Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Thomáz Vieiralves

Variabilidade morfológica e genética associadas aos morfotipos de cor de *Callyspongia* sp. nov. com comentários sobre a plasticidade fenotípica em Porifera

Rio de Janeiro

2016

Thomáz Vieiralves

Variabilidade morfológica e genética associadas aos morfotipos de *Callyspongia* sp. nov. com comentários sobre a plasticidade fenotípica em Porifera

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Filogenia e Biogeografia.

Orientadora: Prof.ª Dra. Gisele Lôbo Hajdu

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

V665 Vieiralves, Thomáz

Variabilidade morfológica e genética associadas aos morfotipos de *Callyspongia* sp.nov. com comentários sobre a plasticidade fenotípica em Porifera / Thomáz Vieiralves. – 2016.

122 f : il.

Orientadora: Gisele Lôbo Hajdu

Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.

Inclui bibliografia.

1. Esponja - Teses. 2. Esponja – Morfologia – Teses. I. Hajdu, Gisele Lôbo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. III. Título.

CDU 593.4

Patricia Bello Meijinhos CRB-7/ 5217- Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Autor Data

Thomáz Vieiralves

Variabilidade morfológica e genética associadas aos morfotipos de *Callyspongia* sp. nov. com comentários sobre a plasticidade fenotípica em Porifera

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Filogenia e Biogeografia.

Aprovado em 29 de agosto de 2016.

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Rosana Mazzoni Buchas

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Bruno Cosme da Silva Gomes

Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO)

_____

Prof.ª Dra. Fernanda Correia Azevedo

Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof.ª Dra. Sula Salani Mota

Museu Nacional - UFRJ

_____

Prof.ª Dra. Gisele Lôbo Hajdu

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que me ajudaram nesses quatro anos da minha vida. Agradeço do fundo do meu coração a professora doutora Gisele Lôbo-Hajdu, que não somente me aceitou como apoio técnico, como me coorientou no mestrado e aceitou o desafio de me orientar no doutorado. Sem o seu carinho, dedicação, apoio, conselhos e muita paciência seria quase impossível a realização deste trabalho.

Eu agradeço todo dia pela família que tenho, pela minha mãe que mesmo sabendo que estes quatro anos seriam difíceis, me deu apoio, amor e afeto. Incentivou-me, mesmo quando eu pensei em desistir. Às minhas duas irmãs que sempre foram boas conselheiras, amigas e comparsas. Ao meu sobrinho, que manteve minha vida cheia de surpresas e alegrias. E ao meu pai que mesmo tendo sido muitas vezes severo, sempre me apoiou e tentou estar presente nos momentos difíceis.

Agradeço a todos que acreditaram em mim de qualquer maneira, aos amigos de departamento e laboratório, que me ajudaram profissionalmente: Valéria, Marcinha, Cid, Cláudia, Thalita, Débora, Victor Paulo e todos os outros.

Agradeço em especial ao professor doutor Thiago de Paula, por ter tido toda a paciência do mundo para me ensinar e auxiliar a manusear programas de análise estatística, bem como analisar todos os dados morfológicos e genéticos obtidos.

Agradeço aos diretores e coordenadores dos colégios em que leciono, pela paciência e principalmente por me oferecerem certa flexibilidade para que eu pudesse fazer o milagre de multiplicar as horas do dia, conciliando o período em sala de aula, com as aulas obrigatórias da pós.

Sábio não é aquele que sabe de
tudo e sim usa tudo que sabe...
Provérbio Chinês

RESUMO

VIEIRALVES, Thomáz. Variabilidade morfológica e genética associadas aos morfotipos de *Callyspongia* sp. nov. com comentários sobre a plasticidade fenotípica em Porifera. 2016. 122f. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A plasticidade fenotípica é definida pela capacidade dos organismos responderem a diferentes estímulos ambientais de maneiras distintas, alterando seu comportamento, sua morfologia ou sua fisiologia. As alterações na morfologia das esponjas têm sido correlacionadas com a ação das ondas, a velocidade de fluxo das correntes e da sedimentação do substrato, a variação na temperatura da água, ao movimento da água, a disponibilidade de sílica, e com fatores bióticos, como a predação e a simbiose. A plasticidade fenotípica em esponjas tem sido uma fonte de dificuldades para a análise taxonômica. No primeiro capítulo, foi realizada uma extensa revisão bibliográfica do conceito de plasticidade fenotípica em Porifera, e no segundo capítulo, utilizou-se o modelo de uma espécie de *Callyspongia* Duchassaing & Michelotti, 1864, encontrada na costa brasileira, para um estudo de caso. No nordeste do Brasil, vários morfotipos de cor da esponja *Callyspongia* sp. nov. foram observados: cinza-verde, azul / roxo, amarelo / laranja e vermelho, o que pode indicar a existência de espécies crípticas. Neste estudo descrevo caracteres morfológicos e moleculares, que contribuem para determinar o *status* taxonômico e testar a hipótese de que *Callyspongia* sp. nov. na costa brasileira representa um complexo de espécies, e não uma única espécie polimórfica. No total, 55 amostras de *Callyspongia* sp. nov. coletadas em Salvador, foram analisados: 12 laranjas, 15 azul / roxo, 06 vermelhas e 22 cinza / verde, e outras amostras de museu para comparação. Os espécimes de *Callyspongia* sp. nov., independente do morfotipo, apresentam formato ereto tubular, com superfícies repletas de cônulos, formados por espículas sustentadas por fibras de espongina, e uma reticulação nitidamente visível a olho nu. A coloração apresenta uma grande variedade *in vivo*: cinza, bege, verde, creme, azul, roxo, lilás, amarelo, laranja, vermelho e rosa. O esqueleto é fortemente estratificado, as fibras de espongina são preenchidas por espículas diactinais, do tipo óxeas, e apresenta a rede dupla integrada de fibras de espongina típica do gênero. O ectossoma é formado por fibras primárias e secundárias, as fibras primárias tendem a apresentar uma disposição poligonal irregular, já as fibras secundárias tendem a estar entre as fibras primárias. As fibras primárias possuem cerca de 40 µm, e as fibras secundárias, cerca de 30 µm. O endossoma é constituído por fibras primárias 47-*59,81*-66 µm, secundárias 23-*33,14*-38 µm e terciárias 5-*10,62*-18 µm. As megascleras, do tipo óxeas, tem tamanhos de 48 – 121 x 2 – 8 µm e as microscleras, do tipo toxas, de 8 a 19 µm. Foram utilizados três marcadores moleculares: os genes mitocondriais 16S e cox1, e os espaçadores internos transcritos nucleares (ITS1 e ITS2) do RNA ribossomal nuclear. Depois da extração do DNA genômico total, cada marcador foi amplificado e sequenciado em um sequenciador automático. As sequências foram editadas com o programa DNASTAR SeqMan® 7.1, alinhadas com o programa v6.935 MAFFT, e a relação entre elas reconstruída usando o programa MEGA6. Os nossos resultados demonstraram que os morfotipos de cor constituem uma única espécie.

Palavras-chaves: Biodiversidade. Espécies crípticas. Taxonomia. Multidisciplinaridade.

ABSTRACT

VIEIRALVES, Thomáz. Morphological and genetic variability associated with the morphotypes of *Callyspongia* sp. nov. with comments on the phenotypic plasticity in Porifera. 2016. 122f. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Phenotypic plasticity is defined by the ability of organisms to respond in different ways to different environmental stimuli, changing their behavior, morphology or physiology. Changes in the morphology of sponges have been correlated with the action of the waves, the flow rate of currents and the sedimentation of the substrate, the variation in water temperature, the water movement, the availability of silica, and with biotics factors, such as predation and symbiosis. Phenotypic plasticity in sponges has been a source of difficulties for taxonomic analysis. In the first chapter, an extensive literature review of the concept of phenotypic plasticity in Porifera was carried out, and in the second chapter, the model of a species of *Callyspongia* Duchassaing & Michelotti, 1864 found on the Brazilian coast was used for a case study. In northeastern Brazil, several sponge color morphotypes of the sponge *Callyspongia* sp. nov. were observed: gray-green, blue / purple, yellow / orange and red, which may indicate the existence of cryptic species. In this study I describe morphological and molecular characters which contribute to determine the taxonomic *status* and test the hypothesis that *Callyspongia* sp. nov. on the Brazilian coast represents a complex of species, not a single polymorphic species. In total 55 samples *Callyspongia* sp. nov. collected in Salvador, were analyzed: 12 oranges, 15 blue / purple, 06 red and 22 gray / green, and other museum samples for comparison. The specimens of *Callyspongia* sp. nov., regardless of the morphotype, have an erect tubular shape, with surfaces full of conules, formed by spikes supported by espongin fibers, and a reticulation clearly visible to the naked eye. The coloring presents a great variety *in vivo*: gray, beige, green, cream, blue, purple, lilac, yellow, orange, red and pink. The skeleton is strongly stratified; the espongin fibers are filled by diactin spicules, the oxea type, and presents the espongin fibers integrated in a doble network, typical of the genus. The ectosome is formed by primary and secondary fibers, the primary fibers tend to have an irregular polygonal arrangement, since the secondary fibers tend to be among the primary fibers. The primary fibers are about 40 µm, and secondary fibers are about 30 µm. The endosome consists of elementary fibers 47-*59,81*-66 µm, secondary fibers 23-*33,14*-38 µm, and tertiary fibers 5-*10,62*-18 micrometers. The megascleres, of the oxea type, have sizes of 48-121 x 2 - 8 µm, and the microscleres, of the toxa type, from 8 to 19 micrometers. Three molecular markers were used: the mitochondrial 16S and cox1, and the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of the nuclear ribosomal RNA. After extraction of the total genomic DNA, each marker was amplified and sequenced in an automatic sequencer. The sequences were edited with the DNASTAR SeqMan® 7.1 program, aligned with the v6.935 MAFFT program, and the relationship between them, reconstructed using the MEGA6 program. Our results have shown that the color morphs are a single species.

Keywords: Biodiversity. Cryptic species. Taxonomy. Multidisciplinarity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S –	Gene 16S do RNAr mitocondrial
28S –	Gene 28S do RNAr nuclear
BLAST –	Ferramenta Local Básica da Busca do Alinhamento, do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
$CHCl_3$ –	Clorofórmio
cox1 –	Gene da subunidade I da Citocromo c oxidase
d –	Distância
df –	Grau de liberdade, do inglês *degree of freedom*
DNA –	Ácido desoxirribonucléico
DNAmit –	DNA mitocondrial
dNTP –	Desoxinucleotídeos
e.g. –	Por exemplo, do latim *exempli gracia*
EDTA –	Ácido etileno diaminotetracético
et al. –	E colaboradores, do latim *et alli*
GuHCl –	Hidroclereto de guanidina
i.e. –	Isto é, do latim *id est*
L –	Comprimento total
M –	Molar
$MgCl_2$ –	Cloreto de magnésio
ML –	Verossimilhança Máxima, do inglês *Maximum Likelihood*
mM –	Milimolar
MN/UFRJ –	Museu Nacional / Universidade Federal do Rio de Janeiro
MNRJ –	Coleção de Poríferos do MN/UFRJ
N –	Número amostral
NCBI –	Centro Nacional para Informação Biotecnológica, do inglês *National Center for Biotechnology Information*
ng –	Nanogramas
NJ –	Agrupamentos de Vizinhos, do inglês *Neighbor Joining*
nm –	Nanômetros
OD –	Densidade Óptica, do inglês *Optic Density*

p –	Probabilidade
p. –	Página
pb –	Pares de bases
PCR –	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
pers. comm. –	Comunicação pessoal, do inglês *personal communication*
pH –	Potencial hidrogeniônico
pp. –	Páginas
r –	Coeficente de correlação de Pearson
R –	Coeficente de correlação
RNA –	Ácido ribonucléico
RNAr –	RNA ribossomal
s.s. –	Em sentido estrito, do latim *strictu sensu*
spp. –	Espécies
TWA –	do inglês *Tropical Western Atlantic* (Atlantico Tropical Ocidental)
U –	Unidade, medida de atividade enzimática
UPGMA –	do inglês *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*
W –	Largura máxima
x^2 –	Qui-quadrado
µg –	Microgramas
µl –	Microlitros
µM –	Micromolar

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	12
1	**CONCEITUAÇÃO TEÓRICA**.....	12
1.1	**O Filo Porifera**	12
1.2	**Plasticidade Fenotípica em Porifera**.....	14
1.2.1	Plasticidade Fenotípica.....	14
1.2.2	Plasticidade e variabilidade	15
1.2.3	Plasticidade e especiação.....	16
1.2.4	Plasticidade Fenotípica e delimitação de espécies.....	17
1.2.5	Plasticidade Fenotípica em Invertebrados Marinhos.....	18
1.2.6	Revisão bibliográfica sobre Plasticidade Fenotipica em Porifera.....	19
1.2.7	Fatores ambientais que influenciam na plasticidade fenotípica de Porifera	30
1.2.8	Considerações sobre o tema.....	32
1.3	**Plasticidade Fenotípica em *Callyspongia* sp. nov.**.....	33
1.3.1	O Gênero *Callyspongia* no Brasil.....	34
1.3.2	*Callyspongia* sp. nov.	35
1.4	**Espécies crípticas**.....	36
2	**OBJETIVOS**.....	37
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	38
3.1	**Material**.....	38
3.1.1	Área de estudo.....	38
3.1.2	Amostras estudadas.....	38

3.2 **Métodos Morfológicos**..... 39
3.2.1 Morfologia externa..... 39
3.2.2 Microscopia..... 39
3.2.2.1 *Lâmina de corte espesso*..... 40
3.2.2.2 *Dissociação espicular*..... 40
3.2.3 Análises estatísticas dos caracteres morfológicos..... 40
3.3 **Métodos Moleculares**..... 41
3.3.1 Extração do DNA Genômico..... 41
3.3.2 Quantificação e qualificação do DNA extraído e produtos de PCR..... 42
3.3.3 Marcadores moleculares e amplificação de DNA..... 44
3.3.4 Sequenciamento, edição de sequências e alinhamento..... 46
3.3.5 Análise dos dados e construção das árvores de relações filogenéticas..... 47
4 **RESULTADOS**..... 48
4.1 **Dados de Morfologia**..... 48
4.1.1 Morfologia externa e interna..... 57
4.1.2 Análises estatísticas dos caracteres morfológicos..... 66
4.2 **Dados de Moléculas**..... 70
4.2.1 Extração de DNA..... 70
4.2.2 Amplificação do DNA por Reação em cadeia da Polimerase (PCR)..... 70
4.2.3 Relações Filogenéticas..... 73
5 **DISCUSSÃO**..... 77
CONCLUSÕES..... 80
REFERÊNCIAS 81
ANEXO A - Lista dos 61 artigos analisados no estudo de plasticidade fenotípica em Porifera 100
ANEXO B – Tabelas e Figuras suplementares..... 104
ANEXO C – Lista de sequencias de 16 S e cox1 sequenciadas nesta tese..... 113

1 **CONCEITUAÇÃO TEÓRICA**

1.1 **O Filo Porifera**

As esponjas (Filo Porifera) estão dentre os animais pluricelulares vivos mais antigos na Terra. Elas são consideradas um dos filos mais bem sucedidos e de maior diversidade, não pelo seu número de espécies, mas pela variabilidade dos caracteres morfológicos e fisiológicos exibidos pelas espécies (HOOPER e VAN SOEST 2002). Apesar da maioria dos antigos grupos de esponjas ter se extinguido no final do Devoniano, as sobreviventes ocupam atualmente todos os Oceanos, podendo ser encontradas desde as zonas litorâneas (inclusive no entre-marés) até as abissais; além de serem também encontradas espécies que habitam ambientes dulcícolas, vivendo aderidos a substratos rochosos ou mesmo sobre restos de vegetação submersa, incrustando raízes de macrófitas, galhos ou troncos de árvores em regiões que sofrem inundações sazonais, como nas várzeas dos grandes rios amazônicos (VOLKMER-RIBEIRO 1999, VOLKMER-RIBEIRO e PAULS 2000). Isto se deve à sua alta capacidade de adaptação às mais diversas variáveis climáticas (VACELET 1999), traduzindo-se em sua alta representatividade em comunidades bentônicas (BELL 2008), especialmente de substrato consolidado, tais como os costões rochosos, recifes coralinos e fundos de rodolitos brasileiros (HAJDU *et al.* 1996, 1999).

