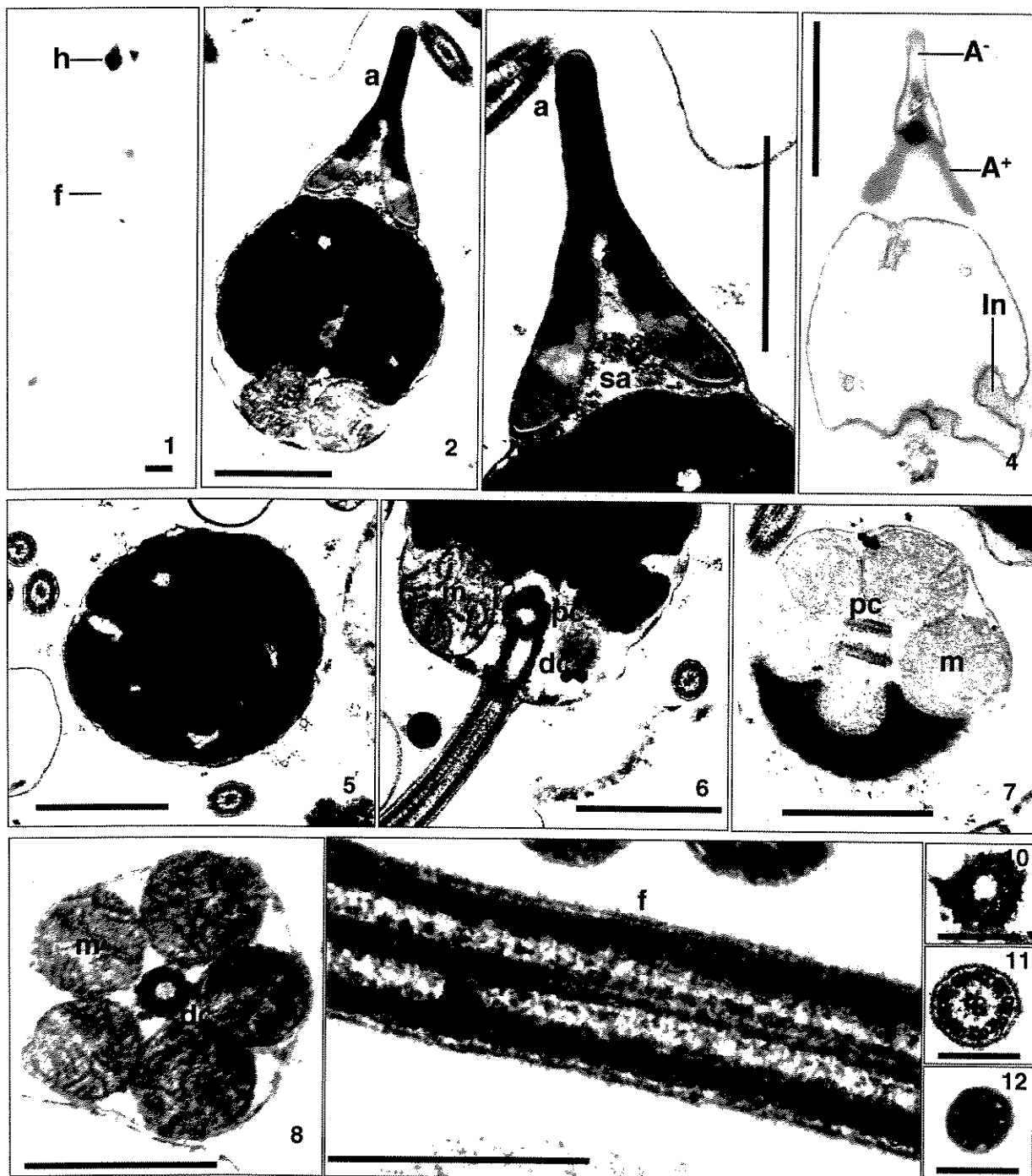
REFERENCES

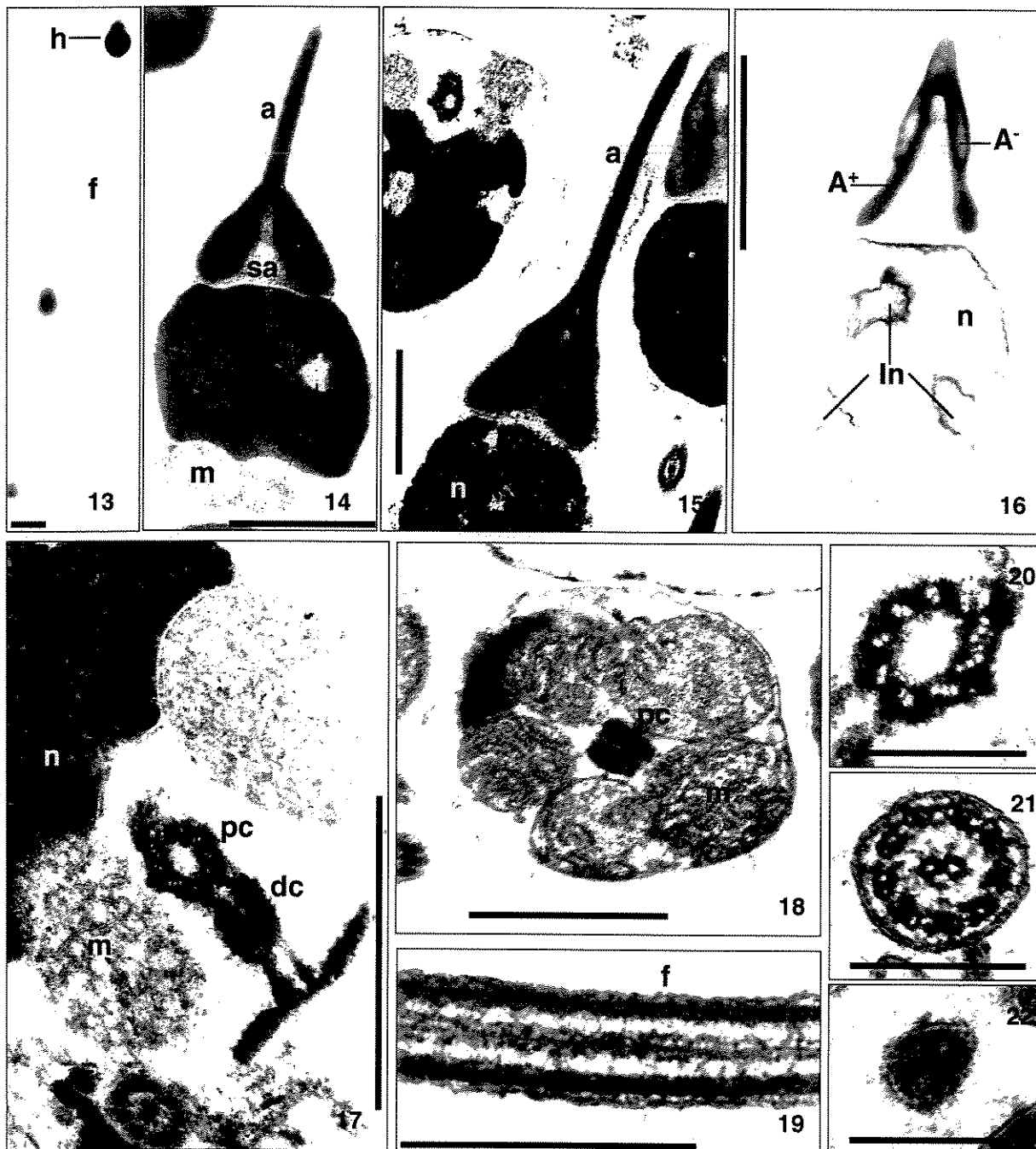
- Berger, E. M., Population genetics of marine gastropods and bivalves. *In*: The Mollusca, V.6, W.D. Russel-Hunter, ed., Academic Press, London, (1983), pp. 563-596.
- Bernard, R. T. F. and Hodgson, A. N., The fine structure of the sperm and spermatid differentiation in the brown mussel *Perna perna*, South Afr. J. Zool., 20 (1985) 5-9.
- Bernard, R.T.F., Davies, B. R. and Hodgson, A. N., Reproduction in a brackish-water mytilid: gametogenesis and embryonic development, The Veliger, 30 (1988) 278-290.
- Chichvarkhin, A. Y., Letter to the editor. Mol. Phylogen. Evol., 22 (2002) 330-332.
- Distel, D. L., Phylogenetic relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA data suggest convergence in Mytilid body plans, Mol. Phylogen. Evol., 15 (2000) 25-33.
- Eckelbarger, K. J.; Bieler, R.; Mikkelsen, P. M. Ultrastructure of sperm development and mature sperm morphology in three species of commensal bivalves (Mollusca: Galeommatoidea). Journal of Morphology, 205 (1990) 63-75.
- Ferreira, A. A., Estrutura, ultra-estrutura e citoquímica da espermatogênese, dos ductos e ovidutos do lagarto *Tropidurus itambere* durante o ciclo reprodutivo, Doctoral Thesis, Unicamp, Brazil, 2003.
- Foighil, D. O., Fine structure of *Lasaea subviridis* and *Mysella tumida* sperm (Bivalvia, Galeommatacea). Zoomorphology. 105 (1985) 125-132.
- Franzén, A., Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics, Verh. Dtsch. Zool. Ges., (1977) 123-138.
- Franzén, A., Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. Gamete Res. 7 (1983) 199-214.

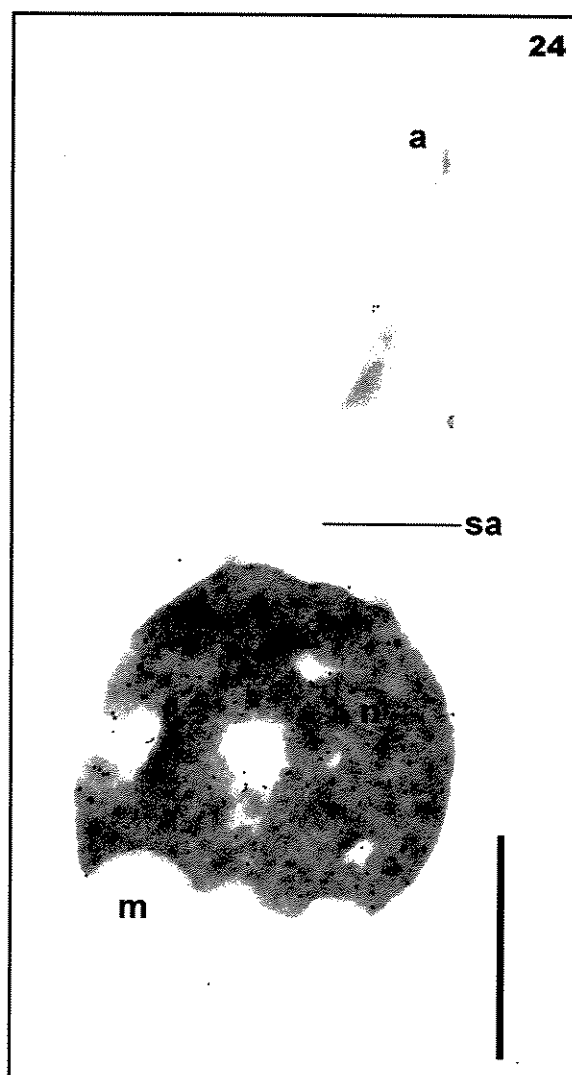
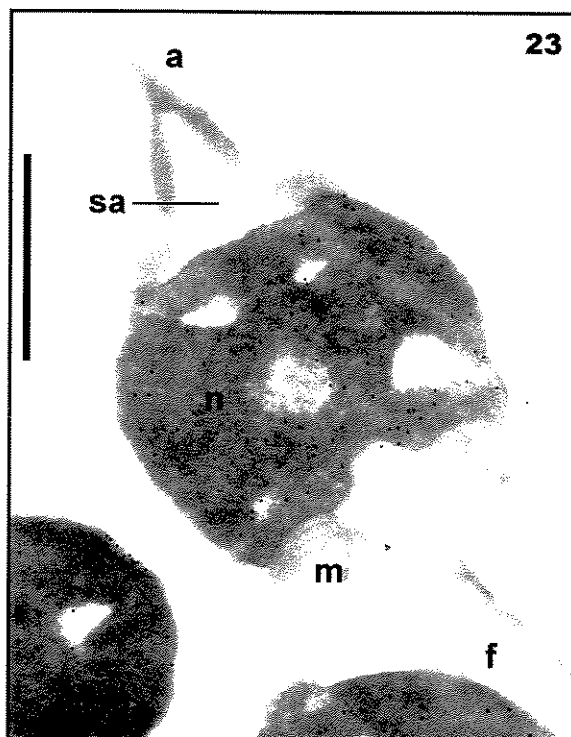
- Fricker, M., Hollinshead, M., White, N. and Vaux, D., Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope, *J. Cell Biol.*, 136 (1997) 531-544.
- Garrido, O. and Gallardo, C. S., Ultrastructure of sperms in bivalve molluscs of the Mytilidae family, *Invert. Reprod. Dev.* 29:2 (1996) 95-102.
- Guerra, R., Campos, B. and Esponda, P., Analysis of the spermatozoa of four bivalves with particular reference to the acrosome and plasma membrane glycoproteins, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 26 (1994) 489-495.
- Gwo, J. C., Chang, H. H. and Jong, K. J., Ultrastructure of the spermatozoa of the small abalone, *Sulculus diversicolor* supertexta (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae), *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 29 (1997) 239-244.
- Gwo, J. C., Yang, W. T., Sheu, Y. T. and Cheng, H. Y., Spermatozoan morphology of four species of bivalve (Heterodonta, Veneridae) from Taiwan, *Tissue and Cell*, 34 (2002) 39-43.
- Healy, J. M., Spermiogenesis and spermatozoa in the relict bivalve genus *Neotrigonia*: relevance to trigonioid relationships, particularly Unionoidea, *Mar. Biol.*, 103 (1989) 75-85.
- Healy, J. M., Sperm ultrastructure in the marine bivalve families Carditidae and Crassatellidae and its bearing on unification of the Crassatelloidea with the Carditoidea, *Zool. Scripta*, 24 (1995) 21-28.
- Healy, J. M., Buckland-Nicks, J.A. and Jamieson, B.G.M., Spermatozoal ultrastructure of spiny oysters (Spondylidae, Bivalvia) including a comparison with other bivalves, *Invert. Reprod. Dev.*, 40 (2001) 27-37.
- Ishikawa, M. and Numamiya, T. (eds), *Experiments on Development of Marine Invertebrates: Mollusca (Bivalvia)*. Baifuukan, Tokyo, (1988), pp. 87-96.
- Jamieson, B. G. M., A biological classification of sperm types, with special reference to annelids and mollusks, and an example of spermiocladistics. In: *New Horizons in Sperm Cell Research*, H. Mohri, ed., Japan Scientific Societies Press, Gordon and Breach Science, New York, (1987), pp. 311-332.

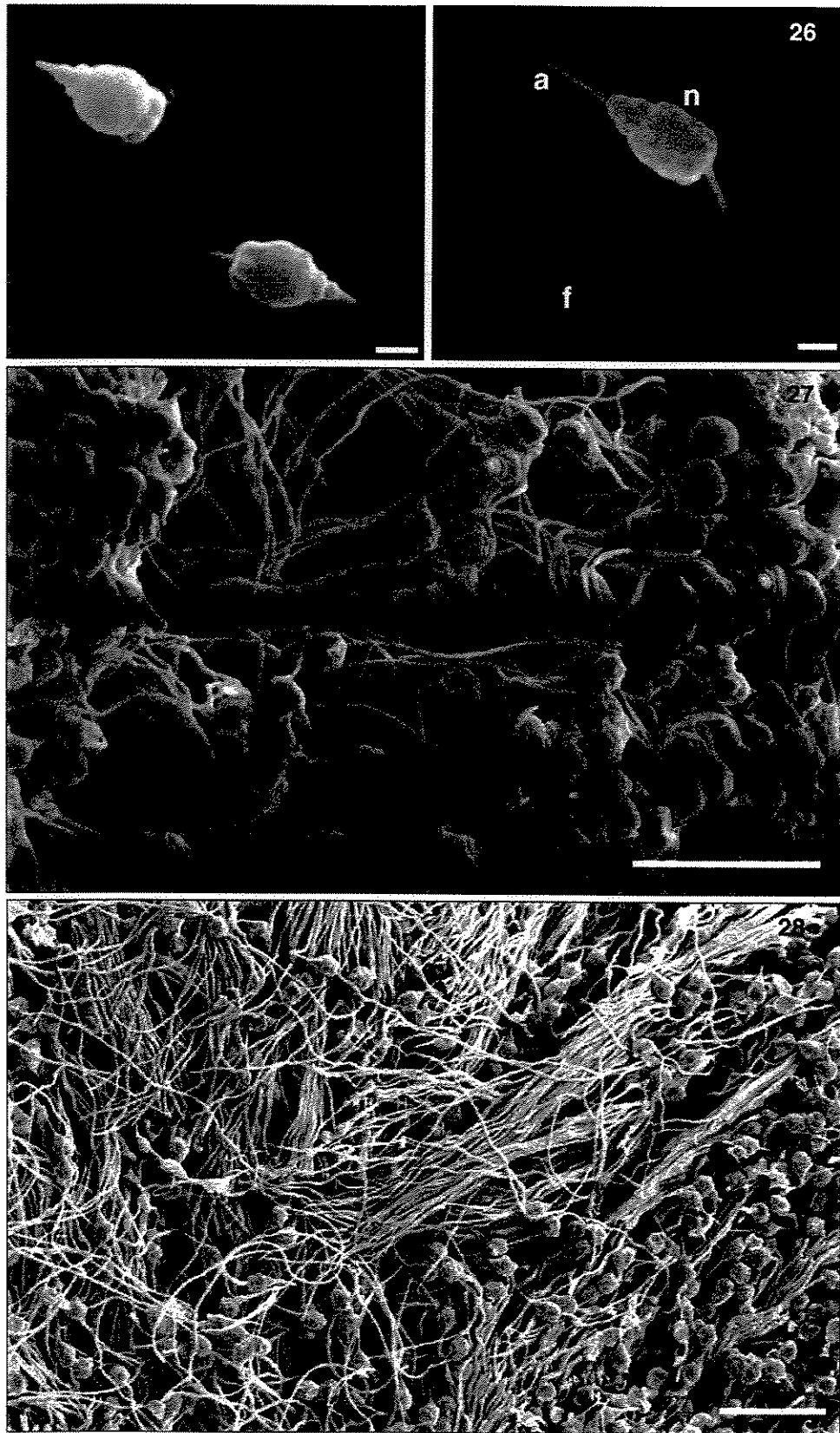
- Johnson, N., Krebs, M., Boudreau, R., Giorgi, G., Legros, M. and Larabell, C., Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation, *Differentiation*, 71 (2003) 414-424.
- Kafanov, A. I. and Drozdov, A. L., Comparative sperm morphology and phylogenetic classification of recent Mytiloidea (Bivalvia), *Malacologia*, 39 (1998) 129-139.
- Komaru, A. and Konishi, K., Ultrastructure of biflagellate spermatozoa in the freshwater clam, *Corbicula leana* (Prime), *Invert. Reprod. Dev.*, 29 (1996) 193-197.
- Nalesso, R. C.; Duarte, F. L. and Mendes E. G. Phenotypic Plasticity in *Brachidontes darwinianus* (Bivalvia, Mytilidae), *Rev. Brasil. Biol.*, 52 (1992) 245-249.
- Popham, J. D. Comparative morphometrics of the acrosomes of the sperms of "externally" and "internally" fertilizing sperms of the shipworms (Teredinidae, Bivalvia, Mollusca). *Cell Tissue Res.* 150 (1974) 291-297.
- Popham, J. D. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. *Malac. Rev.* 12 (1979) 1-20.
- Reunov, A. A. and Hodgson, A. N., Ultrastructure of the spermatozoa of five species of south african bivalves (Mollusca), and an examination of early spermatogenesis, *J. Morph.*, 219 (1994) 275-283.
- Rios, E. C. Seashells of Brazil. 2nd ed. Museu Oceanográfico da FURG, Rio Grande do Sul, (1995) cci + 328pp.
- Rouse, G. W. and Jamieson, B. G. M., An ultrastructural study of the spermatozoa of the polychaetes *Eurythoe complanata* (Amphinomidae), *Clymenella laseroni* and *Micromaldane laseroni* (Maldanidae) with definition of sperm types in relation to reproductive biology, *J. Submicrosc. Cytol.*, 19 (1987) 573-584.
- Seed, R., Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis*, *J. Mar. Biol. Ass. Un. King.*, 48 (1968) 561-584.
- Souza, M. and Oliveira, E., An ultrastructural study of *Crassostrea angulata* (Mollusca, Bivalvia) spermatogenesis, *Mar. Biol.*, 120 (1994) 545-551.

Tanaka, M. O. and Magalhães, C. A., Morphometric species recognition in *Brachidontes darwinianus* (Orbigny, 1846) e *Brachidontes solisianus* (Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae), The Veliger, 42 (1999) 267-274.