As esponjas marinhas têm hoje um número estimado de 20.000 espécies habitando os sete mares e diversos ambientes lênticos e lóticos (VAN SOEST *et al.* 2016). Essa adaptabilidade associada a uma relativa simplicidade tem assegurado o sucesso evolutivo do grupo (HOOPER e VAN SOEST 2002). Tal simplicidade permite que os poríferos apresentem uma enorme plasticidade fenotípica acompanhada por uma grande variabilidade genética (SOLÉ-CAVA e THORPE 1991, 1994, LÔBO-HAJDU *et al.* 1999, 2004, ver também revisões em BOURY-ESNAULT e SOLÉ-CAVA 2004, WÖRHEIDE *et al.* 2004, CÁRDENAS *et al.* 2012).

O estudo da morfologia interna é de fundamental importância para a taxonomia das esponjas, pois na maioria dos casos, é através dele que se classificam estes animais (BERGQUIST 1978). A análise morfológica e da arquitetura das espículas e fibras de espongina tem sido o foco principal da taxonomia dos poríferos, mas, com o tempo, a análise

de características citológicas e embrionárias, bem como de metabólitos secundários e moleculares foram usadas como caracteres adicionais (ADDIS e PETERSON 2005, ERPENBECK *et al.* 2006). O uso de marcadores genéticos e técnicas de biologia molecular vêm atuando desde os anos 1990, como mais uma ferramenta sistemática disponível (MORITZ & HILLIS 1996, PALUMBI 1996, LÔBO-HAJDU 2006), e, que permitem inferir processos populacionais e filogenéticos. O estudo das relações filogenéticas foi descrito por Faith (1992) como uma forma de avaliar a diversidade biológica e de determinar prioridades de conservação em diferentes grupos. Segundo o autor, as áreas prioritárias para conservação seriam as possuindo o maior número de taxa com elevada diversidade de características originais (sinapomorfias). As aplicações dos marcadores moleculares vêm mostrando que as espécies de esponjas conhecidas como cosmopolitas são na verdade complexos de espécies crípticas (KNOWLTON 2000), com pouca plasticidade fenotípica intraespecífica (BENZIE *et al.* 1994, KLAUTAU *et al.* 1994, 1999, LÓPEZ-LEGENTIL e TURON 2005, BLANQUER e URIZ 2007, 2008).

Os poríferos apresentam uma enorme variabilidade morfológica, isto é, uma mesma espécie pode ter diferentes formas dependendo das condições ambientais (plasticidade, BELL e BARNES 2001, 2002a, BELL e SMITH 2004). Contudo, essa capacidade de sofrer diversas variações morfológicas a partir da exposição desses organismos a diferentes condições ambientais é ainda pouco conhecida, além de poder variar bastante entre diferentes grupos. A observação de características da morfologia externa, tais como coloração, consistência, tamanho, forma, ornamentação da superfície, produção de muco e até mesmo o odor torna-se necessária para fornecer caracteres adicionais (HOOPER 2000). Uma das causas das dificuldades de classificação de muitos organismos tem sido o esgotamento de caracteres gerados pela taxonomia clássica, baseada somente em descrições morfológicas (BLAXTER e FLOYD, 2003). Esse problema é potencializado em organismos cujos dados morfológicos são escassos, como em algumas esponjas (PINHEIRO e HAJDU, 2001).

As esponjas representam fonte importante de recursos para o homem. Além de servir como importante indicador ecológico, também possuem propriedades úteis na indústria e no comércio (RÜTZLER 1990). Algumas esponjas podem ser usadas na higiene pessoal, como esponjas de banho (Figura 01, *Spongia* e *Hippospongia*; VOULTSIADOU 2007, PRONZATO e MANCONI 2008), como recursos naturais usados para obtenção de fármacos produzidos ou modificados por estes organismos (MURICY e SILVA 1999, LEAL *et al.*

2012, MEHBUB *et al.* 2014). Voultsiadou (2007) lista outras utilizações das esponjas pelos gregos antigos, inclusive como objetos de arte.

Figura 1 - Esponjas à venda no mercado de Tarpon Springs, Florida, EUA.

Legenda: Esponjas de duas espécies diferentes em exposição, estas foram tratadas após a coleta no mar e antes de serem colocadas para venda.
Fonte: O autor
Fotos: Gisele Lôbo-Hajdu, 2015.

1.2 **Plasticidade Fenotípica em Porifera**

1.2.1 **Plasticidade Fenotípica**

Plasticidade fenotípica é definida pela capacidade de organismos responderem a diferentes estímulos ambientais de distintas maneiras, alterando assim seu comportamento, sua morfologia ou sua fisiologia. Estudos mostram que para garantir a sobrevivência das espécies, principalmente com relação as constantes variações ambientais, diversos organismos acabam criando mecanismos adaptativos, tais como migrar para localidades com condições mais favoráveis, ou podem vir a sofrer significativas alterações na morfologia e fisiologia (WEST-EBERHARD, 1989).

O termo plasticidade fenotípica pode também ser definido como sendo a capacidade de um organismo com determinado genótipo mudar seu fenótipo em resposta a alterações ambientais (BRADSHAW 1965). Ou a capacidade de um genótipo de produzir mais do que

uma forma alternativa de morfologia, estado fisiológico, e / ou comportamento em resposta às condições ambientais (PIGLIUCCI 2001). Whitman e Agrawal (2009) listam diversas definições em sua revisão, mas, concluem que a definição é muito simples, o complicado são os detalhes. Esta plasticidade se expressa em alguns casos como mudanças morfológicas e fisiológicas muito importantes e este fato pode ser considerado como um facilitador ou acelerador em alguns processos evolutivos, como a especiação (WEST-EBERHARD, 1989), como poderá ser visto a *posteriori* com mais detalhes.

Procurar novas áreas para se instalar pode ser considerado fácil quando analisamos organismos que apresentam boa mobilidade, mas torna-se um obstáculo quando se analisa organismos considerados sésseis, que podem vir a ter mobilidade somente por um curto espaço de tempo, durante seu período larval (BRADSHAW 1965, BUSS 1979, SMITH, 2009). Quando larvas que possuem curto período de mobilidade acabam por se fixar em um ambiente que não lhes oferece plenas condições para seu desenvolvimento, para que estas venham a garantir uma maior chance de sobreviver, elas acabam tendo de sofrer modificações consideráveis tanto em sua morfologia como na sua fisiologia (RITSON-WILLIAMS *et al.* 2009).

O estudo da plasticidade fenotípica foi negligenciado por um certo período de tempo. Os pesquisadores acreditavam que as alterações morfológicas sofridas por certos organismos poderiam ser somente defeitos sofridos pelos mesmos e não uma condição adaptativa. Os botânicos, por exemplo, preferiram evitar fazer qualquer menção a plasticidade, pois consideraram tal efeito como sendo um equívoco (BRADSHAW 1965). Tal receio somente veio a ser superado com os avanços na pesquisa genética, quando se verificou que alguns organismos, apesar de apresentarem características fenotípicas variadas, compartilhavam similaridades significativas em seu genótipo. Segundo análises realizadas por biólogos evolucionistas e ecólogos, verificou-se que a plasticidade fenotípica apresentada por determinadas espécies de organismos poderia servir como matéria prima para a seleção natural e provocar diferentes efeitos no processo evolutivo (revisado por WEST-EBERHARD, 1989).

1.2.2 **Plasticidade e variabilidade**

A plasticidade fenotípica é considerada responsável por promover diversificação (variabilidade), porque as vias de desenvolvimento que determinam os fenótipos induzidos pelo ambiente consistem de múltiplos genes (locos de caracteres quantitativos ou QTLs - *Quantitative Trait Loci*), que respondem à ação da seleção natural (WEST-EBERHARD, 1989; PFENNIG *et al.* 2010). A nossa compreensão de como a plasticidade expressa é induzida pelo meio ambiente, está crescendo. As mudanças ambientais induzem a expressão diferenciada dos genes por modificação do DNA, que podem regular a expressão do gene para cima ou para baixo, por exemplo, por modificação química ("tags") do DNA, que inclui a metilação do DNA e a acetilação das histonas (DUNCAN *et al.* 2014). Esses mecanismos epigenéticos são a base molecular da plasticidade fenotípica (DUNCAN *et al.* 2014).

A seleção natural opera em conjuntos de características, a plasticidade de uma característica pode influenciar a seleção de características ligadas. Uma mudança induzida pelo ambiente na morfologia, por exemplo, é muitas vezes acompanhada por mudanças no comportamento e na fisiologia (PFENNIG *et al.* 2010).

1.2.3 **Plasticidade e especiação**

A plasticidade fenotípica é considerada importante ecologicamente especialmente quando a mudança ambiental acontece em períodos relativamente curtos de tempo ou é espacialmente desigual, e diferentes fenótipos têm um desempenho marcadamente diferente sob condições diferentes, como parâmetros demográficos, interações diretas e indiretas entre espécies (como competição, predação entre outras) (MINER *et al.* 2005). Alguns autores apresentaram teorias de uma possível especiação simpátrica, sugerindo que a evolução de um polimorfismo ‘genético’ (mudança alélica) estável de vários nichos, poderia levar a acasalamentos entre morfotipos semelhantes, bem como o isolamento reprodutivo entre os morfotipos, e a formação de duas espécies, onde cada uma delas se assemelharia a um dos morfotipos originais (WEST-EBERHARD, 1989 e referências citadas).

A expressão de apenas um, de um conjunto de fenótipos alternativos em uma população, fixação do fenótipo, pode ocorrer com pouco ou (no caso de alternativas condicionais) sem

alteração genética, se o ambiente da população uniformemente induz ou selecciona para uma única alternativa. Por estes meios, todo um complexo conjunto de características podem tornar-se, de repente, típicas de um isolado. Embora a fixação do fenótipo possa ser totalmente não genética na natureza (se as alternativas forem controladas ambientalmente), este processo é susceptível de ser acompanhado por um aumento na modificação evolutiva (genética) da forma de aproximar-se e atingir a fixação. A divergência produz especiação se ela for suficiente para causar isolamento-pré ou pós-reprodutivo ou incompatibilidade de acasalamento, habilidade de persistir em simpatria (secundária), após a sobreposição de uma população parental e uma derivada, e é, por vezes, considerada o passo final na conclusão da especiação. Polifenismo pode, assim, contribuir para a especiação (WEST-EBERHARD, 1989 e referências citadas; PFENNIG *et al.* 2010).

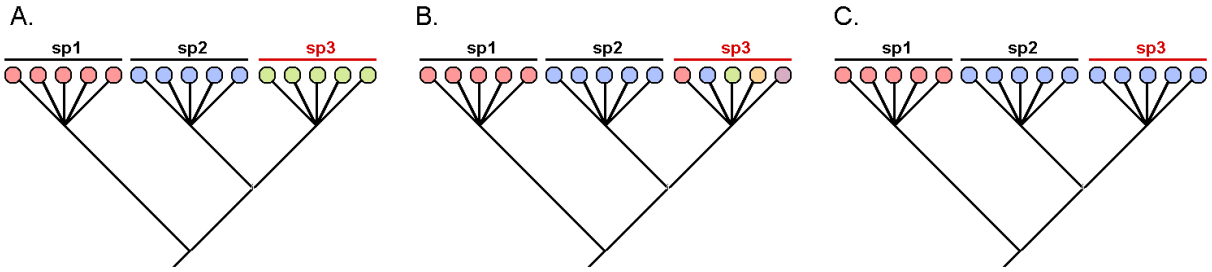
1.2.4 **Plasticidade Fenotípica e delimitação de espécies**

De Paula (2013) chama a atenção para as dificuldades de se distinguir a variabilidade (intra- ou interpopulacional) de um caráter com distribuição normal (diversas categorias, plástico), de uma diferença entre espécies. A variabilidade, polimorfismo, é importante para a sobrevivência em um ambiente que sofre constantes alterações. Sem diversidade, as populações naturais não conseguem se adaptar as mudanças no ambiente, e tornam-se mais propensas à extinção (DE PAULA 2013 e referências citadas).

A variabilidade impõe uma dificuldade no processo de delimitação de espécies. Já que as espécies são identificadas com base nos estados de suas características, e que espécies filogeneticamente próximas tendem a apresentar similaridade entre si para os mesmos estados. Assim, espécies que apresentam alta variabilidade em uma ou mais características, poderão apresentar uma sobreposição de seus intervalos de valores ou estados com outras mais próximas. Desta forma, não havendo uma descontinuidade na variabilidade, se torna impossível uma delimitação clara entre a variabilidade intraespecífica e a interespecífica.

Estas duas situações se encontram em posições opostas em um gradiente de diversidade, onde, de um lado, a plasticidade fenotípica implica em uma alta diversidade morfológica de um única espécie, enquanto que de outro, espécies crípticas decorrem de uma baixa diversidade entre espécies diferentes (DE PAULA 2013, Figura 02).

Figura 2 - Ilustração dos efeitos da plasticidade fenotípica e da ocorrência de espécies crípticas sobre a diversidade.



Legenda: A. Relação evolutiva entre três espécies hipotética (sp1, sp2 e sp3), cada qual com uma característica diagnóstica, ilustrando um cenário sem qualquer um dos fenômenos em questão. B. Relação evolutiva entre três espécies hipotéticas, ilustrando o fenômeno de plasticidade fenotípica, a qual ocorre em sp3, cujos indivíduos podem apresentar diferentes características. Neste caso, alguns indivíduos desta espécie poderiam ser erroneamente identificados como pertencentes às espécies sp1 ou sp2, e outros poderiam ser descritos como novas espécies, sendo estas, na realidade, sinônimas de sp3. C. Relação evolutiva entre três espécies hipotéticas, ilustrando a ocorrência de espécies crípticas, onde as espécies sp2 e sp3 apresentam a mesma característica, e sendo assim, são consideradas como pertencentes a uma única espécie. Tal situação, normalmente, só é descoberta com a utilização de dados outros além dos morfológicos, como moleculares, bioquímico, ecológicos, etc.
Fonte: Retirado de De Paula (2013) (com permissão do autor).

1.2.5 **Plasticidade Fenotípica em Invertebrados Marinhos**

Em sistemas marinhos, há um crescente interesse no papel da plasticidade fenotípica em interações entre espécies, incluindo interações predador-presa (PADILLA e SAVADO 2013). A plasticidade fenotípica é também cada vez mais importante em questões ambientais prementes, tais como invasão de espécies não-nativas, tanto para a identificação de características que fazem das espécies boas invasores, como para os impactos que espécies introduzidas têm sobre as comunidades nativas (SMITH 2009, PADILLA e SAVADO 2013).

Os organismos marinhos têm fornecido muitos exemplos importantes de plasticidade fenotípica e têm sido o foco de estudos experimentais de plasticidade durante décadas. Uma vasta gama de características de organismos marinhos tem sido demostrada ser fenotipicamente plásticas, incluindo aquelas características que são comportamentais, morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, químicas, ou relacionadas com a história de vida (PADILLA e SAVADO 2013). As plasticidades podem resultar de respostas ao meio ambiente durante a vida de um indivíduo ou através das gerações (MINER *et al.* 2005).

Entre diversos estudos de plasticidade fenotípica em invertebrados marinhos, pode-se citar o estudo com *Pseudopterogorgia bipinnata* (Octocorallia: Gorgoniidae) (SÁNCHEZ *et*

al. 2007), ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) (HAMDOUN *et al.* 2003), larvas de ouriço-do-mar (*Tripneustes gratilla*) (BYRNE *et al.* 2008), Lagosta do Pacífico (*Pleuroncodes monodon*) (HAYE *et al.* 2010), corais (*Montipora capitata*, *Pocillopora damicornis* e *Pocillopora aliciae*) (SCHMIDT-ROACH *et al.* 2013, PUTNAM *et al.* 2016), entre outros.