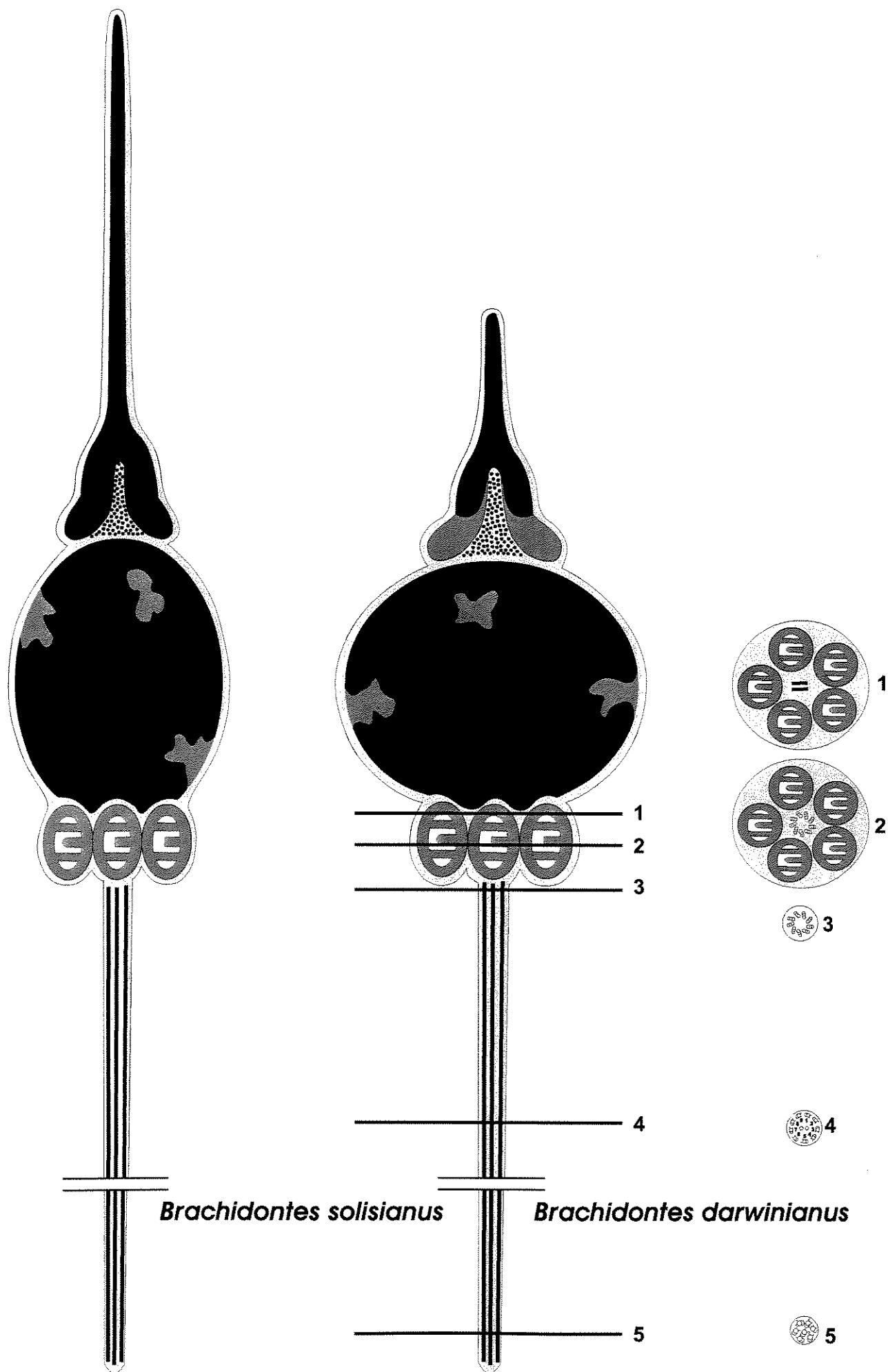


FIGURE CAPTIONS

Fig. 1-12. Spermatozoon of *Brachidontes darwinianus*. 1: light microscopy. 2: Acrosome, nucleus and midpiece. 3: Acrosomal complex and nuclear apex. 4: Phosphotungstic acid stains the base of the acrosomal vesicle, observe the invaginations. 5: Transversal section of the nucleus. 6: Longitudinal section of the midpiece. 7: Transversal section of the midpiece, showing the proximal centriole. 8: Five spherical mitochondria grouped in a ring around the distal centriole. 9: Longitudinal section of the flagellum. 10: Triplet structure of the centriole. 11: Transversal section of the axoneme. 12: Transversal section of the end of the tail. A⁻ = E-PTA does not stain this area, A⁺ = E-PTA stains this area, a = acrosome, dc = distal centriole, h = head, In = invagination, m = mitochondria, n = nucleus, pc = proximal centriole, sa = subacrosomal region. Bars = 1 μ m (Fig. 1 - 8), 0.5 μ m (Fig. 9), 0.25 μ m (Fig. 10 - 12).

Fig. 13-22. Spermatozoon of *Brachidontes solisianus*. 13: light microscopy. 14: Acrosome, nucleus and midpiece. 15: Acrosomal complex and nuclear apex. 16: Phosphotungstic acid stains the base of the acrosomal vesicle. 17: Longitudinal section of the midpiece. 18: Five spherical mitochondria grouped in a ring around the proximal centriole. 19: Longitudinal section of the flagellum. 20: Triplet structure of the centriole. 21: Transversal section of the axoneme. 22: Transversal section of the end of the tail. Bars = 1 μ m (Fig. 13 - 18), 0.5 μ m (Fig. 19), 0.25 μ m (Fig. 20 - 22).

Fig. 23-24. Longitudinal section of the spermatozoon head. 23: *B. darwinianus*. 24: *B. solisianus*. Observe immunogold labelling throughout the nucleus and its absence in the acrosome and in the subacrosomal cone. Bars = 1 μ m (Fig. 23 - 24).

Fig. 25-28. SEM. 25: SEM of *Brachidontes darwinianus* spermatozoa. 26: SEM of *Brachidontes solisianus* spermatozoon. 27. Freeze-fracture of the testis of *Brachidontes darwinianus*. 28: Freeze-fracture of the testis of *Brachidontes solisianus*. Bars = 1 μ m (Fig. 25 – 26), 10 μ m (Fig. 27 – 28).

Fig. 29. Schematic representation of the spermatozoa described in this study. Scale bar = 1 μm .

Artigo II

(A ser submetido à *Tissue and Cell*)

Sperm Morphology of *Isognomon bicolor* (Mollusca, Bivalvia, Isognomonidae)

¹Gisele Orlandi Introíni, ²Cláudia Alves de Magalhães and ¹Shirlei M. Recco-Pimentel

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-863 Campinas, SP, Brazil

²Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-863 Campinas, SP, Brazil

Key words: Bivalvia, Mytilidae, nuclear invagination, nuclear actin, spermatozoa, ultrastructure.

Send correspondence to: Shirlei M. Recco-Pimentel; shirlei@unicamp.br; Fax: +55-19-3788-6111.

ABSTRACT

The bivalve *Isognomon bicolor* is widely distributed throughout many countries in the Americas (from USA, Mexico and Caribbean islands to south region of Brazil). This species has an epifaunal existence and is usually found attached by its byssus to jetty pilings or growing in crevices on rocky shores exposed to strong water currents. Since sperm morphology has been used to obtain phylogenetic information for a variety of organisms, in this study, we used transmission and scanning electron microscopy to examine the structure of the mature sperm of *I. bicolor* and compared this with that of other bivalves. The spermatozoa of this species were of the primitive or ect-aquasperm type. The sperm head consisted of a round to oval, electron-dense nucleus (with an anterior fossa) capped by a small acrosome containing an outer electron-dense and an inner electron-lucent region. In the subacrosomal area, there was a thin filament that may have an important role in the fertilization. Immunocytochemical analysis revealed the presence of actin throughout the sperm nucleus. No actin was detected in the subacrosomal region. Hence, the chemical nature of the amorphous material and of the tenuous filament present in the subacrosomal area remains unknown. The middle-piece contained 4-5 spherical mitochondria surrounding the centriole apparatus. Deposits of electron-dense granules, interpreted here as perimitochondrial glycogen, were present around the centrioles and mitochondria. The flagellum had the typical 9+2 microtubular pattern. As mentioned previously, *I. bicolor* has a native range that includes most of the Brazilian seaboard. However, this species has recently invaded new areas of the Brazilian coast, thereby expanding its geographic distribution. Regular recruitment is

one of the factors responsible for the successful dominance of *I. bicolor* on some rocky shores. The presence of glycogen around the centrioles and mitochondria (with a significant number of sinusoidal cristae) presumably provides the spermatozoa with more energy (through ATP production) and could consequently increase the longevity of these cells in the environment. The presence of a relatively constant number of sexual cells in the seawater allows continuous recruitment by *I. bicolor*.

INTRODUCTION

Isognomon bicolor is a bivalve with a wide distribution throughout many countries in the Americas (Domaneschi and Martins 2002). This species has an epifaunal existence and is usually found attached by its byssus to jetty pilings or growing in crevices on rocky shores exposed to strong water currents. Isognomonids have a multivincular ligament, i.e., a hinge line subdivided into a series of inner ligament layers with intervening outer layers (Younge 1968). Despite its abundance, very little is known about the biology of *I. bicolor*.

The superfamily Pterioidea consists of four families (Isognomonidae, Malleidae, Pteriidae and Pulvinitidae) that are defined essentially by conchological features, especially shell shape and ligament structure. According to Tëmkin (2004), numerous reports on the anatomy of these bivalves have revealed several cases of adaptation-driven phenotypic convergence, and the suggestion that the multivincular ligament has evolved several times is strongly supported by morphological, molecular and ecological data. Hence, convergent evolution of the multivincular ligament has been invoked to explain some of the similarities among certain pterioidean species (Tëmkin 2004).

DNA sequence data, morphological characters, sperm morphology and natural products chemistry have provided the most valuable information when measured in terms of the robustness of the phylogeny. Comparative work on fine sperm morphology has generated data of taxonomic and phylogenetic significance, and several analyses have shown the usefulness of sperm morphology for evaluating molluscan phylogeny. In this report, we describe the ultrastructural morphology of *I. bicolor* sperm and compare the results with the corresponding data for other bivalves.

MATERIAL AND METHODS

Adult specimens of *I. bicolor* were collected from Ubatuba bay, on the coast of São Paulo state in southeastern Brazil. The bivalves were transported to the laboratory where they were maintained in seawater at 20°C.

Scanning Electron Microscopy

A drop of a sperm suspension was placed on a coverglass and prefixed with 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.5) at 4°C for 15 min, followed by postfixing with 1% OsO₄ for 10 min, before rinsing with cacodylate buffer. The material was dehydrated in a graded ethanol series, critical point dried, coated with gold, and observed with a JSM 5800 LV scanning electron microscope. Additionally, after dehydration, some testes were freeze-fractured in liquid nitrogen and then processed as described above.

Transmission Electron Microscopy

The tissues were prefixed as described above for 5 h. The testes were rinsed three times with cacodylate buffer and then post-fixed with 1% OsO₄ in the same buffer for 1 h. The tissues were subsequently dehydrated in a graded acetone series and embedded in EPON 812 resin. Ultrathin sections stained with aqueous uranyl acetate and lead citrate were examined with a Zeiss Leo 906 transmission electron microscope.

Ultrastructural Immunocytochemistry

The gonads were cut into fragments and fixed for 5 h at 4° C in the solution mentioned above (see Scanning Electron Microscopy). The testicular fragments were then washed in buffer, dehydrated in acetone, and embedded in LRWhite resin. Ultrathin sections were collected on nickel grids and pre-incubated in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 0.05% glycine and 1% bovine serum albumin (BSA) for 10 min at room temperature. After several rinses in the same buffer, non-specific binding was blocked with 0.05 M Tris-HCl containing 1% BSA and 0.05% Tween for 30 min followed by incubation for 1 h with an antibody against smooth muscle α -actin (monoclonal α -SMA, diluted 1:100; Novocastra Laboratories Ltd., England). After washing with 0.05 M Tris-HCl containing 0.5% BSA, the grids were incubated for 1 h

with a gold-labeled secondary antibody (rabbit anti-mouse-IgG-Au-conjugate, diluted 1:50; Sigma-Aldrich Co., MO, USA). After incubation, the grids were washed with 0.05 M Tris-HCl and distilled water and then analyzed without staining (Ferreira 2003).

RESULTS

Transmission and scanning electron microscopy showed that mature *I. bicolor* sperm was of the primitive or ect-aquasperm type (Figs. 1-3 and 15). The head consisted of a round nucleus capped by a short acrosomal vesicle (Figs. 4 and 5 and table I), and the acrosome showed two regions of different electron densities (Figs. 4 and 6). The subacrosomal area between the vesicular base and the apical region of the nucleus was filled with amorphous material (Figs. 4-6). In the central region of the subacrosomal space there was a tenuous, thin filament that was anchored to the base of the acrosome (Figs. 4 and 6). Immunocytochemical staining revealed no actin in the subacrosomal region, although actin was identified throughout the sperm nucleus (Figs. 13 and 14). The chromatin was strongly electron-dense, homogeneous and compact (Figs. 4-6), and the nuclei contained electron-lucent regions formed by invaginations of the nuclear envelope (Figs. 4 and 5). The midpiece consisted of a pair of orthogonally arranged centrioles (Fig. 7) surrounded by four or five equal-sized, spherical mitochondria (Figs. 10 and 11). In addition, deposits of dense granules characterized the neck region (Figs. 7-9). The axoneme followed the distal centriole and the flagellum showed the typical 9+2 microtubule structure (nine double outer tubules + two single central tubules) (Fig. 12).

Table 1. Morphometric data for some structures of *I. bicolor* sperm.

<i>Isognomon bicolor</i> (specimens)	Head length	Nuclear width	Acrosomal length + subacrosomal area
1	1.187	1.15	0.467
2	1.150	1.22	0.430
3	1.150	1.22	0.430
4	1.084	1.11	0.417
5	1.250	1.15	0.500
6	1.220	1.25	0.539
7	1.237	1.24	0.464
8	1.150	1.20	0.480
9	1.250	1.29	0.350
10	1.258	1.37	0.460
Mean	1.194	1.22	0.454

All measurements are in μm .

DISCUSSION

Most bivalve species produce primitive-type spermatozoa typical of animals that release their gametes into the surrounding water (Franzén 1977). This primitive type of sperm consists of a short, round or conical head, a midpiece containing 4-5 mitochondria and a simple flagellum with a 9+2 microtubular pattern. Sperm structure has been used very successfully for taxonomic investigations because most bivalves have a similar mode of reproduction (Reunov and Hodgson 1994).

The sperm of *I. bicolor* were of the primitive type, with fertilization of the eggs occurring in the surrounding water. The sperm head consisted of a round-to-oval, electron-dense nucleus (with an anterior fossa) capped by a small acrosome that contained an outer electron-dense and inner electro-lucent region. The subacrosomal area contained a thin filament that may have an important role in the fertilization.

Gwo et al. (1997) and Healy et al. (2001) proposed that the electron-lucent regions of the nucleus were lacunae. Invaginations of the nuclear envelope have been described in several cell types and their frequent occurrence suggests that the nuclear envelope is a dynamic, fluid structure (Fricker et al. 1997; Johnson et al. 2003), even in such highly differentiated cells as spermatozoa. The function of these nuclear invaginations remains unclear.

Johnson et al. (2003) suggested that nuclear actin was not filamentous because of their inability to visualize this actin with phalloidin. Indeed, these authors have shown that the diffuse actin in the nucleoplasm is monomeric. Immunocytochemical analysis revealed the presence of actin throughout the nucleus of *I. bicolor* sperm, but no actin was seen in the subacrosomal region. Hence, the chemical nature of the amorphous material and of the tenuous filament present in the subacrosomal area remains unknown.

The presence of a round-to-oval nucleus capped by a small acrosome has been described for other bivalves of the subclass Pteriomorphia, including some species of the genera *Anomia* (order Ostreoida, family Anomiidae), *Barbatia* (order Arcoida, family Arcidae), *Spondylus* and *Gloripallium* (order Ostreoida, family Spondilidae) (Healy, 1989; Reunov and Hodgson, 1994; Healy et al. 2001). Molecular studies have indicated that the order Pterioda is a sister group to Ostreoida, and both have significant relationships to Arcoida in terms of phylogeny (Giribet and Wheeler, 2002). This relatedness could explain some of the morphological similarities between the spermatozoa of *I. bicolor* (Pterioda) *Spondylus varius*, *S. nicobaricus* (Ostreoida), *Barbatia obliquata* and *B. foliata* (Arcoida).

The middle-piece contained four or five spherical mitochondria surrounding the centriole apparatus. Deposits of electron-dense granules, here interpreted as perimitochondrial glycogen, were observed around the centrioles and mitochondria. *Spondylus squamosus* (order Ostreoida, family Spondilidae) and *Brachidontes virgilae* (order Mytiloida, family Mytilidae) also have glycogen granules in the mid-piece. However, the arrangement of the glycogen deposits in *I. bicolor* sperm resembled to that of *B. virgilae*. In addition, both species have spermatozoa with a variable number of mitochondria. These two characteristics (presence of glycogen in the mid-piece and variation in the number of mitochondria) have not been reported very often in bivalves. The flagellum had the typical 9+2 microtubular pattern, a common feature of species that release their gametes into the surrounding water.

The lack of detailed information on the sperm morphology of the Isognomonidae precludes an extended discussion of our results. Healy (1989) provided a diagrammatic illustration of sperm from the genus *Isognomon* (with no

mention of the species name) that was similar to the description provided here for *I. bicolor*.

Further studies on the fertilization biology of *I. bicolor* are necessary to explain the biological significance of the thin axial rod in the subacrosomal space. Since this species has a wide geographical distribution and has recently been considered to be invasive on certain rocky shores along the Brazilian coast, it would be interesting to assess whether the morphological features of *I. bicolor* sperm increase the reproductive efficiency of this species. Regular recruitment is one of the factors responsible for the successful dominance of *I. bicolor* on some rocky shores. The presence of glycogen around the centrioles and mitochondria (with a significant number of sinusoidal cristae) presumably provides the spermatozoa with more energy (through ATP production) and could consequently increase the longevity of these cells in the environment. The presence of a relatively constant number of sexual cells in the seawater allows continuous recruitment by *I. bicolor*.

In addition, further analyses of the sperm morphology of other species of Isognomonidae are needed in order to adequately assess the occurrence of convergent evolution in anatomical features such as the multivincular ligament that is present in certain pterioidean species.

ACKNOWLEDGMENTS

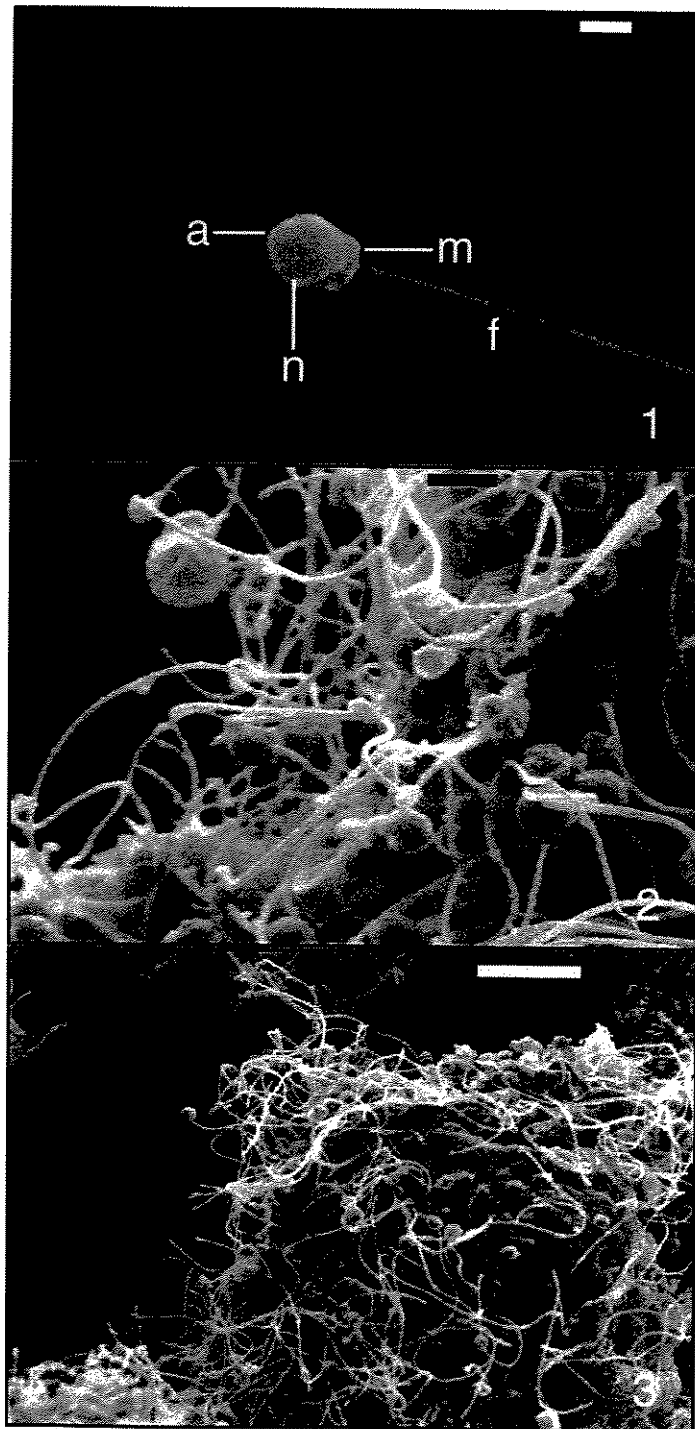
The authors thank Dr. Paulo Pinto Joazeiro (Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, UNICAMP) for providing the infrastructure for the immunocytochemical analyses, MSc Suzana Moraes (Department of Histology and Embryology, UNICAMP) for the schematic illustrations of the sperm and Dr. Stephen