1.2.6 **Revisão bibliográfica sobre Plasticidade Fenotipica em Porifera**

As características ambientais são conhecidas por influenciar a morfologia (forma) de muitos organismos bentônicos incluindo as esponjas (MANCONI e PRONZATO 1991, BELL e BARNES 2000a, BELL e SMITH 2004). Em escalas locais, a morfologia tem sido correlacionada com a ação das ondas, a taxa de fluxo das correntes e de sedimentação para um grande número de espécies de esponjas, assim como para comunidades inteiras de esponjas (e.g. BIDDER 1923, BURTON 1947, PALUMBI 1984, 1986, BOND e HARRIS 1988, GAINO *et al.* 1995, PRONZATO *et al.* 1998, KAANDORP 1999, BELL e BARNES 2000a,b,c,d, 2002b, BELL *et al.* 2002a,b, BELL 2004, BELL e SMITH 2004, MCDONALD *et al.* 2002). Mais recentemente, fatores biológicos, também têm sido implicados no controle da forma das esponjas (HILL e HILL 2002). A adaptação morfológica das esponjas tem sido muitas vezes considerada uma função dos níveis de perturbação e de sedimentação (e.g. MANCONI e PRONZATO 1991, PRONZATO *et al.* 1998, BELL e BARNES 2000a, BELL 2004), com diferentes morfologias predominando em diferentes ambientes. Esta adaptação pode ocorrer tanto em níveis macro- (forma externa) e microscópicos (espículas) (e.g. PALUMBI 1984, BELL *et al.* 2002a, 2006, MCDONALD *et al.* 2002).

A variabilidade dos caracteres morfológicos e fisiológicos das espécies de poríferos se deve ao fato destas estarem sempre se adaptando a diversos fatores ambientais, tais como variação na temperatura da água (HENTSCHEL 1929, HARTMAN 1958), movimento da água (PALUMBI 1986), profundidade (batimetria, MALDONADO e YOUNG 1998), sedimentação do substrato (BELL *et al.* 2002b, BELL 2004), disponibilidade de sílica (JORGENSEN 1944, ELVIN 1972, MALDONADO *et al.* 1999), que pode levar a variações na morfologia das espículas (MERCURIO *et al.* 2000), ou fatores bióticos como a predação (LOH e PAWLIK 2009, 2011, LOH *et al.* 2012). A existência de barreiras reprodutivas pode também ser considerada como fator importante para explicar o aumento da plasticidade

fenotípica formando grupos de espécies de um mesmo gênero, ecologicamente distintas, que podem viver em áreas próximas (SARÁ 1988). As correntes marinhas, o hidrodinamismo de uma área e a presença de predadores podem afetar a forma, hábito e distribuição de ósculos de algumas espécies, e em certos casos, determinar diferenças na arquitetura e morfologia das espículas (e.g., KAANDORP 1999, MERCURIO *et al.* 2000, BELL *et al.* 2002a, HILL e HILL 2002, CARBALLO *et al.* 2006). Uma outra explicação para a plasticidade fenotípica das esponjas está na variação do substrato em que as larvas se fixam, formando assim 'espécies' simpátricas, como sugerido em *Cliona* (BARBIERI *et al.* 1995), *Leucosolenia* (SARÀ 1956), *Clathrina* (SARÀ 1959) e *Chondrilla* (BAVESTRELLO e SARÀ 1992).

Outras espécies de esponjas do Atlântico Tropical Ocidental são descritas apresentando plasticidade fenotípica: *Callyspongia* (*Cladochalina*) *vaginalis* (Lamarck, 1814), *Mycale* (*Zygomycale*) *angulosa* (Duchassaing e Michelotti, 1864), *Dragmacidon reticulatum* (Ridley e Dendy, 1886), *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), e *Cliona varians* (Duchassaing e Michelotti, 1864) (PINHEIRO e HAJDU 2001, HILL e HILL 2002, MURICY e HAJDU 2006, LÓPEZ-LEGENTIL *et al.* 2010). Contudo, para a grande maioria destas espécies, os fatores ambientais que desencadeiam esta plasticidade ainda são desconhecidos.

A presente revisão descreve as publicações que versam sobre o tema "Plasticidade Fenotípica em Porifera", levantados de revistas indexadas e disponíveis nas bases de dados do *Scopus*, *Google Scholar*, *Science Direct*, *Web of Science* e *PubMed* (Tabela 01). Na revisão foram utilizadas ferramentas de busca digitais por meio de palavras-chave e referências bibliográficas de estudos já selecionadas anteriormente.

Tabela 1 - Bases de dados e endereços na internet onde foram obtidos os artigos científicos.

Bases de dados	**Endereços na internet**
Science Direct	http://www.sciencedirect.com/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Google Scholar	http://scholar.google.com.br/
Scopus	http://www.scopus.com/
Web of Science	http://apps.webofknowledge.com/

Fonte: O autor, 2016.

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura publicada pesquisável nas bases entre os anos de 1984 e 2016 para encontrar publicações sobre plasticidade fenotípica em esponjas marinhas. Esta base de dados não inclui todas as revistas científicas, e não foram utilizados livros ou teses/dissertações/monografias, mas facilitou a busca de uma ampla gama de literatura de uma forma relativamente imparcial. Para identificar o máximo quanto possível da literatura relevante disponível, foram utilizados os seguintes termos de pesquisa:

Porifera *AND phenotypic AND plasticity*

Porifera *AND phenotyp* plastic**

Porifera *AND plasticity*

Porifera *AND plastic**

Phenotypic AND plasticity + Porifera

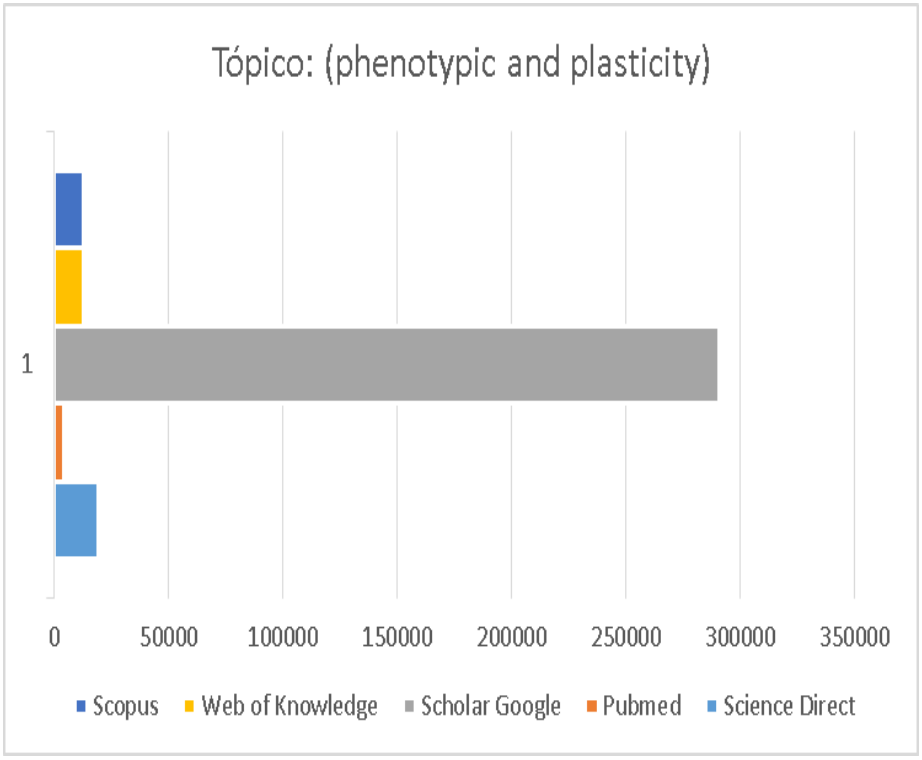
Os resultados estão apresentados na Tabela 02 e Figura 03.

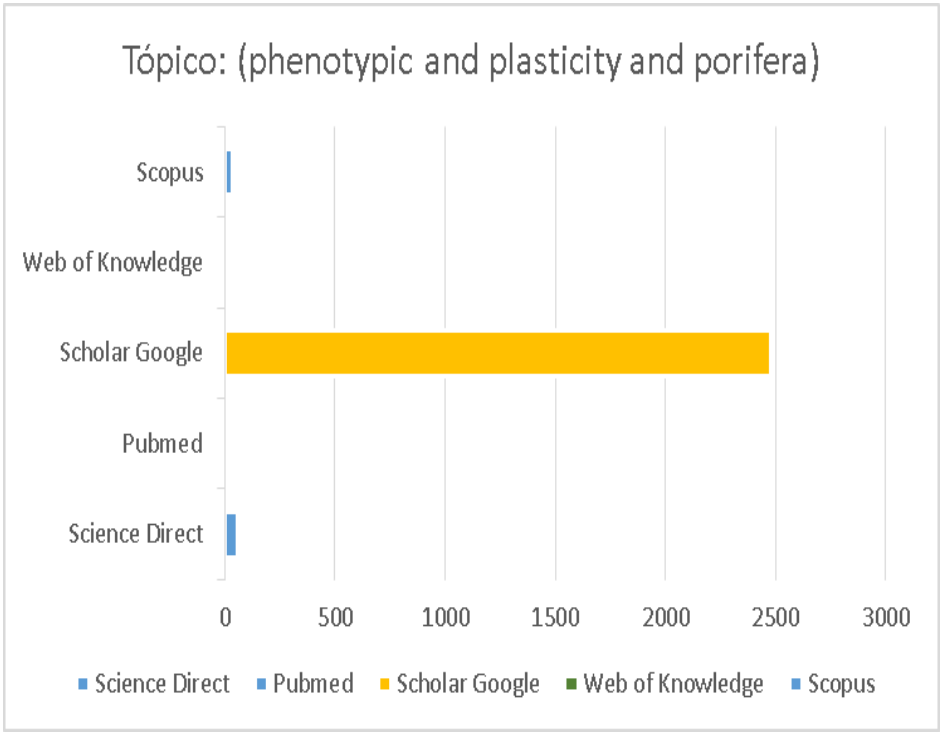
Tabela 2 - Resultados da última busca nas cinco bases de dados realizada na data de 10 de maio de 2016.

Bases de dados	***phenotypic and plasticity***	***phenotypic and plasticity and* Porifera**
Science Direct	19.440	58
PubMed	4.238	4
Google Scholar	291.000	2.480
Scopus	13.069	32
Web of Science	13.136	16
TOTAL	340.883	2.590

Fonte: O autor, 2016.

Figura 3 - Resultados da última busca para Plasticidade fenotípica e Porifera nas cinco bases de dados realizada na data de 10 de maio de 2016.





Fonte: O autor, 2016.

Do total de 2.590 artigos obtidos na busca com palavras chaves, foram selecionados os dados de 23 artigos científicos publicados em 17 periódicos nacionais e internacionais indexados, com fator de impacto variando entre 0.791 e 6.494, e QUALIS avaliado para a área de Biodiversidade da CAPES entre B2 e A1, sendo um não avaliado (Tabela 03).

Tabela 3 - Periódicos científicos indexados nos quais foram publicados estudos realizados com Plasticidade Fenotípica em Porifera entre 2000 e 2016.

Periódico científico	**Fatores de impacto 2014**	**Qualis (Biodiversidade)**
Biological Bulletin (*Biol Bull*-US)	1.638	B1
Coral Reefs	3.324	A1
Helgoland Marine Research	1.364	B2
Hydrobiologia	2.275	A2
Invertebrate Biology	1.200	B1
Journal of Experimental Marine Biology and Ecology (*JEMBE*)	1.866	A2
Journal of Phycology	2.844	A2
Marine Biodiversity	1.104	B2
Marine Biology (*Mar Biol*)	2.391	A2
Molecular Ecology	6.494	A1
Molecular Phylogenetics and Evolution	3.916	A2
PeerJ	2.112	N.A.
Scientia Marina	1.144	B1
The Italian Journal of Zoology (Modena)	0.791	B2
ZooKeys	0.933	B2
Zoological Journal of the Linnean Society	2.717	A1
Zootaxa	0.906	B1

*N.A.: não avaliado.

Estes 23 artigos selecionados na busca, estão listados na Tabela 04, mas não foram considerados representativos do tema plasticidade fenotípica em Porifera. Primeiro porque nos artigos mais recentes, com utilização de técnicas moleculares, ocorre uma mistura de conceitos, e nem todos os artigos tratam de plasticidade. E, em segundo lugar, porque artigos clássicos no estudo de plasticidade fenotípica em Porifera não foram ‘fisgados’. Desta forma, foram acrescentados à esta lista artigos obtidos das referências dos artigos mais recentes, totalizando 61 artigos analisados (ver lista no Anexo).

Tabela 4 - Vinte e três artigos selecionados na busca com as palavras chaves: "*phenotypic and plasticity and* Porifera".

Espécie	Característica analisada	Metodologia empregada	Determinação de espécie críptica ou não	Referência
Tethya aurantium e Tethya citrina	Estudo das diferentes estratégias ecológicas que atuaram sobre as duas espécies analisadas provocando alterações nas espiculas e consistência das esponjas.	Preparo e análise das lâminas de tecido e dissociação espicular das duas espécies analisadas.	Sim	Bavestrello et al. 2000
Latrunculia	Determinar as relações entre as variações ambientais, taxonômicas e químicas no gênero *Latrunculia* da Nova Zelândia.	A análise é feita por meio de eletroforese de aloenzimas de nove loci polimórficos das esponjas de cada ponto geográfico.	Sim	Miller et al. 2001
Anthosigmella varians	Estudo dos fatores bióticos responsáveis pela produção de ramos nas espécies, bem como verificação da hipótese de que o esqueleto dessa espécie de esponjas poderia servir como um fator contra predação.	Uso de uma combinação de transplante, proteção com gaiolas da *Anthosigmella varians*, visando evitar a espongivoria feita por peixes anjos. Montagem de lâminas de espículas para medir as variações espiculares e teste usando uma tesoura para simular uma falsa predação, visando observar se há alguma modificação nas espículas.	Não	Hill e Hill 2002
Placospongia	Estudo do processo de análise molecular (ITS) para averiguar se há uma dispersão das larvas de esponjas do gênero *Placospongia*, por longa ou curta distância.	Coleta, preservação das amostras, com posterior extração do material genético, amplificação por meio de PCR, sequenciamento e análise dos dados.	Sim*	Nichols e Barnes 2005
Diacarnus erythraenus	Análise de um tipo específico de ciano bactéria que é encontrada em todas as amostras de *Diacarnus erythraenus*, coletadas no Mar Vermelho.	Uso da microscopia eletrônica e por fluorescência para analisar evidências de transmissão vertical dos simbiontes das esponjas, além de mostrar como atua a plasticidade genética desses simbiontes dentro da esponja.	Não	Oren et al. 2005
Haliclona caerulea	Associação mutualística entre a esponja *Haliclona caerulea* e a macroalga calcarea vermelha *Jania adherens*	Transplante de amostras de *Haliclona caerulea* e analise dos resultados para verificar se as mesmas apresentaram respostas morfológicas variadas em diferentes profundidades. Também foi feita a proteção com gaiolas de amostras para verificar o comportamento das esponjas quanto a formação de seus esqueletos sem a ação de espongivoria dos peixes anjos.	Não	Carballo et al. 2006