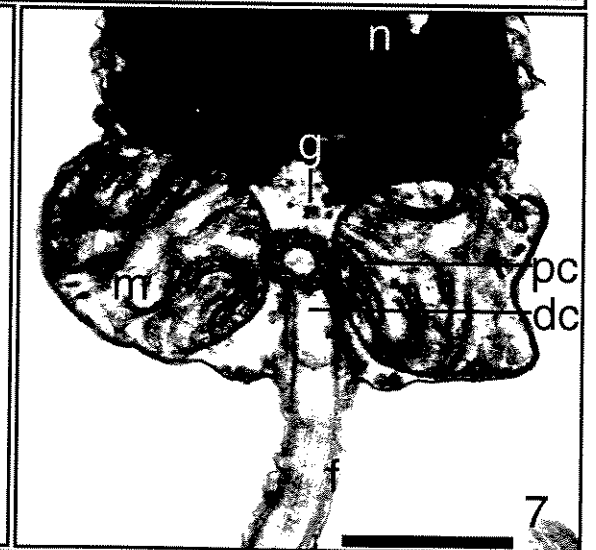
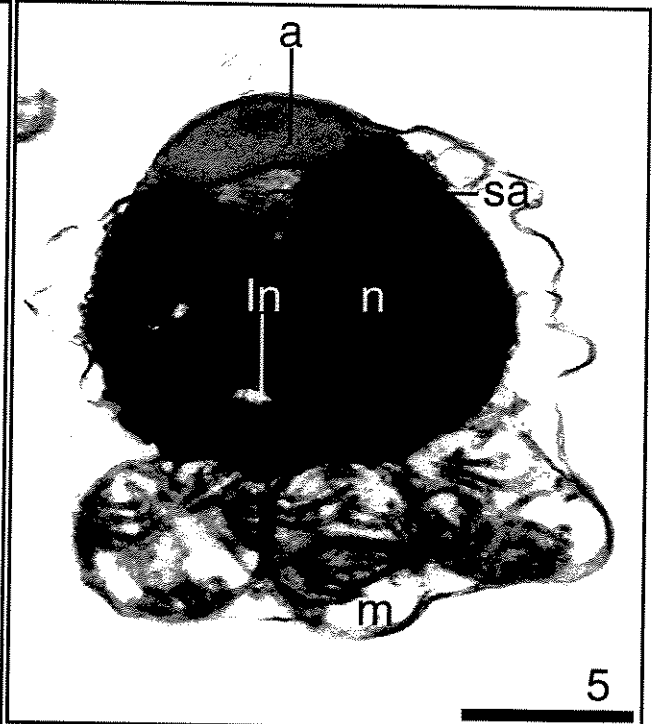
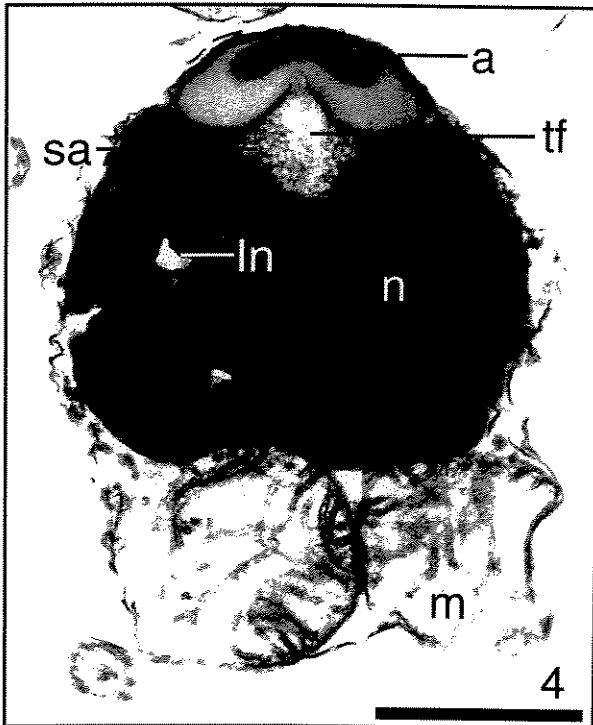
Hyslop (Department of Pharmacology, UNICAMP) for reviewing the English of the manuscript. This work was supported by CNPq, CAPES and FAEPEX/UNICAMP.

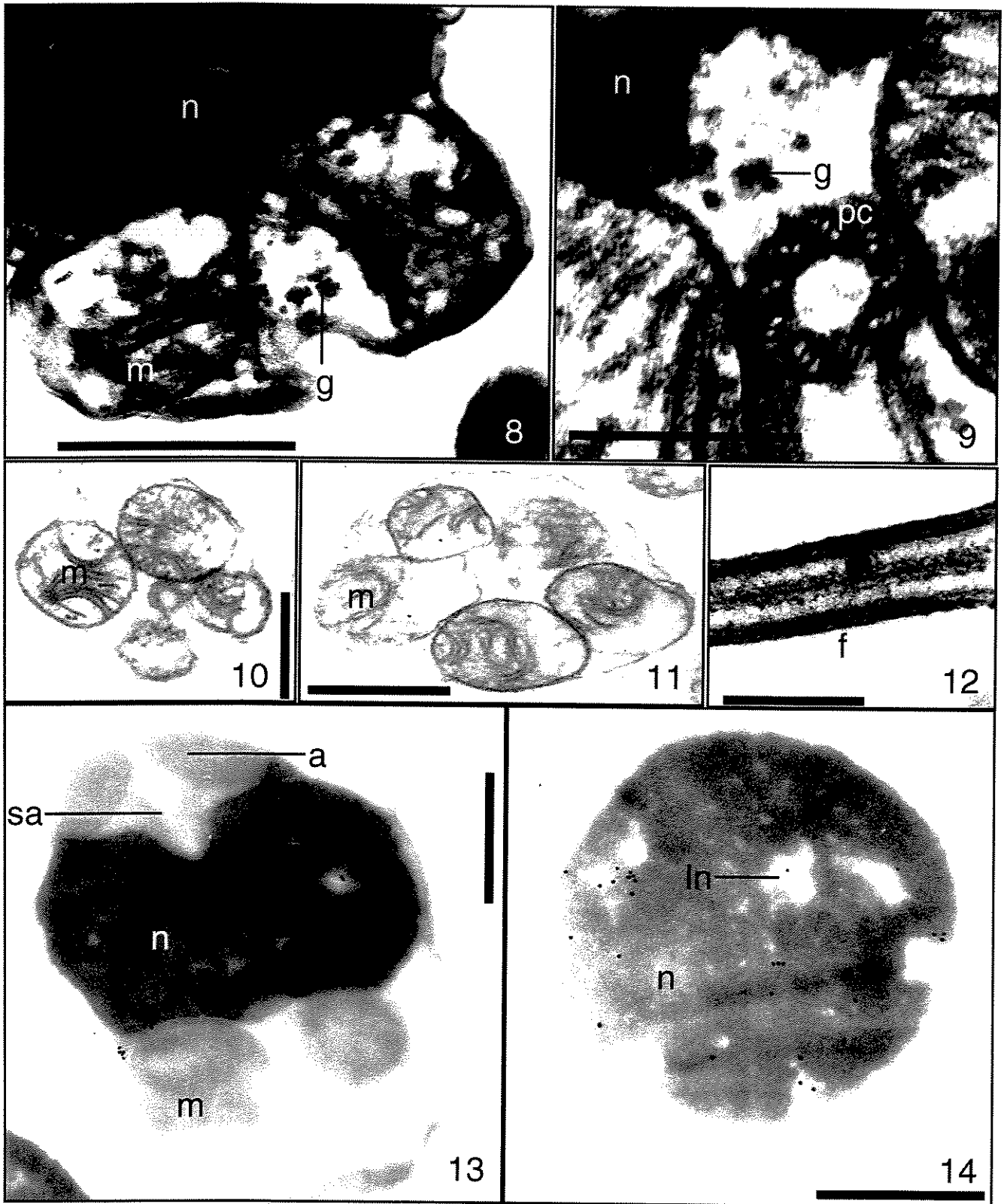
REFERENCES

- Domaneschi, O. and Martins, C.M. *Isognomon bicolor* (C.B. Adams) (Bivalvia, Isognomonidae): primeiro registro para o Brasil, redescricao da espécie e considerações sobre a ocorrência e distribuicao de *Isognomon* na costa brasileira. Rev. Bras. Zool., 19 (2002) 611-627.
- Ferreira, A.A. Estrutura, ultra-estrutura e citoquímica da espermatogênese, dos dutos e ovidutos do lagarto *Tropidurus itambere* durante o ciclo reprodutivo. Doctoral thesis, UNICAMP, Brazil, 2003.
- Franzén, A. Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics. Verh. Dtsch. Zool. Ges., (1977) 123-138.
- Fricker, M.; Hollinshead, M.; White, N. and Vaux, D. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. J. Cell Biol., 136 (1997) 531-544.
- Giribet, G. and Wheller, W. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. Invert. Biol., 121 (2002) 271-324.
- Gwo, J.C.; Chang, H.H. and Jong, K.J. Ultrastructure of the spermatozoa of the small abalone, *Sulculus diversicolor supertexta* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae). J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 29 (1997) 239-244.
- Healy, J.M. Spermiogenesis and spermatozoa in the relict bivalve genus *Neotrigonia*: relevance to trigonioid relationships, particularly Unionoidea. Mar. Biol., 103 (1989) 75-85.
- Healy, J.M.; Buckland-Nicks, J.A. and Jamieson, B.G.M. Spermatozoal ultrastructure of spiny oysters (Spondylidae, Bivalvia) including a comparison with other bivalves. Invert. Reprod. Dev., 40 (2001) 27-37.
- Johnson, N.; Krebs, M.; Boudreau, R.; Giorgi, G.; Legros, M. and Larabell, C. Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. Differentiation, 71 (2003) 414-424.

- Reunov, A.A. and Hodgson, A.N. Ultrastructure of the spermatozoa of five species of south African bivalves (Mollusca), and an examination of early spermatogenesis. *J. Morphol.*, 219 (1994) 275-283.
- Tëmkin, I. A new system for Pterioidea (Mollusca: Bivalvia). *In* Molluscan Megadiversity: Sea, Land and Freshwater: World Congress of Malacology, Perth, Western Australia. 11-16 July 2004, pp. 145.
- Younge, C.M. Form and habit in species of *Malleus* (including the "hammer oysters") with comparative observations on *Isognomon isognomon*. *Biol. Bull.*, 135 (1968) 378-405.