Espécie	Característica analisada	Metodologia empregada	Determinação de espécie críptica ou não	Referência
Aiolochroia crassa, Aplysina aerophoba, Aplysina cauliformis, Aplysina fistularis, Aplysina fulva, Aplysinella rhax, Ianthella basta, Pseudoceratina arabica, Verongula gigantea, Verongula reiswigi, Verongula rigida, Smenospongia aurea e Chondrilla nucula.	Estudo da plasticidade fenotípica de organismos pertencentes a ordem Verongida, bem como *Smenospongia aurea* e *Chondrilla nucula* por meio de análise morfológica e molecular.	Análise morfológica e molecular das espécies selecionadas. A análise morfológica foi feita por meio da montagem de lâminas de espículas, de fibra de espongina e esqueleto, bem como das características externas, como coloração, disposição dos ósculos e formato do corpo.	Não	Erwin e Thacker 2007
Aplysina aerophoba e Aplysina cavernicola	Criação de um marcador confiável para distinguir espécies de *Aplysina* (*Aplysina aerophoba* e *Aplysina cavernícola*), além de mapear e descrever a flora e fauna associada a essas esponjas, bem como analisar as mudanças ecológicas em diferentes profundidades.	Foram analisados transectos, observando a fauna e flora associada as *Aplysinas*, bem como as mudanças ecológicas nas mais diversas profundidades. Para a morfometria e composição bioquímica dos metabólitos existentes, foi usado análise de cromatografia e microscopia por fluorescência.	Sim	Klöppel et al. 2009
Haliclona caerulea	Associação mutualística entre a esponja *Haliclona caerulea* e a macroalga calcarea vermelha *Jania adherens*.	Transplante de amostras de *Haliclona caerulea* para superfícies artificiais e analise dos resultados para verificar se as mesmas apresentaram respostas morfológicas variadas em diferentes profundidades. Também foi feita a proteção com gaiolas de amostras para verificar o comportamento das esponjas quanto a formação de seus esqueletos sem a ação de espongivoria dos peixes anjos.	Não	Enríquez et al. 2009
Cliona celata	Apresentação de um caso de especiação críptica em uma espécie conhecida como cosmopolita e de grande importância ecológica, a *Cliona celata*.	Após a coleta e preservação em etanol, foram feitas análises morfológicas, sendo por meio de análise de características externas, bem como pela análise de laminas de esqueleto e espículas. Foram feitas análises moleculares, nas quais o material selecionado teve seu DNA extraído, quantificado, amplificado pelo método do PCR e sequenciado.	Sim*	Xavier et al. 2010

Espécie	Característica analisada	Metodologia empregada	Determinação de espécie críptica ou não	Referência
Callyspongia vaginalis	Estudo da plasticidade fenotípica dos morfotipos de *Callyspongia vaginalis* e da relação delas com suas espécies congenéricas *Callyspongia fallax* e *Callyspongia plicifera*, por meio de análise morfológica e molecular.	Após a coleta e preservação em etanol, foram feitas análises morfológicas, sendo por meio de características externas, bem como pela análise de lâminas de esqueleto e espículas. Foram feitas análises moleculares (16S, 12S, 18S e 28S), nas quais o material selecionado teve seu DNA extraído, quantificado, amplificado pelo método do PCR e sequenciado.	Não	Lopez-Legentil et al. 2010
Spongia officinalis	Análise da diversidade genética das esponjas da espécie *Spongia officinalis*, por meio de fragmento do DNA mitocondrial (cox1)	Para efetuar a análise filogenética da espécie em questão, o material genético foi extraído, quantificado, amplificado com *primers* específicos e em seguida sequenciado. Para auxiliar na diferenciação das populações de esponjas, foi feita a análise por micro satélites.	Sim*	Dailianis et al. 2011
Petrosia ficiformis	Cultura de células de *Petrosia ficiformis* em meio de água do mar artificial, para observação da espiculogênese.	Após a coleta, as amostras foram levadas ainda vivas para o laboratório, onde houve a dissociação celular, estas foram colocadas em placas de Petri com meios de cultura feitos de agua do mar artificial, para poder visualizar a espiculogênese.	Não	Valisano et al. 2012
Ianthella basta	Filogenética molecular veio a apresentar uma topologia congruente consistente entre unidades significativas evolutivas que independem da morfologia da esponja.	Após a coleta e preservação em etanol 100%, foram feitas análises morfológicas, por meio de características externas, bem como de lâminas de esqueleto e espículas. Foram feitas análises moleculares (ITS2 e cox1), nas quais o material selecionado teve seu DNA extraído, quantificado, amplificado pelo método do PCR e sequenciado. Foi feito então o alinhamento das sequencias e a análise filogenética.	Sim*	Andreakis et al. 2012
Mycale laevis	Estudo das variações morfológicas e moleculares de quatro morfotipos de *Mycale laevis.*	Após a coleta e preservação em etanol 100%, bem como congelados a -20°C graus ou gelo seco foram feitas análises morfológicas, sendo por meio de características externas, bem como de lâminas de esqueleto e espículas. Foram feitas análises moleculares (18S, 28S e cox1), nas quais o material selecionado teve seu DNA extraído, quantificado, amplificado pelo método do PCR e sequenciado, foi feito então a análise filogenética.	Sim	Loh et al. 2012

Espécie	Característica analisada	Metodologia empregada	Determinação de espécie críptica ou não	Referência
Ianthella basta	Investigação da *Ianthella basta*, uma esponja comum na Grande Barreira de Corais de Papua, Nova Guiné, por meio de técnicas filogenéticas, químicas e microbiológicas, com o intento de caracterizar as duas variações quanto as cores.	Foram feitas diversas abordagens multidisciplinares baseadas nas análises de sequências parciais de gene mitocondrial (CO1), das regiões do espaçador interno (ITS-2), análise metabolômica usando FTICR-MS e gel de electroforese com padrões de gradiente de desnaturação (DGGE).	Sim	Freckelton et al. 2012
Eurypon gracilis, *Paratimea oxeata*, *Clathria* (*Microciona*) haplotoxa, *Eurypon denisae* entre as 682 espécies descritas.	Estudo da diversidade de espécies de esponjas da fauna estudadas em quatro sítios no Mar Liguriano, enfatizando espécies crípticas pouco conhecidas dentro das concreções calcáreas.	As amostras foram emblocadas, fatias finas foram tiradas e observadas no estereomicroscópio para detectar as espécies crípticas. Foram feitas análises espiculares em microscopia óptica e eletrônica e análise da estrutura esquelética.	Sim	Bertolino et al. 2013
Scopalina sp., *Halichondria cf. semitubulosa*, *Haliclona sp.*, *Mycale cecilia*, *Halichondria panicea*, *Suberites aurantiaca*, *Cliona euryphylla*, *Mycale cf. magnirhapidifera*, *Dysidea cachui*, *Cliona californiana*, *Haplosclerida sp. 1*, *Haplosclerida sp. 2* e *Clathrinida sp.*	Descrição da abundância e diversidade de esponjas associadas a camas de rodólitos no México (costa do Pacífico), para determinar toda a abundância e riqueza de espécies de esponjas, bem como as variações quanto as estruturas de rodólitos (tamanho, densidade entre outros) e abundância e acesso a todo o potencial das esponjas como estabilizadores das camas de rodólitos.	Houve a descrição das áreas analisadas, em seguida foi feita a análise da abundância das esponjas e rodolitos, verificando o tamanho e forma dos rodolitos e a ação das esponjas como estabilizadoras de rodolitos.	Não	Avila et al. 2013
Protosuberites epiphytum, *Terpios cf. fugax*, *Spirastrella cf. cunctatrix*, *Batzella aurantiaca*, *Chondropsis subtilis n. sp.*, *Strongylacidon zanzibarense*, *Strongylacidon meganese*, *Monanchora enigmática*, *Monanchora quadrangulata*, entre as 28 espécies estudadas	Apresentação de numerosos exemplos de epibiose entre esponjas e três diferentes espécies de octocorais do Oceano Pacifico (*Carijoa riisei*, *Paratelesto rósea* descrição de quatro novas espécies de esponjas que estão envolvidas nessas associações.	Após a coleta e preservação das amostras em diversas localidades, foram feitas análises morfológicas, sendo por meio de características externas, bem como de lâminas de esqueleto e espículas.	Sim	Calcinai et al. 2013

Espécie	Característica analisada	Metodologia empregada	Determinação de espécie críptica ou não	Referência
Carteriospongia foliascens, C. flabellifera, Phyllospongia papyracea, P. lamelosa e *Strepsichordaia lendenfeldi*	Identificação das fronteiras entre as morfoespécies e organização de uma unidade taxonômica robusta junto ao estudo da área. Análise dos níveis de diversidade genética para descrever morfoespécies escondidas e acesso aos diversos padrões de distribuição geográfica.	Após a coleta e preservação das amostras, foram feitas análises morfológicas, sendo por meio de características externas, bem como de lâminas de esqueleto e espículas. Foram feitas análises moleculares (18S, 28S e cox1), nas quais o material selecionado teve seu DNA extraído, quantificado, amplificado pelo método do PCR e sequenciado, foi feito o alinhamento das sequencias e análise filogenética.	Sim	Wahab et al. 2014
Haliclona (Soestella) caerulea,	Investigação sobre a migração de *Haliclona (Soestella) caerulea,* do Caribe para o Pacífico Central via Havaí.	Foi feita a coleta e preservação das amostras, e *a posteriori* foram feitas análises morfológicas, sendo por meio de características externas, bem como de lâminas de esqueleto e espículas e análises moleculares (18S e cox1), nas quais o material selecionado teve seu DNA extraído, quantificado, amplificado pelo método do PCR e sequenciado e foi feito a análise dos dados.	Sim*	Knapp et al. 2015
Spongillida	Revisão sobre o ciclo reprodutivo e de vida das esponjas da ordem Spongillida.	Foram feitas diversas coletas, preservação e análise microscópica do esqueleto, da organização espicular, bem como das gêmulas nas mechas do esqueleto ectossomal.	Não	Manconi e Pronzato 2016
Plakortis angulospiculatus	Estudo da variabilidade química existente em esponjas da espécie *Plakortis angulospiculatus* que são usadas para defesa contra espongivoria.	Foi feita a coleta e preservação das amostras, que *a posteriori* foram feitas análises morfológicas, e moleculares, nas quais o material selecionado teve seu DNA extraído, quantificado, amplificado pelo método do PCR e sequenciado e foi feito o a análise dos dados, também foi feito o estudo sobre a relação entre a espongivoria e a plasticidade fenotípica da esponja analisada. E por fim foi feita a análise dos metabólitos secundários usados pela Plakortis para evitar a predação.	Não	Slattery et al. 2016

Legenda: O complexo de espécies crípticas foi confirmado, e, portanto, não se trata de um artigo de plasticidade fenotípica.
Fonte: O autor, 2016.

Os artigos listados na Tabela 05 são artigos clássicos no estudo de plasticidade fenotípica em esponjas.

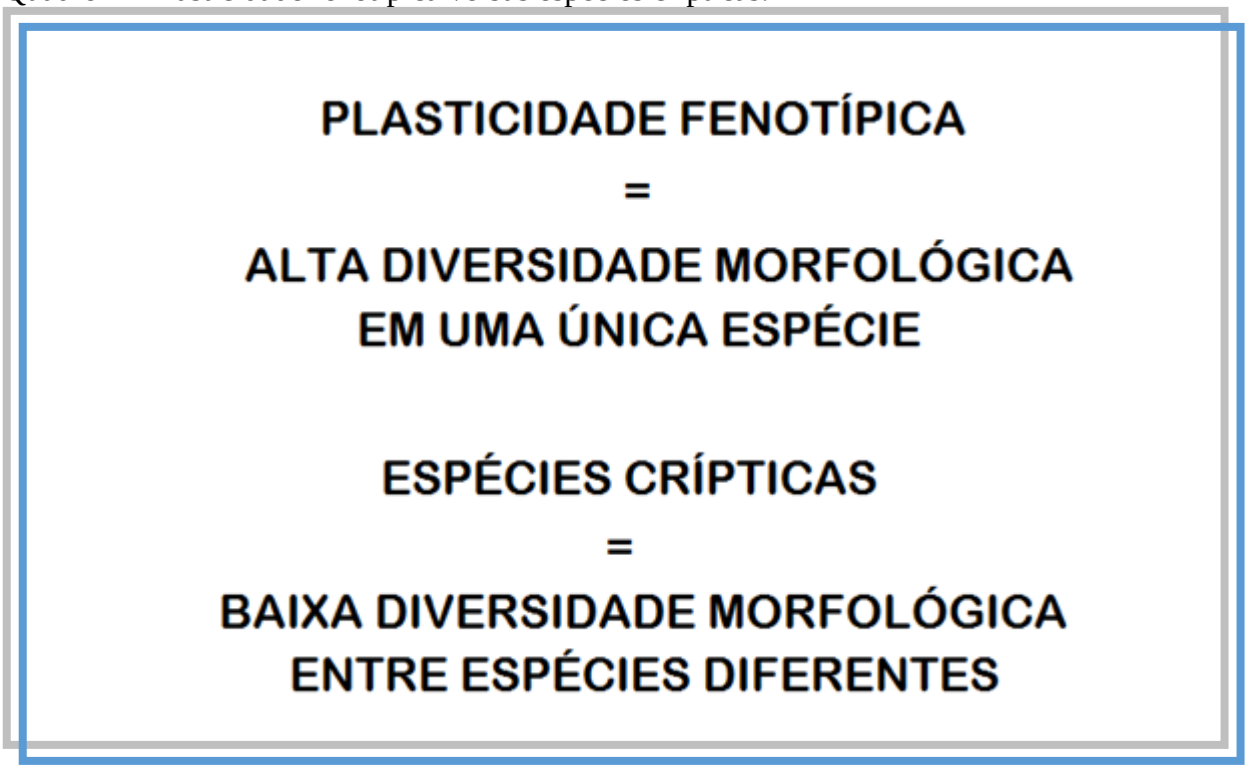
Tabela 5 - Casos clássicos de plasticidade fenotípica em esponjas, espécie, característica analisada, metodologia empregada, e referência.

Espécie	Característica analisada	Metodologia empregada	Referência
Halichondria panicea	Aclimatação morfológica à força das ondas	Transplante entre áreas de baixo e alto hidrodinamismo, medidas de raio e tensão do tecido (densidade e resistência) com dinamômetro.	Palumbi 1984
Halichondria panicea	Aclimatação morfológica à força das ondas	Medidas de tamanho de espículas, de raio e tensão do tecido (densidade e resistência) com dinamômetro, e de resistência do ósculo ao fluxo da água.	Palumbi 1986
Clathria spicata species complex	Quatro morfotipos vivendo em simpatria, com diferenças ecológicas.	Medidas de tamanho de espículas, estudo da arquitetura esqueletica e eletroforese de aloenzimas	Hooper et al 1991
Petrosia ficiformis e Cliona azzarolia	Influência da profundidade no tamanho das espículas de esponjas	Medidas de tamanho de espículas e de volume da esponja	Bavestrello et al 1993
Cliona viridis	Dois morfotipos vivendo em simpatia, com diferenças ecológicas.	Medidas de tamanho de espículas e eletroforese de aloenzimas	Barbieri et al 1995
Revisão	Plasticidade cellular, plasticidade do plano corporal e plasticidade como peça chave para a totipotencia	_	Gaino et al 1995
Várias espécies com diferentes formas: encrustante, massiva, globular, penduculada, flabelada, repentiforme, arborescente e papilada.	Influência da batimetria e do fluxo das correntes na morfologia das esponjas	Medidas de morfologia, força das correntes e taxa de sedimentação	Bell e Barnes 2000a
Várias espécies com diferentes formas: encrustante, massiva, globular, penduculada, tubular, flabelada, repentiforme, arborescente e papilada.	Adaptação morfológica a ambientes altamente sedimentados	Experimentos de sedimentação analisados com transectos em duas inclinações, 90º e 45º, a três metros de profundidades, em seis diferentes locais.	Bell e Barnes 2000b, Bell e Barnes 2000c e Bell e Barnes 2000d
Haliclona urceolus	Adaptação morfológica a ambientes altamente sedimentados	Experimentos de sedimentação com esponjas tubulares vivas e mortas, de filtração com corante, medidas de diâmetro de ósculos.	Bell, 2004
Várias espécies com diferentes formas: encrustante, massiva, globular, penduculada, flabelada, repentiforme, arborescente e papilada.	Acompanhamento das comunidades para detectar alteração no nível da variabilidade natural	Medidas de riqueza, composição e abundância, fotografia de quadrados, por um período de 10 anos	Bell *et al.* 2006,
Chondrilla aff. *nucula*	Adaptação das esponjas do recife e do mangue ao estresse	Transplante entre áreas de recife e do mangue, medidas de sedimentação, temperatura, salinidade, tamanho de espículas e eletroforese de aloenzimas	Rützler et al 2007
Revisão	Sobrevivência e persistência em reservatorios temporários de água doce	_	Manconi e Pronzato 2016

Fonte: O autor, 2016.