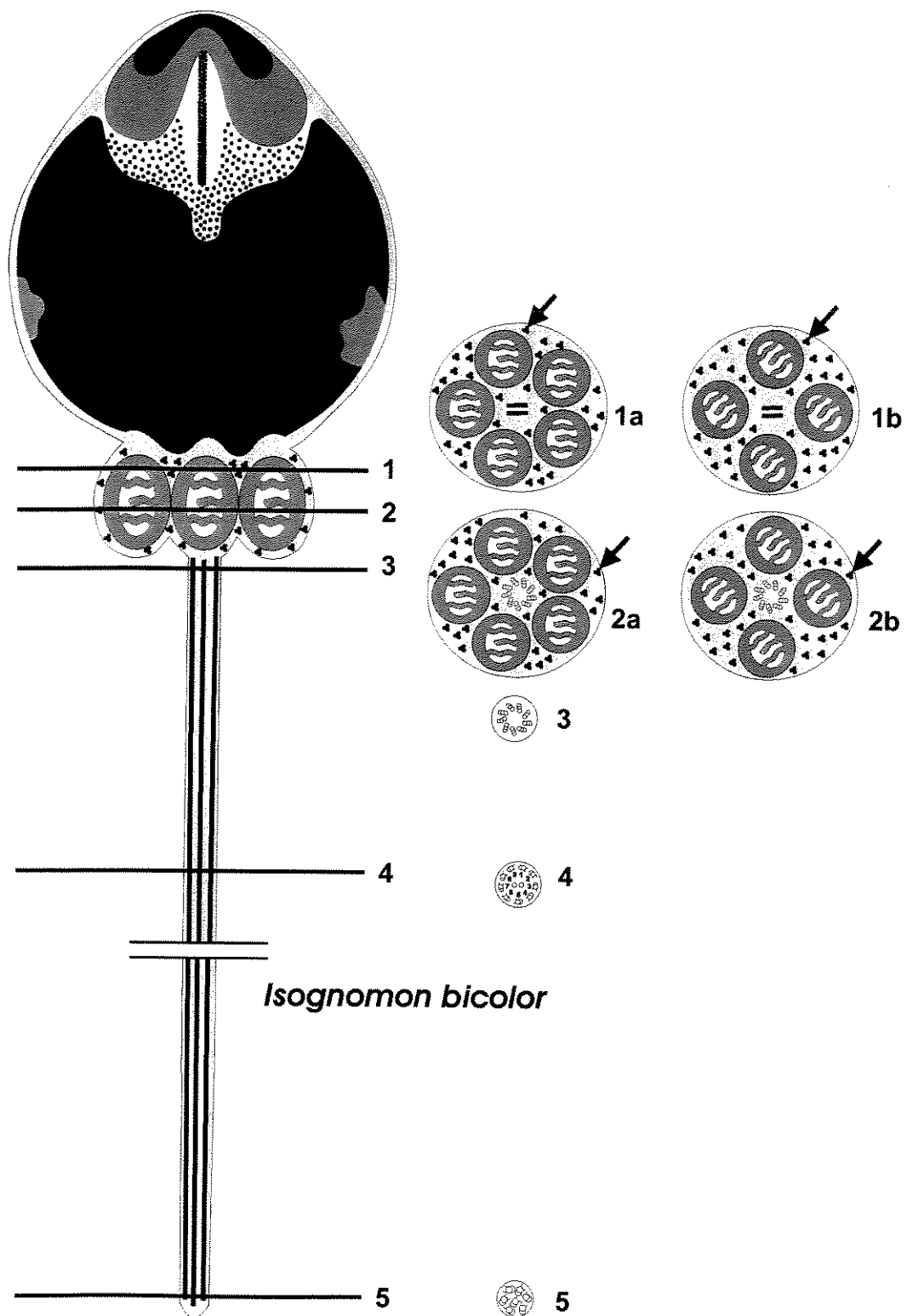


FIGURE CAPTIONS

Figs. 1-3. Sperm of *I. bicolor* (scanning electron microscopy). **1.** Suspension of *I. bicolor* spermatozoon. **2-3.** Freeze-fracture of *I. bicolor* testis. Bars = 1 μm (Fig. 1), 2 μm (Fig. 2) and 10 μm (Fig. 3).

Figs. 4-7. Sperm of *I. bicolor* (transmission electron microscopy). **4.** Acrosome, nucleus and midpiece with two mitochondria. **5.** Acrosome, nucleus and midpiece with three mitochondria. **6.** Acrosomal complex and nuclear apex, showing the thin filament. **7.** Longitudinal section of the midpiece, showing the centrioles. Bars = 0.5 μm in all cases.

Figs. 8-14. Sperm of *I. bicolor* (transmission electron microscopy and ultrastructural immunocytochemistry). **8.** Midpiece showing dense granules. **9.** Structure of the proximal centriole and of the dense granules. **10.** Midpiece with four mitochondria. **11.** Midpiece with five mitochondria. **12.** Flagellum. **13.** Longitudinal section of the spermatozoon head. Note the immunogold labeling throughout the nucleus and its absence in the acrosome and in the subacrosomal cone. **14.** Transversal section of the spermatozoon head with immunogold staining. Bars = 0.5 μm (Figs. 8, 10, 11, 13 and 14) and 0.25 μm (Figs. 9 and 12).

Fig. 15. Diagrammatic representation of the sperm described in this study. The arrow indicates the dense granules. a = acrosome, dc = distal centriole, f = flagellum, g = granule, h = head, In = invagination, m = mitochondrion, n = nucleus, pc = proximal centriole, sa = subacrosomal region, and tf = thin filament. Bar = 1 μm .

Artigo III

SHORT COMUNICATION

(a ser submetida à *Genet. Mol. Biol.*)

Chromosomal number of two Brazilian species of bivalves: *Brachidontes darwinianus* and *Isognomon bicolor*

¹Gisele Orlandi Introíni, ²Cláudia Alves de Magalhães and ¹Shirlei M. Recco-Pimentel

¹Departamento de Biologia Celular and ²Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-863 Campinas, SP, Brazil.

Key words: *Brachidontes*, bivalves, chromosome, *Isognomon*.

Address for reprint requests and corresponding author:

Shirlei Maria Recco-Pimentel, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-863 Campinas, SP, Brazil. E-mail: shirlei@unicamp.br

ABSTRACT

Although bivalves have been extensively studied anatomically, there is considerable controversy surrounding the taxonomic relationships of various species within this class. Karyotypic analysis can be useful for solving taxonomic difficulties. In this work, we investigated the Giemsa-stained karyotypes of the intertidal bivalve species *Brachidontes darwinianus* and *Isognomon bicolor* from the southeastern Brazilian coast and compared them with the karyotypes of other bivalves. All of the *B. darwinianus* samples had a diploid number of $2n=30$ chromosomes whereas *I. bicolor* had a diploid number of $2n=28$. These chromosomal numbers are common among closely related species of *Brachidontes* and *Isognomon*.

INTRODUCTION

Bivalves (adult phase) are benthic animals with a sessil mode of life in which feeding is accomplished by filtering the water or sifting the sediment for particulate organic material. These adaptations have limited the evolutionary potential of these animals, and most structural alterations have involved modifications on rather simple themes (Newell 1965). There is currently considerable interest in the ecology, evolution and systematics of bivalves, especially of intertidal species. Although bivalves have been extensively studied anatomically, there is considerable controversy surrounding the taxonomic relationships of various species within this class. Comparative morphological analyses of living bivalves have resulted in several classification schemes (Giribet and Wheeler 2002). In view of the uncertain taxonomic positions of many species, an analysis of various characters should provide more reliable species descriptions and phylogenetic estimates.

Mussels of the genus *Brachidontes* are small (average length = 2 cm) and have sculptured shells with crenulated margins and short ligaments (Tanaka and Magalhães 1999). *Brachidontes darwinianus* is a common species in estuaries and occurs attached to rocks in the intertidal zone of rocky shores from the state of Rio de Janeiro in Brazil, to Patagonia in Argentina (Rios 1995), although Blanco (1966) stated that this species was found from the state of Bahia (Todos os Santos bay), Brazil, to the mouth of the Río de la Plata, Argentina. *Brachidontes darwinianus* shows marked phenotypic plasticity, with considerable variation in shell shape, depending on where the specimens are collected. The presence of radial ribs mentioned by Klappenbach (1965) as a particular characteristic of *B. darwinianus* is not always observed and apparently depends on the environmental conditions where the bivalves occur (Nalesso et al. 1992). These authors also noted that *B. darwinianus* specimens found at low salinities have an intact periostracum, several radial ribs and higher shells than specimens found at higher salinities; the latter have an eroded periostracum, no radial ribs and a longer shell. In addition to the plasticity in external shell morphology, *B. darwinianus* can also adapt to variations in salinity, indicating that this species has marked phenotypic flexibility. This plasticity makes

shell morphology a questionable criterion for taxonomic studies (Nalesso et al. 1992; Tanaka and Magalhães 1999).

Isognomon bicolor, a bivalve with a wide geographic distribution throughout many countries in the Americas (Domaneschi and Martins 2002), is commonly found attached by its byssus to jetty pilings or growing in crevices on rocky shores, often in areas with strong water currents. Although most isognomonids found in Brazil have been classified as *I. alatus* and *I. radiatus*, Domaneschi and Martins (2002) stated that all of these samples effectively belong to *I. bicolor*. Indeed, the occurrence of *I. alatus* and *I. radiatus* has not been confirmed in this country.

Since taxonomic classifications based on single character systems have been criticized (Newell 1965; Giribet and Wheeler 2002), there is a need to compile conchological, anatomical and molecular evidence, as well as information on chromosomal characters and sperm morphology, in order to provide a more accurate description of bivalve species. The analysis of chromosomal numbers has been used to complement other methods of identifying species (Gosling 1992). The aim of this work was to examine and describe the Giemsa-stained karyotype of the intertidal bivalves *B. darwinianus* and *I. bicolor* and to compare the findings with corresponding data for other bivalve species.

MATERIAL AND METHODS

Specimens of *B. darwinianus* and *I. bicolor* were collected from populations in Ubatuba bay, on the coast of São Paulo state in southeastern Brazil. The bivalves were maintained in the laboratory in aerated seawater at 20°C for two weeks and were fed on a suspension of algal cells (*Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*) to increase the number of mitotic divisions.

Chromosomal preparation and staining

Following treatment with colchicine (0.005%) for 10 h, the bivalves were briefly rinsed in clean seawater and the gills were removed. The tissue was immersed in 0.8% sodium citrate solution for 50 min and fixed in Carnoy's solution for 1 h at

chromosomes were prepared by dissociating the gill tissue in 30% acetic acid, mounted on pre-warmed (43°C) slides followed by staining with 10% Giemsa solution (pH 6.8).

of the *B. darwinianus* specimens had a diploid number of $2n=30$ chromosomes. The karyotype consisted of two pairs of metacentric chromosomes, two pairs of subtelocentric chromosomes and 11 pairs of telocentric chromosomes. A diploid number of $2n=28$ was observed for five individuals of *I. bicolor*.