Nota-se nas Tabelas 04 e 05 que a dualidade dos conceitos e de posições opostas no gradiente de diversidade da plasticidade fenotípica *versus* espécies crípticas, descrito por De Paula (2013), vem sendo bastante pesquisado na última década em Porifera (DE PAULA 2013, Quadro 01).

Quadro 1 - Plasticidade fenotípica versus espécies crípticas.



Fonte: Lôbo-Hajdu (2015), com base em De Paula (2013).

1.2.7 **Fatores ambientais que influenciam na plasticidade fenotípica de Porifera**

Uma esponja pode expressar diferentes formas corporais dependendo do hidrodinamismo ao qual estão submetidas, pode reorientar a posição de seus ósculos para evitar que eles sejam bloqueados por sedimento, entre outras. (PALUMBI 1984, BELL e BARNES 2000a, BELL 2004). Estudos realizados com diversas espécies de esponjas apontam variação significativa na estrutura corporal de animais de uma mesma espécie que habita locais sob diferentes influências de fatores abióticos (PALUMBI 1986, BAVESTRELLO e SARÁ 1992, BARBIERI *et al.* 1995, MEROZ-FINE *et al.* 2005, MERCURIO *et al.* 2006, JACOBS e PODOLSKY 2010, LOH *et al.* 2012).

Por serem organismos extremamente sensíveis e apresentarem manifestações físicas e metabólicas ao menor sinal de alteração em seu habitat (HILL e HILL 2002), como modificações nas correntes de água, variação na temperatura (MASSARO *et al.* 2012), alteração na concentração de ácido silícico [Si(OH)4] (MALDONADO *et al.* 1999), são capazes de desencadear como resposta uma elevada taxa de modificações morfofisiológicas, como: alterações no fluxo de água circulante e eficiência da filtração (MASSARO *et al.* 2012), alterações na estrutura esquelética (espículas e malha orgânica) (MERCURIO *et al.* 2000, MEROZ-FINE *et al.* 2005) e alteração da comunidade simbiôntica (MASSARO *et al.* 2012).

Porém, é comum encontrarmos variantes de uma espécie vivendo em simpatria, isso indica que não apenas o ambiente pode ser o desencadeador das diferenças fenotípicas, mas que a variação, que está presente no genoma (BARBIERI *et al.* 1995, LÓPEZ-LEGENTIL *et al.* 2010, FRECKELTON *et al.* 2012, LOH *et al.* 2012, DEBIASSE e HELLBERG 2015) pode se manifestar de maneira desconexa com as influências ambientais. São todos casos de alta variabilidade morfológica dentro de uma mesma espécie, ou plasticidade fenotípica.

Na verdade, a aplicação de marcadores moleculares vem demostrando que a elevada plasticidade fenotípica intraespecífica em esponjas muitas vezes esconde um complexo de espécies crípticas (BENZIE *et al.* 1994, XAVIER *et al.*, 2010, CRUZ-BARRAZA et al 2012, DE PAULA *et al.* 2012, ANDREAKIS *et al.* 2012). Não apenas para organismos que vivem em simpatria, mas também para outros com amplas distribuições ou ditas cosmopolitas (SOLÉ-CAVA e THORPE 1986; KLAUTAU *et al.* 1999; LÓPEZ-LEGENTIL e TURON 2005; BLANQUER e URIZ 2007), os quais tem como característica manter um baixo fluxo gênico impedindo o isolamento reprodutivo completo (ESCOBAR *et al.* 2012). Desta forma, o avanço das técnicas moleculares tem permitido resolver questões relacionadas aos complexos de espécies, assim como amplas distribuições em Porifera. Além das técnicas moleculares, a utilização de perfis metabólicos também tem se mostrado como uma importante ferramenta para a taxonomia de grupos de difícil identificação morfológica (FRECKELTON *et al.* 2012, RUIZ *et al.* 2014). As espécies crípticas não são o escopo deste capítulo e serão exploradas mais adiante nesta tese.

1.2.8 **Considerações sobre o tema**

Esta revisão vem enfatizar a importância da plasticidade fenotípica em poríferos como um dos principais fatores evolutivos que permitem que haja uma maior adaptabilidade desses organismos aos mais variados meios, e muitas vezes como consequência, resultando em isolamento reprodutivo, e, consequentemente, especiação. A Figura 04 exemplifica plasticidade fenotípica em uma espécie de esponja marinha comum na Bahia da Ilha Grande.

Figura 4 - Plasticidade fenotípica na esponja *Dragmacidon reticulatum* (Ridley e Dendy, 1886).

Fonte: O autor, dados Salgado Mendes, 2006
Fotos Gisele Lôbo-Hajdu, 2015.

1.3 **Plasticidade Fenotípica em Callyspongia sp**.

A ordem Haplosclerida é caracterizada pela existência de esqueleto isodictial e megascleras diactinais. As megascleras encontradas em espécimes pertencentes a esta ordem são principalmente óxeas fusiformes curtas e estrôngilos curtos e compactos (HOOPER e VAN SOEST, 2002). As microscleras estão restritas a micróxeas, micro estrôngilos, sigmas toxas, ráfides e anfidiscos. Até 2015, a ordem Haplosclerida possuía três subordens (Haplosclerina, Petrosina e Spongillina), formadas por uma variedade de organismos marinhos e dulciaquícolas (HOOPER e VAN SOEST, 2002). Enquanto a subordem Spongillina continha todas as esponjas de água doce, as outras duas eram estritamente marinhas (HOOPER e VAN SOEST, 2002). Christine Morrow e Paco Cárdenas, em 2015, analisando dados de organismos pertencentes a classe Demospongiae, existentes no World Porifera Database, sob o ponto de vista morfológico, embriológico e molecular, acabaram por reorganizar a classe, separando-a nas subclasses: Verongimorpha, Keratosa e Heteroscleromorpha (MORROW e CÁRDENAS 2015). Nesta nova organização, a ordem Haplosclerida acabou sendo inserida na subclasse Heteroscleromorpha, juntamente com as famílias Callyspongiidae, Chalinidae, Niphatidae, Calcifibrospongiidae, Petrosiidae e Phloedictyidae, que antes estavam inseridas nas subordens Haplosclerina e Petrosina.

De acordo com Hooper e van Soest (2002), as extintas subordens Haplosclerina e Petrosina, são normalmente reconhecidas e definidas com base em sua descrição morfológica. No entanto, são encontradas muitas similaridades no formato e tamanho das espículas, além de similaridades na coloração (ZEA 1987) e no tipo de metabólitos secundários.

As análises filogenéticas com base em seqüências dos genes codificantes do RNA ribossomal (RNAr) são amplamente utilizadas para determinar as relações sistemáticas dentro de muitos grupos, inclusive de poríferos. Para analisar as relações dentro de Haplosclerida tem-se usado a região 5’ do gene 28S do RNAr (ERPENBECK *et al.* 2004) ou o gene 18S do RNAr (REDMOND *et al.* 2007).

1.3.1 O Gênero *Callyspongia* no Brasil

A espécie abordada neste estudo pertence ao gênero *Callyspongia*, que apresenta 190 espécies válidas, distribuídas em cinco subgêneros (*Callyspongia*, *Cavochalina*, *Cladochalina*, *Euplacella* e *Toxochalina*) segundo o *World Porifera Database* (WPD, http://www.marinespecies.org/porifera/, VAN SOEST *et al.* 2016).

Sua classificação atual é:

Porifera Grant, 1836
Demospongiae Sollas, 1885
Heteroscleromorpha, Morrow e Cardenas, 2015
Haplosclerida Topsent, 1928
Callyspongiidae de Laubenfels, 1936
Callyspongia Duchassaing e Michelotti, 1864

A família Callyspongiidae contém quatro gêneros válidos, quatro subgêneros e um grande número de espécies com distribuição ampla, que varia de águas tropicais a águas frias. Eles são encontrados principalmente em águas mais rasas. Os indivíduos podem ser encontrados na forma incrustante, massiva, sob a forma de vaso, tubular, lamelados ou na forma arborescente. A superfície externa tende a ser lisa, com cones, canais, porções pontiagudas, fibras com reticulações tangenciais na superfície são visiveis. A família é caracterizada pela existência de esqueleto ectossomal bidimensional contendo fibras de espongina primárias, secundárias, e, às vezes, terciárias. As fibras estão repletas de óxeas ou estrôngilos, podendo ou não ser cobertos por material externo. O esqueleto coanossomal é formado por uma rede primária principal ou longitudinal, podendo ser do tipo au/unispicular, pauciespicular ou multiespicular; e as fibras de espongina secundária ou de conexão podem ser, uni, bi ou aspicular.As malhas coanossomais são regulares ou retangulares, com algumas exceções (DESQUEYROUX-FAÚNDEZ e VALENTINE 2002).

No que se remete as megascleras, sejam elas óxeas ou estrôngilos, podem ser encontradas em números variáveis, normalmente pequenas, podendo até mesmo ser consideradas como vestigiais, ausentes ou substituídas por grãos de areia ou materiais externos. Suas microscleras, quando presentes, são toxas. A espongina é tipicamente abundante. As principais características que permitem a diferenciação do gênero é a existência de malhas ectossomais, morfologia com fibras subectossomais e pode haver presença ou ausência de fibras coanossomais (HOOPER e VAN SOEST, 2002).

Definição (*sensu* DESQUEYROUX-FAÚNDEZ e VALENTINE, 2002): *Callyspongia* possui um só tamanho de malha ectosomal. Camada ectosomal única, não-híspida. Fibras coanossomais multiespiculares, não fasciculadas, bainha de espongina presente. Fibras conectoras bem definidas, malha retangular sem espículas livres.

O gênero *Callyspongia* Duchassaing e Michelotti, 1864, Familia Callyspongiidae, apresenta dez espécies registradas para a costa brasileira: *Callyspongia* (*Callyspongia*) *coppingeri* (Ridley, 1881); *C.* (*Ca.*) *fallax* Duchassaing e Michelotti, 1864; *C.* (*Ca.*) *laboreli* Hechtel, 1983; *C.* (*Ca.*) *pallida* Hechtel, 1965; *Callyspongia* (*Cladochalina*) *fibrosa* (Ridley e Dendy, 1886); *C.* (*Cl.*) *pergamentacea* (Ridley, 1881); *C.* (*Cl.*) *tenerrima* Duchassaing e Michelotti, 1864; *C.* (*Cl.*) *vaginalis* (Lamarck, 1814); *C.* (*Cl.*) *villosa* (Pallas, 1766) e *Callyspongia* (*Toxochalina*) *pseudotoxa* Muricy e Ribeiro, 1999 (MURICY *et al.*, 2011). E mais duas espécies ainda não descritas, uma delas é o alvo deste trabalho e será tratada como *Callyspongia* sp.

As esponjas do gênero *Callyspongia* participam de uma gama de relações interespecíficas com os mais variados grupos (PAWLIK *et al.* 2013), inclusive com simbiontes.

1.3.2 ***Callyspongia* sp. nov.**

Callyspongia sp. nov. ocorre na costa do Nordeste do Brasil em diversos morfotipos preponderantes quanto à coloração: cinza/bege/verde acinzentado, azul/roxo, amarelo/laranja e vermelho/rosa (HAJDU *et al.* 2011; Figura 05), que podem indicar a existência de espécies crípticas. Embora esta não seja ainda uma espécie descrita, seus dados de identificação estão presentes no Guia de Esponjas Marinhas da Bahia (HAJDU *et al.* 2011).

Figura 5 - Diversos morfotipos de *Callyspongia* sp. nov. oriundos de Salvador, BA.

Legenda: Quatro morfotipos: 1-verde acinzentado, 2-amarelo/laranja, 3-azul/roxo e 4-vermelho.
Fonte: O autor, fotos G. Lôbo-Hajdu, 2008.

1.4 **Espécies crípticas**

O conceito de espécie críptica abrange espécies, que embora morfologicamente similares, constituem unidades evolutivas distintas (GALETTI *et. al.*, 2008). A existência de espécies crípticas é recorrente entre os organismos marinhos, uma vez que, estes raramente escolhem um parceiro reprodutivo específico, sendo comum a liberação dos gametas na água e a maior parte do isolamento reprodutivo pré-zigótico é desempenhado pelo reconhecimento químico entre os gametas (BLANQUER e URIZ 2007, GALETTI *et. al.* 2008).

As espécies crípticas e os complexos de espécies são particularmente frequentes entre esponjas (SOLÉ-CAVA e BOURY-ESNAULT 1999, BLANQUER e URIZ, 2007). Estes representam grupos de espécies estreitamente relacionadas, em que, intra-especificamente e inter-especificamente, ocorre sobreposição de nichos e ampla variabilidade. Frequentemente, os membros de um complexo de espécies não têm isolamento reprodutivo completo; portanto, o complexo pode manter um intenso fluxo de genes (ESCOBAR *et al.* 2012). Várias espécies de esponjas consideradas cosmopolitas ou com uma ampla distribuição apresentam-se como complexos de espécies crípticas quando examinadas geneticamente (SOLÉ-CAVA e THORPE 1986, SOLÉ-CAVA *et al.* 1992, KLAUTAU *et al.* 1994, 1999, BENZIE et al. 1994, MURICY *et al.* 1996, LAZOSKI *et al.* 2001, NICHOLS e BARNES 2005, WULFF 2006, BARUCCA *et al.* 2007, BLANQUER e URIZ 2007, HOSHINO *et al.* 2008, XAVIER *et al.* 2010, DAILIANIS *et al.* 2011, ANDREAKIS *et al.* 2012, CRUZ-BARRAZA *et al.* 2012, DE PAULA *et al.* 2012, RUIZ *et al.* 2014, KNAPP *et al.* 2015).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral estudar a variabilidade genética e morfológica de *Callyspongia* sp. nov.

Teve como objetivos específicos:

- Descrever os morfotipos de *Callyspongia* sp. nov.;
- Estimar a variabilidade genética dos morfotipos de *Callyspongia* sp. nov. por meio de análise dos marcadores 16S RNAr e cox1 do DNA mitocondrial e ITS do DNA nuclear.
- Correlacionar a variabilidade morfológica, estimada por meio de dimensões espiculares, com dados moleculares para testar a hipótese de que *Callyspongia* sp. nov. na costa brasileira representa um complexo de espécies, e não uma única espécie polimórfica.

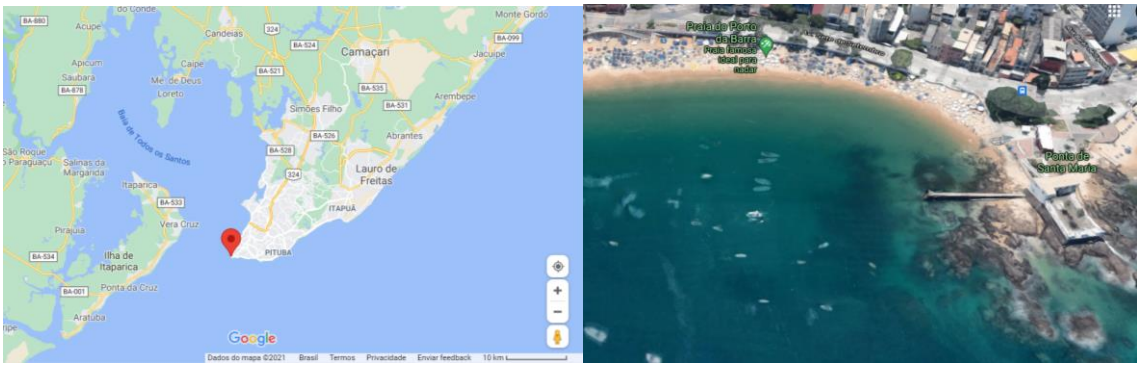
3 **MATERIAL E MÉTODOS**

3.1 **Material**

3.1.1 **Área de estudo**

As amostras de *Callyspongia* sp. foram coletadas pela equipe do LGMar na localidade de Porto da Barra, Salvador, Bahia (coordenadas: 13°0'21"S 38°31'58"W) (Figura 6) e depositadas na coleção do Museu Nacional (MN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Figura 6 - Mapa da área de estudo e imagem da Praia do Porto da Barra, Salvador, BA.



Fonte: Google Maps (https://www.google.com/maps/place/13°00'21.0"S+38°31'58.0"W/).

3.1.2 **Amostras estudadas**

Os espécimes escolhidos para análise foram processados para um melhor aproveitamento do material. Estes indivíduos tiveram um pequeno fragmento separado para servir como “voucher” para estudos moleculares e outros dois fragmentos para morfologia, um para análise do esqueleto e outro para análise das espículas. Os fragmentos foram limpos de exosimbiontes e vestígios do substrato com pinça e com auxílio de lupa, quando necessário. Foram anotados os dados pertinentes a coleta, como profundidade em que se encontrava a amostra em questão, o local de coleta, a data de coleta, a coloração *in vivo*, a coloração após conservação no reagente e o nome do coletor. A Tabela A1 (Anexo) apresenta todas as informações de coleta referentes aos espécimes estudados.

Outras amostras do gênero *Callyspongia* também constantes na Tabela A1 provêm de materiais depositados nas coleções zoológicas do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) e da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sempre preservadas em etanol 93%, e utilizadas para comparação. Além disso foram utilizadas sequencias depositadas no GeneBank nas analises comparativas com os marcadores moleculares (Tabela A2, Anexo).

3.2 **Métodos Morfológicos**

3.2.1 **Morfologia externa**

O estudo da taxonomia teve como base a análise da morfologia externa dos espécimes, que consistiu na observação do tamanho e forma do fragmento, na cor do espécime vivo e após ser fixado. A descrição destas características utilizou os termos do trabalho de Boury-Esnault e Rützler (1997). Também foram analisadas a superfície e ornamentação da esponja, o formato, a variação de tamanho, a localização dos ósculos e poros e a variação de cores no interior e exterior dos ósculos (e consistência, textura, e outros caracteres). Além da morfologia externa, foram observados caracteres da anatomia interna (Tabela A3, Anexo) e análise das espículas de acordo com a metodologia de Rützler (1978) parcialmente modificada.

3.2.2 **Microscopia**

A identificação do material seguiu o protocolo estabelecido anteriormente no laboratório para o preparo de lâminas de espículas dissociadas e de cortes espessos. Estas lâminas foram analisadas ao microscópio ótico e comparadas a coleções de referência (MNRJ e UFRJPOR) e a descrições da literatura especializada.

A descrição detalhada das espécies passou pela realização de inúmeras micrometrias (em ocular milimetrada). Fotografias digitais foram feitas com a câmera digital de 3.1 megapixel CMOS acoplada ao microscópio Omax.

3.2.2.1 Lâmina de corte espesso

Para o preparo das lâminas, foi cortado um pequeno fragmento da esponja, perpendicular a sua superfície, de aproximadamente 2 cm^3, que foi mergulhado em álcool absoluto suficiente para cobrir o corte, por 30 minutos. A troca do álcool foi feita duas vezes, retirando o álcool velho e adicionando-se o novo por também 30 minutos. O corte foi diafanizado por duas vezes em xilol, por 30 minutos. Com o auxílio de uma pinça o corte foi retirado do xilol e incluído em parafina líquida suficiente para cobrir o corte, onde foi deixado por 24 horas (na parafina). Foram montados blocos de parafina com ectossoma virado para cima de modo que se visualize a superfície e a parte interna. Quando a parafina esfriou, o bloco com o corte foi retirado da forma e com um bisturi foi fatiado o mais fino possível depositando esse corte em uma placa de Petri onde foram cobertos com xilol. Este foi trocado várias vezes até a retirada total da parafina. Os cortes foram, finalmente, passados para uma lâmina histológica e embebidos em Entellan ou Bálsamo do Canadá, e cobertos com lamínula.

3.2.2.2 Dissociação espicular

Foi retirado um fragmento de cada espécime, amostrando boa parte do córtex, e colocados em um tubo de ensaio. Esses fragmentos foram fervidos com ácido nítrico até a completa dissociação das espículas. Após a fervura, o material foi lavado quatro vezes com água destilada e quatro vezes com álcool, sendo que entre uma lavagem e outra, o tubo foi centrifugado a 1000 rpm, em centrífuga clínica de mesa. O material foi pipetado sobre lâmina, as quais tiveram o processo de evaporação do álcool apressado com fogo. Após secas, as lâminas foram embebidas em Entellan ou Bálsamo do Canadá e cobertas com lamínula.

3.2.3 Análises estatísticas dos caracteres morfológicos

Com base nos dados levantados, foram feitos dois tipos de análises estatísticas, utilizando o programa PAleontological STatistics 3.13 (PAST): (1) Correlação e Regressão, onde todas as variáveis foram correlacionadas entre si; e (2) Análise Discriminante, na qual, por meio da estatística de variáveis canônicas, foi procurado se alguma variável era capaz de distinguir os grupos genéticos, e testar a acurácia dos grupos pela morfometria (se as variáveis utilizadas podem ser utilizadas como diagnose dos grupos, evitando erros de classificação pela análise).

3.3 **Métodos Moleculares**

3.3.1 Extração do DNA Genômico

Todas as amostras deste trabalho tiveram seu DNA extraído pelo método de extração de DNA genômico total com solução de lise contendo 2% de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), em 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA e 1,4 M NaCl, a partir de Damato e Corach (1996) modificado, segundo o seguinte protocolo:

- A amostra é triada sob estereoscópio óptico para remoção de parasitas e outros organismos associados com o intuito de evitar contaminação da amostra;
- Um pequeno pedaço da amostra (cerca de10mg) é retirado e colocado em tampão de eluição (TE) (5,0 mL 1 M Tris HCl pH 8,0; 4,0 mL 0,5 M EDTA pH 8,0; H_2O MilliQ suficiente para completar 50mL) (SAMBROOK *et al.*, 1989) por 20 minutos, a fim de se retirar o álcool usado como fixador. Esse processo é repetido duas vezes. A solução de lise é preparada imediatamente antes do uso, adicionando, em capela de exaustão, 2 µL de β-mercaptoetanol por amostra a ser utilizada, assim como 1 µL de Proteinase K (20 mg/mL);
- A amostra é picada e colocada em microtubo de polipropileno de 1,5 mL, adiciona-se 700 µL de tampão de lise. A seguir é homogeneizada com pistilo de polipropileno aplicando-se movimentos circulares contra o fundo do tubo;
- As amostras são incubadas por 1 hora ou *overnight* a 56°C em banho maria (ou até a dissolução da amostra);
- São adicionados, por amostra, 700 µL de clorofórmio (em capela de exaustão). É importante verificar se os tubos estão bem tampados para fazer uma homogeneização por inversão até que a solução fique com aspecto leitoso;
- As amostras são centrifugadas por 5 minutos, a 4°C, 10.000 rpm em microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5417R);
- Cuidadosamente, somente a parte aquosa, ou sobrenadante, é retirada e transferida (em capela de exaustão) para um novo tubo numerado;
- Essa etapa é repetida, até que o sobrenadante esteja límpido;
- É verificado o volume obtido da fase aquosa e adiciona-se 1/10 deste volume de 5 M de NaOAc. Os tubos são fechados e novamente homogeneizados por inversão;

- As amostras são centrifugadas por alguns segundos para que o tubo possa ser aberto sem perda de material (que fica retido na tampa);
- É adicionado igual volume de isopropanol gelado (conservado em congelador);
- O tubo é invertido por várias vezes para que o isopropanol se misture à fase aquosa, e armazenado no congelador por no mínimo uma hora para a precipitação do DNA;
- As amostras são centrifugadas por 20 minutos a 14.000 rpm na microcentrifuga Eppendorf Centrifuge 5417R refrigerada;
- O sobrenadante é descartado com cuidado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 100% (gelado);
- As amostras são centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm em microcentrifuga Eppendorf Centrifuge 5417R;
- O sobrenadante é descartado com cuidado, observando o `pellet` (precipitado) de DNA no fundo do tubo, este é lavado o com 1 mL de etanol 70% (gelado). O material é novamente centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm em microcentrifuga Eppendorf Centrifuge 5417R;
- O precipitado é deixado para secar em temperatura ambiente (aberto na bancada) ou em estufa à 60°C, até que este seque por completo, para ser suspenso em ~50 µL de água MiliQ + RNAse (200 µg/ml).
- As amostras armazenadas em freezer -20°C para uso posterior.

3.3.2 **Quantificação e qualificação do DNA extraído e produtos de PCR**

Os produtos de extração foram quantificados por leitura da densidade óptica (OD) dos espectros de 260 nm, 280 nm e 230 nm em espectrofotômetro Nanodrop™ 2000c (Thermo Scientific). As OD's foram obtidas automaticamente. A absorbância em 260 nm foi utilizada para estimar a concentração de ácidos nucléicos das soluções purificadas, onde 1 OD = 50 ng/µl. As razões 260/280 e 260/230 foram utilizadas para estimar o grau de pureza do DNA em relação a contaminações por proteínas e solventes, respectivamente, cujos ótimos estariam

na faixa entre 1.7 a 1.9. Nos casos onde o resultado final da extração foi quantitativa e qualitativamente baixo, as amostras foram re-extraídas a fim de se obter melhores resultados.

Em alguns casos, quando as amostras apresentaram alto rendimento em termos de concentração, mas baixa qualidade em relação as razões dadas, foi realizada uma avaliação qualitativa do produto de purificação por meio de eletroforese em gel de agarose a 0.8%, visualizados após incubação em brometo-de-etídeo a 0,5 µg/ul. Na maior parte dos casos, a eletroforese não foi utilizada devido a concentração das amostras estar abaixo do limiar de detecção do método.

A análise de DNA por eletroforese é uma das técnicas fundamentais nos laboratórios de pesquisa em biologia molecular. O princípio é baseado no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e consequentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel e submetida a um campo elétrico, migrar em direção ao pólo positivo (anôdo). A velocidade da migração depende também do tamanho da molécula. Por isso, em um dado momento da eletroforese, moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos da matriz.

Os géis utilizados em ambas as etapas (extração e PCR) deste trabalho seguem o mesmo protocolo de preparo, alterando apenas a concentração da agarose.

Para um volume de 100 mL de gel de agarose:

- É medido o volume de 100 mL de tampão de TBE 0,5X (45 mM Tris-base, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA), reservar.
- São pesadas 0,8 gramas de agarose (agarose NA purificada GE Helathcare) para o gel de 0,8% (gel utilizado para extração) ou 1,5 gramas de agarose para o gel de 1,5% (utilizado para o PCR), reservar.
- O TBE e a agarose são misturados em Erlenmeyr de 500 mL e levados ao forno micro-ondas com potencia de 80 V por aproximadamente 45 segundos ou até que a agarose se dissolva.
- É adicionado 0,5 mg/mL brometo de etídio (EtBr), é misturado por leve agitação.
- O preparado é depositado na cama de preparo de gel, e o pente para a confecção dos poços e colocado. Após cerca de 50 minutos ou quando estiver gelificado o gel é retirado da cama molde e utilizado para a corrida de eletroforese, esta que ocorre com o gel imerso em tampão de TBE 0,5X.

Para uma corrida são utilizados 5 µL de cada amostra de DNA genômico ou produto de PCR; no caso o produto resultante da extração, é misturado a cada amostra à 2 µL de tampão de carregamento de amostra ou *loading-buffer* (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xilenocianol) (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para cada corrida são colocados marcadores de DNA de concentrações conhecidas, sendo para isso destinados poços específicos no gel (DNA de bacteriófago lambda λ 10 ng/µL, λ 50 ng/µL para extrações, e marcadores tipo "*ladder*" para amplificações de PCR). Para a quantificação das amostras de produto de PCR foram aplicados 2 µL de um marcador molecular de tamanho conhecido de pares de bases, o *DNA ladder 100 bp Bio Labs Inc*. (1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 517/500, 400, 300, 200, 100 pares de bases), para a identificação do tamanho do fragmento amplificado. A corrida é realizada em cuba de eletroforese horizontal (Life Technologies/Gibco BRL Modelos Horizon 5.8, 11.14 e Sunrise) por cerca de uma hora, a 80 V (fonte de tensão Life Technologies/Gibco BRL Modelo 250).

3.3.3 **Marcadores moleculares e amplificação de DNA**

Quatro regiões gênicas distintas foram amplificadas e utilizadas como marcadores moleculares: um fragmento do gene 16S do RNAr do genoma mitocondrial, amplificada com os primers diplo-rnl-f1 e diplo-rnl-r1 (LAVROV *et al.*, 2008); uma região do gene 28S do RNAr do genoma nuclear, com os primers 28SCallyF e 28SCallyR (LÓPEZ-LEGENTIL *et al.* 2010); um fragmento do gene da subunidade I da Citocromo c oxidase (cox1), com os primers COIPlo20F (REVEILLAUD *et al.* 2011) e HCO2198 (FOLMER *et al.* 1994); e um fragmento dos espaçadores dos genes nucleares amplificados com os primers 18Sfow e 28Srev (LOBO-HAJDU *et al.* 2004).

Os primers utilizados neste estudo estão apresentados na Tabela 06.

Tabela 06 - Conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos marcadores moleculares ao longo deste trabalho.

Marcador	Primer	Direção	Sequência 5'->3'	Referência
	diplo-rnl-f1	Senso	TCGACTGTTTACCAAAAACATAGC	Lavrov *et al.* 2008
16S	diplo-rnl-r1	Antisenso	AATTCAACATCGAGGTSGGAAAC	Lavrov *et al*. 2008
	COIPlo20F	Senso	GCTTTTGCGGGGATGATAGGTAC	Reveillaud *et al.* 2011
cox 1	HCO2198	Antisenso	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer *et al.* 1994
	28SCallyF	Senso	TGCGACCCGAAAGATGGTGAACTA	López-Legentil *et al.* 2010
28S	28SCallyR	Antisenso	CCAACACCTTTAATGGTATCTGC	López-Legentil *et al.* 2010
	18S fow	Senso	TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCG	Lobo-Hajdu *et al.* 2004
ITS	28S rev	Antisenso	GTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTT	Lobo-Hajdu *et al.* 2004

Fonte: De Paula (2013).

Cada reação de amplificação contém:

16S

- Reação de PCR: 1 U DNA polimerase GoTaq (Promega) em tampão próprio com 1,5 mM $MgCl_2$, 0,13 mM dNTP (Qiagen), 0,1 μM *primers* diplo-rnl-f1 e diplo-rnl-r1 (LAVROV *et al.*, 2008), e ~ 50 ng DNA fita molde.

- Termociclagem: uma fase inicial de desnaturação à 92ºC por 4’; 5 ciclos com desnaturação à 92ºC por 30”, pareamento à 44ºC por 45”, e extensão à 72ºC por 1’; seguido de 35 ciclos de desnaturação à 92ºC por 30”, pareamento à 51ºC por 45”, e extensão à 72ºC por 1’; e uma fase final de extensão à 72ºC por 6’.

cox1

- Reação de PCR: 1 U DNA polimerase GoTaq (Promega) em tampão próprio com 1,5 mM $MgCl_2$, 0,13 mM dNTP (Qiagen), 0,1 μM *primers* COIPlo20F (REVEILLAUD *et al.*, 2011) e HCO2198 (FOLMER *et al.*, 1994), e ~ 50 ng DNA fita molde.

- Termociclagem: uma fase inicial de desnaturação à 92ºC por 3’; 40 ciclos com desnaturação à 94ºC por 30”, pareamento à 40ºC por 30”, e extensão à 72ºC por 1’; e uma fase final de extensão à 72ºC por 5’.

28S

- Reação de PCR: 1 U DNA polimerase GoTaq (Promega) em tampão próprio com 1,5 mM $MgCl_2$, 0,13 mM dNTP (Qiagen), 0,1 μM *primers* 28SCallyF e 28SCallyR (LÓPEZ-LEGENTIL *et al.*, 2010), e ~ 50 ng DNA fita molde.
- Termociclagem: uma fase inicial de desnaturação à 94ºC por 5’; 40 ciclos com desnaturação à 95ºC por 30”, pareamento à 45ºC por 30”, e extensão à 72ºC por 2’; e uma fase final de extensão à 72ºC por 5’.