DISCUSSION

Brachidontes darwinianus

Extensive cytogenetic studies of the Mytilidae have allowed accurate taxonomic comparisons among the species in this family (Thiriot-Quiévreux 2002). The diploid chromosome number of $2n=30$ found in *B. darwinianus* has been reported in only six other bivalve (mytilid) species so far, namely, *Musculista senhousia* (Ieyama 1977), *Brachidontes recurvus* (Diupotex-Chong 1978), *Hormomya nutabilis* (Ieyama et al. 1994), *Limnoperna fortunei* (Ieyama 1996), *Perna canaliculus* (Libertini et al. 1996), and *Choromytilus chorus* (Palma-Rojas et al. 1997). Only four species of the genus *Brachidontes* have been studied to date: *B. recurvus* ($2n=30$; Thiriot-Quiévreux 2002) and *Brachidontes rodriguezi* ($2n=32$; Torreiro et al. 1999). The karyotype of *B. darwinianus* is unusual for bivalves because it contains only two pairs of metacentric chromosomes, with the other 13 pairs being subtelocentrics or telocentrics. The occurrence of species with subtelocentric and telocentric chromosomes is uncommon in the Mytilidae (Torreiro et al. 1999; Thiriot-Quiévreux 2002). Overall, *B. darwinianus* showed the same chromosomal number as *B. recurvus* and had a chromosomal morphology similar to that of *B. rodriguezi*, i.e. only

two metacentric pairs and a predominance of subtelocentric and telocentric chromosomes.

Isognomon bicolor

Squashed and air-dried preparations have been used to study chromosomes of the genera *Isognomon* and *Pinctada*, although the chromosomal number has been determined for only a few species of Pteriacea (Wada 1978; Rodríguez et al. 1983). Despite its abundance, very little is known about *I. bicolor*. The chromosomal number of $2n=28$ observed here for this species coincided with those of *I. alatus*, *Pinctada fucata* and *P. imbricata* (superfamily Pteriacea). These results provide an additional example of a tendency towards a stable chromosomal number in the Isognomonidae and Pteridae, and in the superfamily Pteriacea.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff of the Banco de Microorganismos Marinhos, Instituto Oceanográfico, USP, for providing the microalgal (*Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*) suspensions used to feed the bivalves. The authors thank MSc Alberto da Silva Moraes and MSc Flávia de Paoli (Department of Cell Biology, UNICAMP) for collecting live specimens of bivalves. This work was supported by CNPq, CAPES and FAEPEX/UNICAMP.

REFERENCES

- Blanco, V.C.K. A revision of *Brachidontes* (Mollusca: Bivalvia), Doctoral thesis, Harvard University, Cambridge, MA, 1966.
- Diupotex-Chong, M.E.; Rodríguez-Romero, F.; Uribe-Alcocer, M. and Laguarda-Figueras, A. Karyotypic characters of *Brachidontes recurvus* Rafinesque 1820 (Pelecypoda: Mytilidae). *Annales del Centro de Ciencias del Mar y Limnologia* (Universidad Nacional Autónoma de México), 5 (1978) 55-58.

- Domaneschi, O. and Martins, C.M. *Isognomon bicolor* (C.B. Adams) (Bivalvia, Isognomonidae): primeiro registro para o Brasil, redescricao da espécie e considerações sobre a ocorrência e distribuicao de *Isognomon* na costa brasileira. Rev. Bras. Zool., 19 (2002) 611-627.
- Giribet, G. and Wheeler, J. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. Invert. Biol., 121 (2002) 271-324.
- Gosling, E. The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. 1st ed. Elsevier, Amsterdam, 1992.
- Ieyama, H. Studies on the chromosomes of two species in Mytilidae (Pteriomorpha, Bivalvia). Venus, Jap. J. Malac., 36 (1977) 25-28.
- Ieyama, H. Chromosomes and nuclear DNA contents of *Limnoperna* in Japan (Bivalvia: Mytilidae). Venus, Jap. J. Malac., 55 (1996) 65-68.
- Ieyama, H.; Kameoka, O.; Tan, T. and Yamasaki, J. Chromosomes and nuclear DNA contents of some species in Mytilidae. Venus, Jap. J. Malac., 53 (1994) 327-331.
- Klappenbach, M.A. Lista preliminar de los Mytilidae brasileiros con claves para su determinación y notas sobre su distribuicion. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 37 (1965) 327-352.
- Libertini, A.; Boata, A.; Panozzo, M. and Fogato, V. Karyotype and genome size in some species of Mytilidae (Bivalvia, Mollusca). La Kromosomo II, 82 (1996) 2819-2827.
- Nalesso, R.C.; Duarte, L.F. and Mendes, E.G. Phenotypic plasticity in *Brachidontes darwinianus* (Bivalvia: Mytilidae). Rev. Bras. Biol. 52 (1992) 245-249.
- Newell, N. D. Classification of the Bivalvia. Am. Museum Novitates, 2206 (1965) 1-25.
- Palma-Rojas, C.; Guerra, R.; Brown, D. and Von Brand, E. Quantitative karyotype of *Choromytilus chorus* (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae). The Veliger, 40 (1997) 259-262.
- Rios, E.C. Seashells of Brazil. 2nd ed. Museu Oceanográfico da FURG, Rio Grande do Sul, (1995) cci + 328pp.
- Rodríguez, F.; Laguarda, A. and García-Cubas, A. The karyotype of *Isognomon alatus*. Can. J. Genet. Cytol., 25 (1983) 85-87.

- Tanaka, M.O. and Magalhães, C.A. Morphometric species recognition in *Brachidontes darwinianus* (Orbigny, 1846) and *Brachidontes solisianus* (Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). *The Veliger*, 42 (1999) 267-274.
- Thiriot-Quiévreux, C. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. *Cah. Biol. Mar.*, 43 (2002) 17-26.
- Torreiro, A.; Martínez-Expósito, M.J.; Trucco, M.I. and Pasantes, J.J. Cytogenetics in *Brachidontes rodriguezi* d'Orb (Bivalvia, Mytilidae). *Chrom. Res.*, 7 (1999) 49-55.
- Vitturi, R.; Gianguzza, P; Colomba, M.S. and Riggio, S. Cytogenetic characterization of *Brachidontes pharaonis* (Fisher P., 1870): karyotype, banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Ophelia*, 52 (2000) 213-220.
- Wada, K. Chromosome karyotypes of three bivalves: the oysters, *Isognomon alatus* and *Pinctada imbrincada*, and the bay scallop, *Argopecten irradians irradians*. *Biol. Bull.* 155 (1978) 235-245.

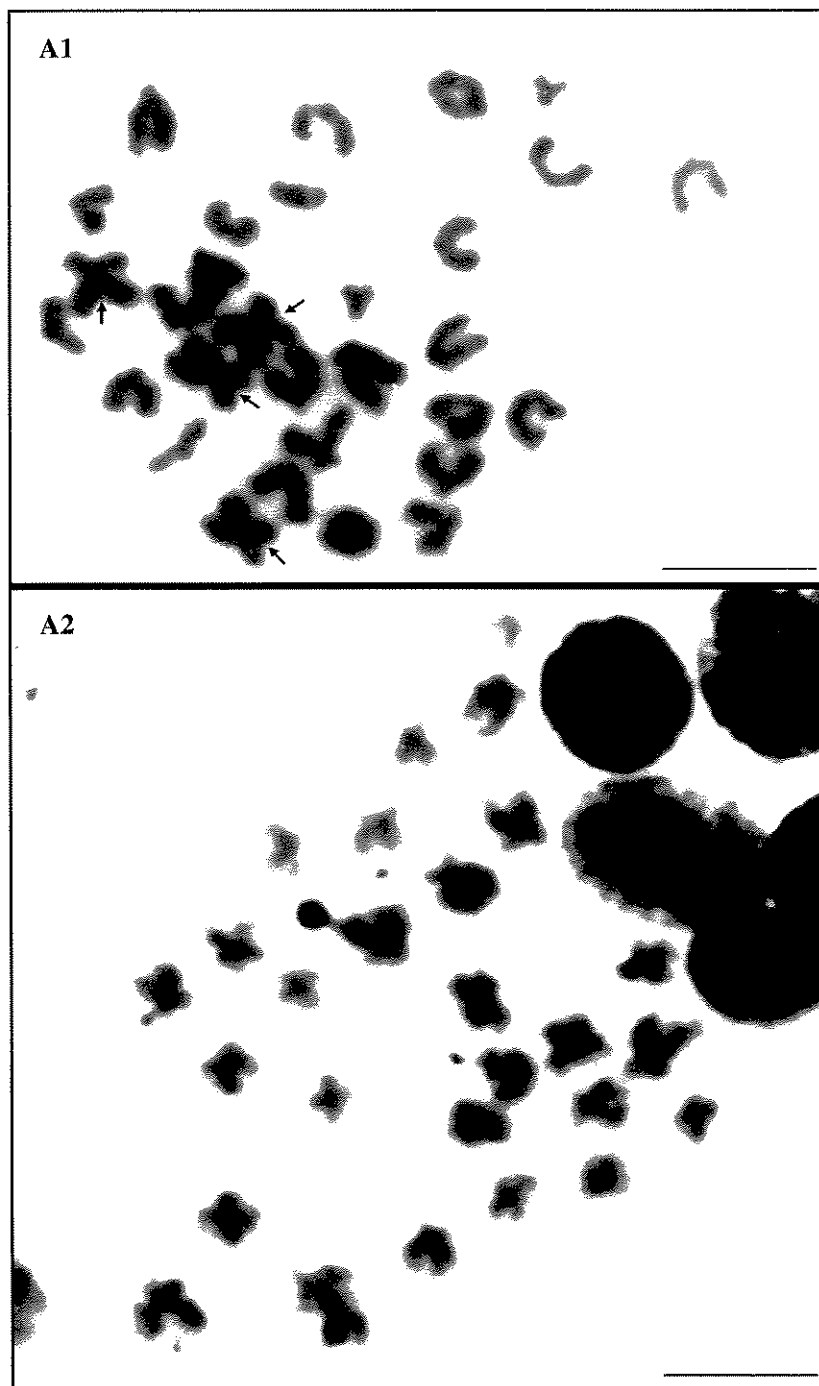


FIGURE CAPTIONS

Fig. A1: Mitotic metaphase of *B. darwinianus*. The arrows indicate the metacentric chromosomes. **Fig. A2:** Mitotic metaphase of *I. bicolor*. Giemsa staining. Scale bar = 5 μm .