ITS

- Reação de PCR: 1 U DNA polimerase GoTaq (Promega) em tampão próprio com 1,5 mM $MgCl_2$, 0,13 mM dNTP (Qiagen), 0,1 μM *primers* 18Sfow e 28Srev (LOBO-HAJDU *et al.* 2004), e ~ 50 ng DNA fita molde.
- Termociclagem: uma fase inicial de desnaturação à 94ºC por 5’; 40 ciclos com desnaturação à 95ºC por 30”, pareamento à 52ºC por 30”, e extensão à 72ºC por 2’; e uma fase final de extensão à 72ºC por 5’.

3.3.4 **Sequenciamento, edição de sequências e alinhamento**

Aproximadamente 20 μL de produto de PCR não purificado contendo 30-200 ng, foi enviado para a *Macrogen Inc.*, Coréia do Sul, prestadora de serviços de biotecnologia, através de envio postal pela *Federal Express* (FedEx), seguindo todas as normas nacionais de envio de material biológico para o exterior.

A metodologia de sequenciamento automático simples utilizada pela *Macrogen Inc* esta descrita em sua homepage (http://www.macrogen.com/) da seguinte forma: condições de ciclagem conduzidas em *BigDyeTM terminator*, produtos de reação purificados usando precipitação por etanol, e sequenciados utilizando sequenciador automático Applied Biosystems 3730xl.

Mediante o retorno dos resultados, cada par de sequências de cada amostra, senso e antisenso, foi editado com o programa SeqMan Pro, do pacote Lasergene, da DNASTAR©. Após a edição das sequências, foi feito um BLAST com sequências depositadas no GenBank, a fim de averiguar a contaminação por outros organismos, em seguida, estas foram transferidas para o formato FASTA, e o alinhamento das sequências foi feito pelo método de alinhamento múltiplo implementado no Clustal X v2 (LARKIN *et al.*, 2007), utilizando os parâmetros-padrão do programa. Após a checagem visual do alinhamento, as regiões flanqueadoras das sequências foram excluídas do alinhamento inicial e final, para evitar erros por edição das sequências. Ainda, alteração dos parâmetros de alinhamento, e a alteração manual do alinhamento foi explorada para todos os marcadores, contudo, isto resultou em uma grande subjetividade, diminuindo a reprodutibilidade dos resultados. Dessa forma, foi preferido trabalhar apenas com os alinhamentos obtidos diretamente pelos parâmetros padrões do programa.

3.3.5 **Análise dos dados e construção das árvores de relações filogenéticas**

As relações filogenéticas foram recuperadas através do método de Neighbor-Joining (NJ) utilizando o modelo de Tamura 3-parâmetros, e o suporte de clado bootstrap estimado em 1000 réplicas. As análises de NJ foram computadas no programa MEGA 6 (TAMURA *et al.* 2013) (Figura A1, Anexo).

4 **RESULTADOS**

4.1 **Dados de Morfologia**

Material estudado. Foram arbritariamente divididos em quatro tipos: vermelho, azul, cinza e laranja; conforme sugerido por Hajdu e colaboradores (2011). Após a coleta e triagem, observou-se que os mesmos tendem a perder rapidamente a coloração, quando colocados em solução de fixação (álcool), adquirindo uma coloração bege comum a todos os morfotipos.

Descrição. Formato ereto-ramoso-tubular, com casos mais raros de formato cilíndrico–reptante. Os seus tubos podem tanto se ramificar como podem se manter fusionados (Figura 07, 08 e 09). As superfícies são repletas de cônulos, formados por espículas sustentadas por fibras de espongina, e uma reticulação nitidamente visível a olho nu. Cor bege (em álcool, Figuras 10A, 11A, 12A e 13A) e uma grande variedade *in vivo*: cinza, bege, verde, creme, azul, roxo, lilás, amarelo, laranja, vermelho e rosa (Figura 08). Ósculos apicais com diâmetro de cerca de 2 cm. Consistência compressível, facilmente rasgável.

Esqueleto. Fortemente estratificado, as fibras de espongina são preenchidas por espículas diactinais (óxeas) individuais. O esqueleto ectossomal apresenta a usual rede dupla integrada de fibras de espongina. Ao se fazer uma análise microscópica, verificou-se a existência de reticulação primária, secundária e terciária, sendo observadas em todos os quatro morfotipos (Figuras 10 a 14), fibras multiespiculadas não fasciculadas. O Ectossoma é formado por fibras primárias e secundárias, as fibras primárias tendem a apresentar uma disposição poligonal irregular, já as fibras secundárias tendem a estar entre as fibras primárias (fibras primárias com aproximadamente 40 µm, e fibra secundária com cerca de 30 µm). O Endossoma é constituído por fibras primárias (47-*59,81*-66 µm), secundárias (23-*33,14*-38 µm) e terciárias (5-*10,62*-18 µm).

Espículas. megascleras, do tipo óxeas com tamanho de 48 – 121 / 2 – 8 µm (Figuras 10 a 14, Tabela 08) e microscleras do tipo toxas, 8 a 19 µm.

Ecologia. Entre algas, corais mortos e outras esponjas; águas rasas até 15 m.

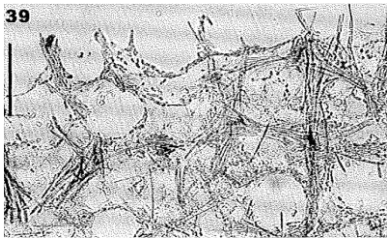
Observações. Existem 22 *Callyspongia* no WPD com ocorrência no Atlantico Tropical Ocidental (TWA, *Tropical Western Atlantic*), sao elas: *Callyspongia* (*Callyspongia*) *coppingeri* (Ridley, 1881), *Callyspongia* (*Callyspongia*) *densasclera* Lehnert & van Soest, 1999, *Callyspongia* (*Callyspongia*) *eschrichtii* Duchassaing & Michelotti, 1864, *Callyspongia* (*Callyspongia*) *fallax* Duchassaing & Michelotti, 1864, *Callyspongia* (*Callyspongia*) *laboreli* Hechtel, 1983, *Callyspongia* (*Callyspongia*) *pallida* Hechtel, 1965, *Callyspongia* (*Callyspongia*) *strongylophora* Hartman, 1955, *Callyspongia* (*Cladochalina*) *aculeata* (Linnaeus, 1759), *Callyspongia* (*Cladochalina*) *armigera* (Duchassaing & Michelotti, 1864), *Callyspongia* (*Cladochalina*) *fibrosa* (Ridley & Dendy, 1886), *Callyspongia* (*Cladochalina*) *longissima* (Duchassaing & Michelotti, 1864), *Callyspongia* (*Cladochalina*) *pergamentacea* (Ridley, 1881), *Callyspongia* (*Cladochalina*) *plicifera* (Lamarck, 1814), *Callyspongia* (*Cladochalina*) *tenerrima* Duchassaing & Michelotti, 1864, *Callyspongia* (*Cladochalina*) *vaginalis* (Lamarck, 1814), *Callyspongia* (*Cladochalina*) *villosa* (Pallas, 1766), *Callyspongia* (*Toxochalina*) *multiformis* (Pulitzer-Finali, 1986), *Callyspongia* (*Toxochalina*) *pseudotoxa* Muricy & Ribeiro, 1999, *Callyspongia arcesiosa* de Laubenfels, 1936, *Callyspongia rubiginosa* (Schmidt, 1870), *Callyspongia* (*Cladochalina*?) *subtilis* (Schmidt, 1870), e *Callyspongia* (*Toxochalina*?) *robusta* (Ridley & Dendy, 1886). Para facilitar a comparação entre espécies semelhantes, as espécies de *Callyspongia* das águas quentes do Atlantico estão apresentadas de forma resumida na Tabela 07. A maioria dos autores dos séculos XVII e XIX, como Linnaeus (1759), Duchassaing e Michelotti (1864), Schmidt (1870) e Ridley e Dendy (1886), não fornece descrições detalhadas das espécies, se atêm a caracteres da morfologia externa e raramente fornecem medidas de espículas ou de fibras e malhas. Desta forma é impossível comparar *Callyspongia sp. nov.* com as espécies descritas por esses autores. *Callyspongia* (*Cladochalina*) *vaginalis* (Lamarck, 1814) é uma espécie comum do Caribe, formando grandes tubos com uma superfície fortemente conulosa, possui fibras poliespiculares e espículas do tipo óxeas. *Callyspongia sp. nov.* é bastante diferente das *C.* (*Cl.*) *vaginalis* em forma, no tamanho das óxeas, na espessura das malhas e das fibras. *Callyspongia* (*Cladochalina*) *plicifera* (Lamarck, 1814) é outra espécie abundante no TWA, sua forma mais comum apresenta vasos com uma superfície pregueada e cor roxa em vida, possui fibras poliespiculares e espículas do tipo estrôngilos. *Callyspongia sp. nov.* difere das

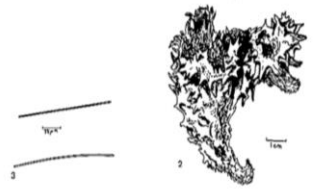
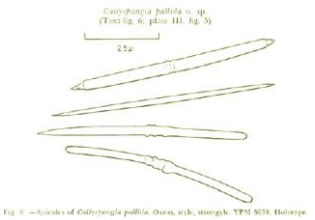
C. (*Cl.*) *plicifera* na forma, no tipo espículas, na espessura das malhas e das fibras. *Callyspongia* (*Cladochalina*) *pergamentacea* (Ridley, 1881) e *Callyspongia arcesiosa* de Laubenfels, 1936 apresentam óxeas menores do que *Callyspongia sp. nov.* e diferem na morfologia externa. *Callyspongia* (*Cladochalina*) *villosa* (Pallas, 1766) apresenta óxeas mais estreitas do que *Callyspongia sp. nov. Callyspongia* (*Callyspongia*) *densasclera* Lehnert & van Soest, 1999 apresentam óxeas mais longas do que *Callyspongia sp. nov. Callyspongia* (*Callyspongia*) *pallida* Hechtel, 1965 e *Callyspongia* (*Ca.*) *strongylophora* Hartman, 1955 diferem de *Callyspongia sp. nov.* por possuírem estrôngilos como megascleras principais. *Callyspongia* (*Toxochalina*) *multiformis* (Pulitzer-Finali, 1986) e *Callyspongia* (*T.*) *pseudotoxa* Muricy & Ribeiro, 1999 diferem de *Callyspongia sp. nov.* por possuírem toxas de maior tamanho ou duas categorias de toxas, como microscleras. As espículas e fibras de *Callyspongia sp. nov.* são semelhantes em tamanho e forma, e apresenta caracteres da morfologia externa em comum com *Callyspongia* (*Callyspongia*) *laboreli* Hechtel, 1983, mas também pode pertencer a espécie *Callyspongia* (*Callyspongia*) *coppingeri* (Ridley, 1881); apesar de ambas espécies, ao contrário de *Callyspongia sp. nov.*, a princípio, não terem toxas. Este fato pode ser devido a deficiência das descrições apresentadas.

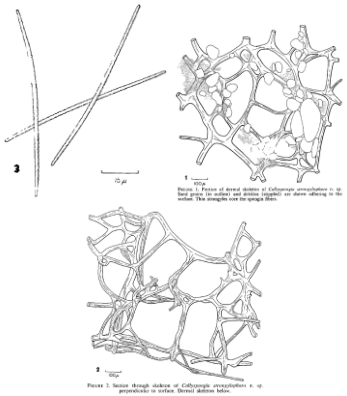
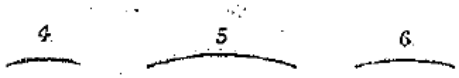
Figura 7 - *Callysponia* sp. nov. *in vivo*.

Legenda: Imagem *in situ* de uma *Callyspongia* sp. nov. que apresenta tubos cilíndricos com abertura única apical (1), superfícies repletas de cônulos (2), formados por espículas sustentadas por fibras de espongina, e uma reticulação nitidamente visível a olho nu (3).
Fonte: O autor
Foto G. Lôbo-Hajdu, 2016.

Tabela 7 - Espécies de *Callyspongia* das águas quentes do Atlantico Tropical Ocidental (TWA).

ESPÉCIE	**FIBRAS**	**MEGASCLERAS (em µm)** **ox, óxeas; esg, estrôngilos; est, estilos**	**MICROSCLERAS (em µm)** **t, toxas**	**DISTRIBUIÇÃO**	**DADOS DE MORFOLOGIA EXTERNA** **cor, forma, textura/consistência**	**ILUSTRAÇÕES**
***Callyspongia* sp. nov.**	O Ectossoma: fibras primárias (±40µm) e secundárias (±30µm), as fibras primárias tendem a apresentar uma disposição poligonal irregular, já as fibras secundárias tendem a estar entre as fibras primárias. Endossoma: fibras primárias (±59,81µm), secundárias (±33,14µm) e terciárias (±10,62µm).	Ox: 48-*82*-121 x 2-*3,7*-8	8 - 19	Brasil	Cor bege (em álcool) e uma grande variedade in vivo: cinza, bege, verde, creme, azul, roxo, lilás, amarelo, laranja, vermelho e rosa. Ósculos apicais com diâmetro de cerca de dois cm. As superfícies são repletas de cônulos, formados por espículas sustentadas por fibras de espongina, e uma reticulação nitidamente visível a olho nu. Consistência compressível, facilmente rasgável.	
Callyspongia (*Callyspongia*) *coppingeri* (Ridley, 1881)	Primárias, secundárias e intermediárias, malhas muito regulares.	Ox, 101,3 x 2,5	Não menciona	Brasil 20º42'S37º27'W	Cor âmbar (em álcool); suboval; textura elástica e macia; superfície quase lisa, um único ósculo com três mm de diâmetro.	
Callyspongia (*Callyspongia*) *densasclera* Lehnert & van Soest, 1999	Reticulação tangencial irregular de malha dupla poliespicular e pauciespicular dos tratos, ocasionalmente com espículas individuais, embebidas em espogina, contendo malhas maiores de cerca de 400-500 µm de diâmetro divididas em várias malhas menores de cerca de 100-200 µm. Fibras de 25-80 µm de diâmetro.	Ox, 184-232 x 6,5-8	Não menciona	Jamaica	Cor amarelo sujo; digitiforme; superfície lisa, mas microhíspida; consistência firme e elástica.	 corte transversal, escala = 250 µm

Callyspongia (*Callyspongia*) *eschrichtii* Duchassaing & Michelotti, 1864	Não menciona	Não menciona	Não menciona	Caribe: Saint Thomas	Cor amarelo claro; tubos anastomosados.	
Callyspongia (*Callyspongia*) *fallax* Duchassaing & Michelotti, 1864	Não menciona	Não menciona	Não menciona	Caribe: Saint Thomas	Não menciona	
Callyspongia (*Callyspongia*) *laboreli* Hechtel, 1983	Ectossoma: rede dupla de fibras de espongina. fibras grossas: 15-60 µm em diâmetro, elas encerram malhas de 200-400 µ de largura; fibras finas: 5-15 µm em diâmetro, separadas por 40-100 µm.. Endossoma: fibras 30-300 µm em diâmetro, malhas de 100->1000 µm de largura.	Esg/Ox Metade são oxeotos 69-110 x 0,8-1,6	Não menciona	Brasil	Cor castanho claro (em álcool); resiliente e facilmente rasgável; tubos cilíndricos com abertura única apical; a superfície se ergue em cônulos cônicos proeminentes.	
Callyspongia (*Callyspongia*) *pallida* Hechtel, 1965	Ectossoma: rede dupla de fibras de espongina. fibras finas: 7-30 µ em diâmetro, elas encerram malhas de 60-220 µ de largura; fibras grossas: 30-45 µ em diâmetro, separadas por 200-580 µ. Endossoma: também com rede dupla de fibras de espongina, fibras 20-75 µ em diâmetro, malhas de 300-600 µ de largura.	Ox/Esg/Est: 48-102 x 1-5; área do centrotiloto 7 x 3-5 Muricy & Ribeiro, 1999: 60-*74*-85 x 1-3,5 (N=200)	Não menciona	Port Royal (Jamaica)	Cor amarelo forte; superfície uniforme e lisa; consistência macia e elástica.	