Conclusões Gerais

O presente trabalho demonstrou a importância da morfologia de espermatozóides para estudos taxonômicos de bivalves. As espécies *Brachidontes darwinianus* e *B. solisianus* são muito semelhantes conquiologicamente e vivem em simpatria em muitas áreas do sudeste brasileiro. A plasticidade fenotípica das conchas de mitilídeos é significativa; portanto, diferenciar espécies, que exibem morfologias similares, adotando unicamente o estudo dos caracteres externos dos exemplares, pode conduzir a equívocos de identificação. Deste modo, a análise da ultraestrutura de espermatozóide contribuiu com mais uma relevante característica taxonômica para distinguir as espécies acima mencionadas.

Adicionalmente, os resultados obtidos no presente trabalho corresponderam à base para inferências sobre a biologia reprodutiva das espécies estudadas do gênero *Brachidontes*. A presença de uma vesícula acrossomal em *Brachidontes solisianus* com uma significativa extensão anterior poderia facilitar a penetração na ampla camada gelatinosa que envolve o ovócito, representando uma maior eficiência reprodutiva e contribuindo para a maior distribuição geográfica exibida por esta espécie.

Em uma retrospectiva histórica, as espécies da família Isognomonidae têm sido pouco estudadas, desencadeando erros de identificação e classificação. Exemplares da espécie *Isognomon bicolor* foram sistematicamente e durante anos equivocadamente identificados como *Isognomon alatus*. Nesta tese, investigações minuciosas da ultra-estrutura deste isognomonídeo forneceram caracteres taxonômicos valiosos que podem ser utilizados para a descrição desta espécie e comparação com outros bivalves da subclasse Pteriomorphia.

O estudo da morfologia e do número de cromossomos tem correspondido a uma eficiente ferramenta para a identificação de espécies. É importante mencionar que a dificuldade de obtenção de metáfases a partir de tecidos de bivalves é inegável. Neste trabalho houve a descrição pela primeira vez do

número cromossômico das espécies *Isognomon bicolor* e *Brachidontes darwinianus*. Os caracteres cromossômicos foram comparados com os de outros bivalves e concluiu-se que ambas espécies estão adequadamente inseridas na classificação atual.

É quase desnecessário enfatizar o fato de que o conhecimento descritivo para a Sistemática é fundamental para qualquer inferência e é a única base de dados para recuperar a informação histórica dos grupos. Nesta tese, nada mais há do que descrições de um diminuto fragmento do espetacular mosaico biológico existente nas águas que circundam o Brasil.

Referências Bibliográficas

- Amorim, D.S. Fundamentos de sistemática filogenética. Editora Holos: Ribeirão Preto, p. 16, 2001.
- Bernard, R.T.F. and Hodgson, A.N. The fine structure of the sperm and spermatid differentiation in the brown mussel *Perna perna*. South Afr. J. Zool., 20 (1985) 5-9.
- Bernard, R.T.F.; Davies, B.R. and Hodgson, A.N. Reproduction in a brackish-water mytilid: gametogenesis and embryonic development. The Veliger, 30 (1988) 278-290.
- Brown, R.A.; Seed, R. and O'Connor, R.J. A comparison of relative growth in *Cerastoderma eduli*, *Modiolus modiolus* and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia). J. Zool., 179 (1976) 297-315.
- Cornet, M. A short-term culture method for chromosome preparation from somatic tissues of adult mussel (*Mytilus edulis*). Experientia, 49 (1993) 87-90.
- Cornet, M. A study of some factors affecting the efficiency of *in vitro* mussel tissue culture for chromosome preparation. Cytobios, 84 (1995) 7-12.
- Dixon, D.R. and Wilson, J.T. Genetics and marine pollution. Hydrobiologia 420 (2000) 29-43.
- Domaneschi, O. and Martins, C.M. *Isognomon bicolor* (C.B. Adams) (Bivalvia, Isognomonidae): primeiro registro para o Brasil, redescritção da espécie e considerações sobre a ocorrência e distribuição de *Isognomon* na costa brasileira. Rev. Bras. Zool., 19 (2002) 611-627.

- Eckelbarger, K.J.; Bieler, R. and Mikkelsen, P.M. Ultrastructure of sperm development and mature sperm morphology in three species of commensal bivalves (Mollusca: Galeommatoidea). *Journal of Morphology*, 205 (1990) 63-75.
- Foighil, D.O. Fine structure of *Lasaea subviridis* and *Mysella tumida* sperm (Bivalvia, Galeommatacea). *Zoomorphology*, 105 (1985) 125-132.
- Fong, P.P. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biol. Bull.*, 194 (1998) 143-149.
- Franzén, A. Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, (1977) 123-138.
- Franzén, A. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. *Gamete Res.* 7 (1983) 199-214.
- Garrido, O. and Gallardo, C.S. Ultrastructure of sperms in bivalve molluscs of the Mytilidae family. *Invert. Reprod. Dev.* 29 (1996) 95-102.
- Giribet, G. and Wheeler, J. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invert. Biol.*, 121 (2002) 271-324.
- Gosling, E. The mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. 1st ed. Elsevier, Amsterdam, 1992.
- Guerra, R.; Campos, B. and Esponda, P. Analysis of the spermatozoa of four bivalves with particular reference to the acrosome and plasma membrane glycoproteins. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 26 (1994) 489-495.

- Gwo, J.C.; Yang, W.T.; Sheu, Y.T. and Cheng, H.Y. Spermatozoan morphology of four species of bivalve (Heterodonta, Veneridae) from Taiwan, *Tissue and Cell*, 34 (2002) 39-43.
- Healy, J.M. Spermiogenesis and spermatozoa in the relict bivalve genus *Neotrigonia*: relevance to trigonioid relationships, particularly Unionoidea. *Mar. Biol.*, 103 (1989) 75-85.
- Healy, J.M. Sperm ultrastructure in the marine bivalve families Carditidae and Crassatellidae and its bearing on unification of the Crassatelloidea with the Carditoidea. *Zool. Scripta*, 24 (1995) 21-28.
- Holand, B.S.; Gallagher, D.S.; Hicks, D.W. and Davis, S.K. Cytotaxonomic verification of a non-indigenous marine mussel in the gulf of Mexico. *The Veliger*, 42 (1999) 280-282.
- Ieyama, H.; Kameoka, O.; Tan, T. and Yamasaki, J. Chromosomes and nuclear DNA contents of some species in Mytilidae. *Venus, Jap. Jour. Malac.*, 53 (1994) 327-331.
- Ieyama, H. Chromosomes and nuclear DNA contents of *Limnoperna* in Japan (Bivalvia: Mytilidae). *Venus, Jap. Jour. Malac.*, 55 (1996) 65-68.
- Ishikawa, M. and Numamiya, T. (eds), *Experiments on Development of Marine Invertebrates: Mollusca (Bivalvia)*. Baifuukan, Tokyo, (1988) 87-96.
- Kafanov, A.I. and Drozdov, A.L. Comparative sperm morphology and phylogenetic classification of recent Mytiloidea (Bivalvia). *Malacologia*, 39 (1998) 129-139.

- Klappenbach, M.A. Lista preliminar de los Mytilidae brasileños con claves para su determinación y notas sobre su distribución. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 37 (1965) 327-352.
- Komaru, A. and Konishi, K. Ultrastructure of biflagellate spermatozoa in the freshwater clam, *Corbicula leana* (Prime). *Invert. Reprod. Dev.*, 29 (1996) 193-197.
- Leitão, A.; Boldry, P.; Labat, J. and Thiriot-Quiévreux, C. Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia*, 41 (1999) 175-186.
- Lenz, C.M. Effects of habitat on growth indices in the ribbed mussel, *Modiolus demissus*. *Chesapeake Sci.*, 8 (1967) 221-227.
- Martínez-Lage, A.; González-Tizón, A. and Méndez, J. Chromosome differences between European mussel populations (Genus *Mytilus*). *Caryologia*, 49 (1996) 343-355.
- Martins, C.M. *Isognomon bicolor* (C.B. Adams, 1845) (Bivalvia, Isognomonidae): ocorrência nova, redescricao e anatomia descritiva funcional. Tese de doutorado, Instituto de Zoologia, USP, SP, 2000.
- Matthews, H.R. and Kempf, M. Moluscos Marinhos do Norte e Nordeste do Brasil. II - Moluscos do Arquipélago de Fernando de Noronha (com algumas referências ao Atol das Rocas). *Arquivos de Ciências do Mar*, 10 (1970) 1-53.
- Nalesso, R.C.; Duarte, F.L. and Mendes E.G. Phenotypic Plasticity in *Brachidontes darwinianus* (Bivalvia, Mytilidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 52 (1992) 245-249.

- Park, G. and Burch, J.B. Karyotype analyses of six species of north american freshwater mussels (Bivalvia, Unionidae). *Malacological Review* 28 (1995) 43-61.
- Popham, J.D. Comparative morphometrics of the acrosomes of the sperms of "externally" and "internally" fertilizing sperms of the shipworms (Teredinidae, Bivalvia, Mollusca). *Cell Tissue Res.* 150 (1974) 291-297.
- Popham, J.D. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. *Malac. Rev.* 12 (1979) 1-20.
- Reunov, A.A. and Hodgson, A. N. Ultrastructure of the spermatozoa of five species of south african bivalves (Mollusca), and an examination of early spermatogenesis. *J. Morphol.*, 219 (1994) 275-283.
- Rios, E.C. Seashells of Brazil. 2nd ed. Museu Oceanográfico da FURG, Rio Grande do Sul, (1995) cci - 328pp.
- Rodríguez, F.; Laguarda, A. and García-Cubas, A. The karyotype of *Isognomon alatus*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 25 (1983) 85-87.
- Rodríguez-Romero, F. and Gasca-Montes de Oca, M. Chromosomes of the experimental hybrid of *Crassostrea virginica* GMELIN 1791 and *Crassostrea rhizophorae* GUILDING 1828 (Pseudolamellibranchiata: Ostreidae). *Cien. Mar.*, 24 (1998) 55-63.
- Seed, R. Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. Un. King.*, 48 (1968) 561-584.
- Souza, M. and Oliveira, E. An ultrastructural study of *Crassostrea angulata* (Mollusca, Bivalvia) spermatogenesis. *Mar. Biol.*, 120 (1994) 545-551.

Tanaka, M.O. and Magalhães, C.A. Morphometric species recognition in *Brachidontes darwinianus* (Orbigny, 1846) e *Brachidontes solisianus* (Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). *The Veliger*, 42 (1999) 267-274.

Thiriot-Quiévreux, C. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. *Cah. Biol. Mar.*, 43 (2002) 17-26.

Torreiro, A.; Martínez-Expósito, M.J.; Trucco, M.I. and Pasantes, J.J. Cytogenetics in *Brachidontes rodriguezi* d'Orb (Bivalvia, Mytilidae). *Chrom. Res.*, 7 (1999) 49-55.