Callyspongia (*Callyspongia*) *strongylophora* Hartman, 1955	Uma rede irregular de fibras de espongina amarelo clara, coberta com longos e finos estrôngilos. O esqueleto dérmico inclui uma rede de fibras principais, de 15 a 35 µ de diâmetro, formando malhas irregulares variando de 275x500 u a 575x700 µ de diâmetro. Dentro da rede primária, fibras secundárias, de 5 a 15 µ em largura, formam um retículo menor com malhas variando de 70x100 µ a 275x575 µ de diâmetro.	Esg, 56-79-92 x 0,9-1,5-2,4	Não menciona	Golfo de Campeche, México	Coletada com draga entre 12 e 20 metros; ramosa; cor canela (em álcool); consistência compressível, facilmente rasgável; superfície lisa.	
Callyspongia (*Cladochalina*) *aculeata* (Linnaeus, 1759)	Não menciona	Não menciona	Não menciona	Caribe	Não menciona	
Callyspongia (*Cladochalina*) *armigera* (Duchassaing & Michelotti, 1864)	Não menciona	Não menciona	Não menciona	Caribe, La Guyra	Cor amarelo acastanhado (em álcool); superfície coberta com a fina e lisa dermo-reticulação fibrosa.	
Callyspongia (*Cladochalina*) *fibrosa* (Ridley & Dendy, 1886)	Não menciona	100 x 3,2	tem	TWA: Bahia	Cor amarelo acinzentado (em álcool).	
Callyspongia (*Cladochalina*) *longissima* (Duchassaing & Michelotti, 1864) como Tuba	Não menciona	Não menciona	Não menciona	Caribe: Saint Thomas	Cor amarelada (em álcool); Simples, fistular longa, com cerca de três pés de altura e com muitos ósculos; a superfície é uma crosta muito fina e eriçada com muitos tubérculos espiniformes e agudos.	

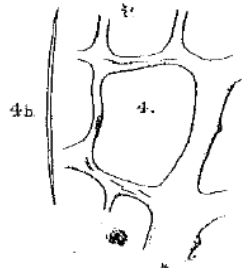
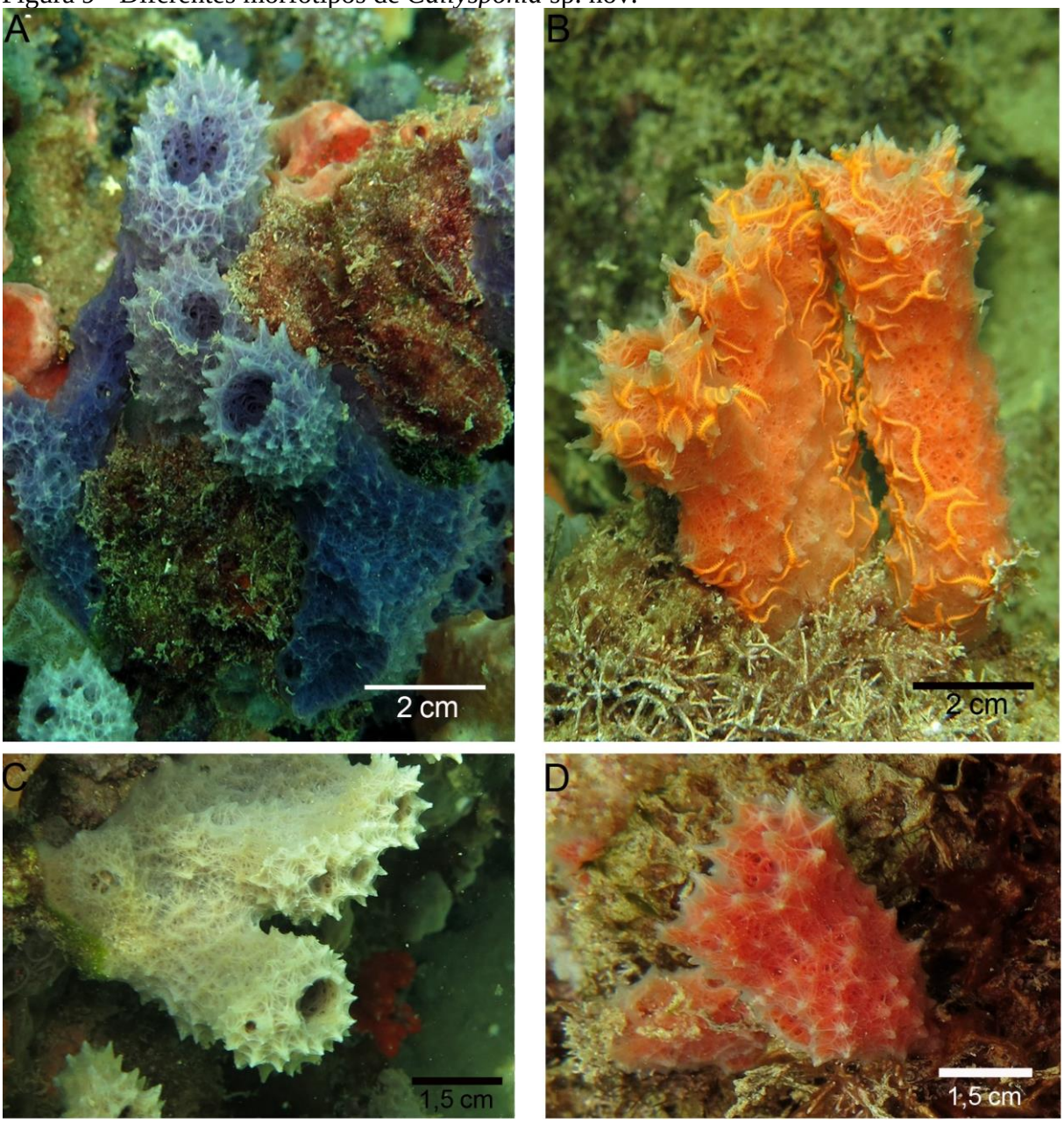
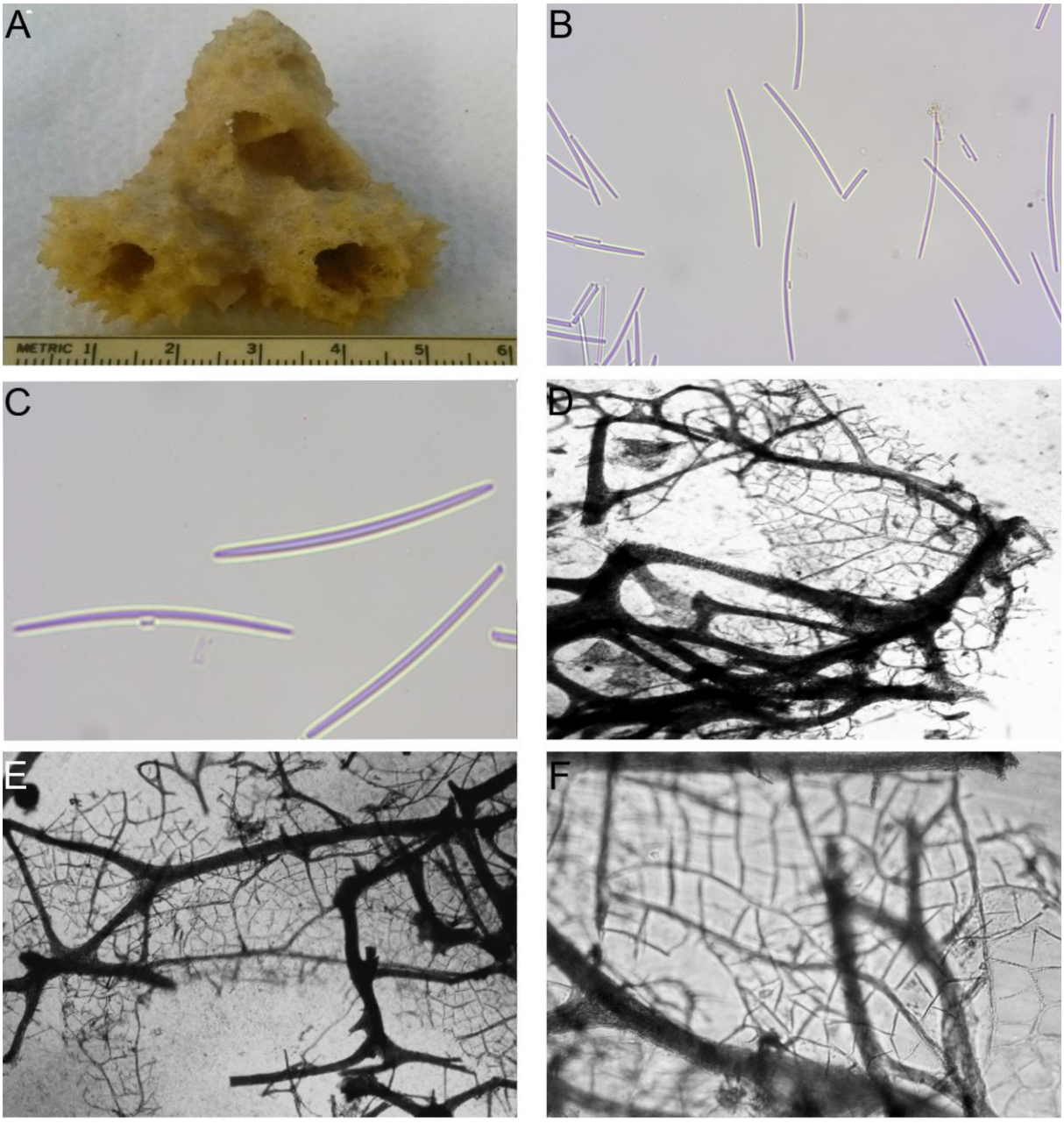
Callyspongia (*Cladochalina*) *pergamentacea* (Ridley, 1881)	Conjunto de fibras fortes, de diâmetro médio de 44,34 µm, vindas do centro, dando origem a numerosos ramos menores lateralmente, e fusionando nos ângulos retos em um conjunto robusto de fibras, que correm em paralelo com a superfície, ramificando e anastomosando de modo a formar as malhas bem abertas da superfície, e apresentando um perfil tetra ou poligonal.	Ox, 76 x 1,267	Não menciona	Brasil 17º32'S33º16'W	Cor marrom esmaecido (em álcool); subereta; textura uniforme ou finamente estriada por uma rede de fibras.	
Callyspongia (*Cladochalina*) *plicifera* (Lamarck, 1814)	Ectossoma: uma rede dupla integrada de fibras de espongina. fibras finas: 40-150 µ em diâmetro, elas encerram malhas de 150-300 µ de largura; fibras grossas: 15-30 µ em diâmetro, separadas por mais de 0,5 mm. Endossoma: também com rede dupla de fibras de espongina, fibras 40-90 µ em diâmetro, malhas de 300 µ de largura; e fibras 15-30 µ em diâmetro.	Esg, 53-100 x 1-2	Não menciona	TWA: Florida, Antilhas, Jamaica, Caribe	Cor roxa em vida; tubos cilíndricos ou em forma de vasos; consistência compressível	
Callyspongia (*Cladochalina*) *tenerrima* Duchassaing & Michelotti, 1864	Fibras muito finas	Não menciona	Não menciona	Caribe	Cor cinza; ramificada, com ramos cilíndricos.	
Callyspongia (*Cladochalina*) *vaginalis* (Lamarck, 1814) Sensu de Laubenfels, 1936	Ectossoma: fibras grossas: 30-70 µ em diâmetro, malhas de 130-400 µ de largura; fibras finas: 7-20 µ em diâmetro, malhas de 60-100 µ de largura. Endossoma: fibras 10-100 µ em diâmetro, malhas de 100-40000 µ de largura;	Ox: 35-50-70 x 2-3-4	Menciona que duvida que ocorram	Caribe	Cor lavanda brilhante ou rosada, tubos cilíndricos; consistência esponjosa.	

Figura 9 - Diferentes morfotipos de *Callysponia* sp. nov.



Legenda: Da esquerda para a direita: azul, laranja, cinza, e vermelho. Escalas em centímetros.
Fonte: O autor
Fotos Gisele Lôbo-Hajdu, montagem da prancha Thalita Belmonte, 2016.

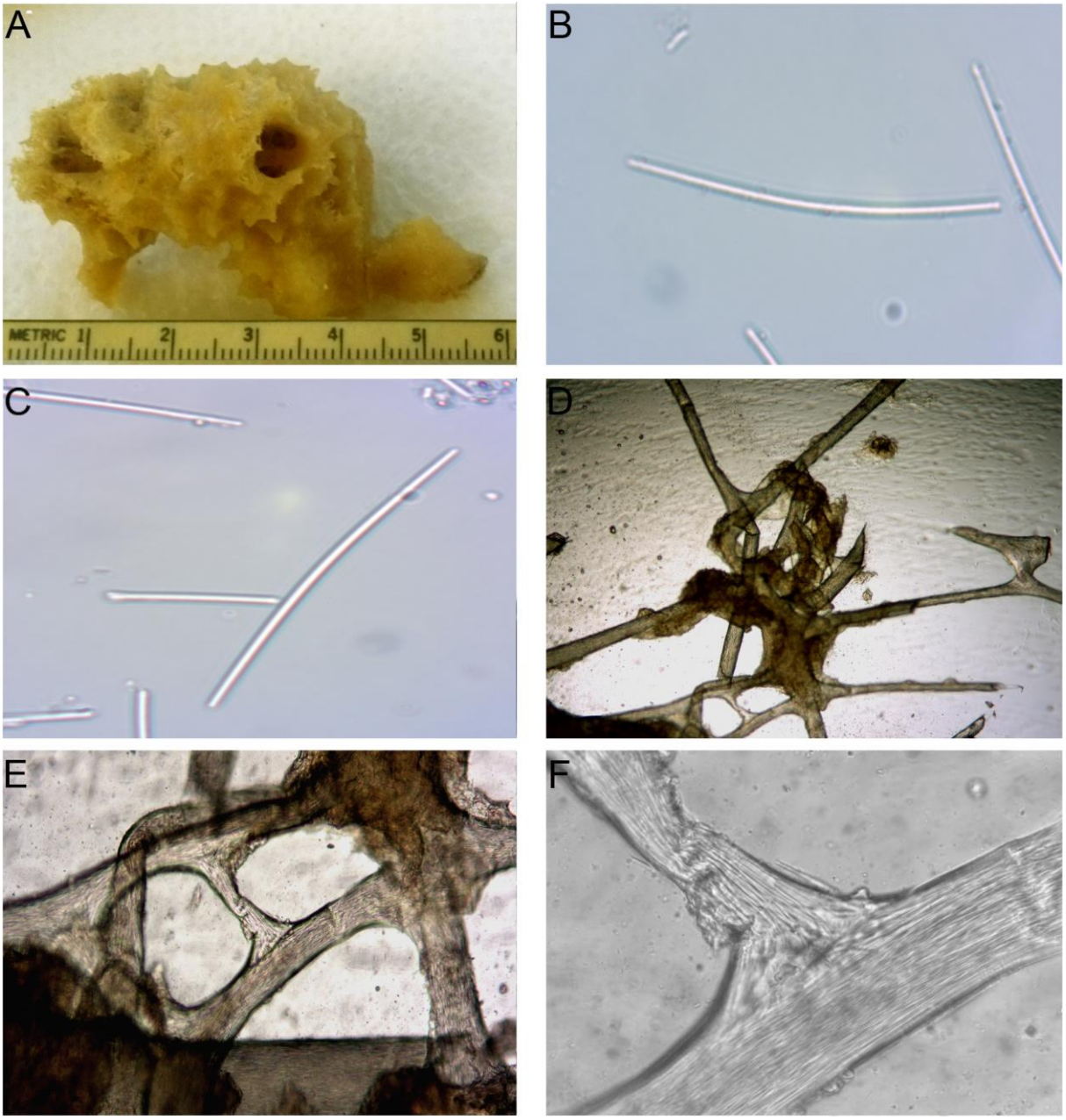
Figura 10 - Morfologia externa e interna do morfotipo azul, UERJ 923, de *Callysponia* sp. nov.



Legenda: (A) morfotipo fixado, conservado em etanol 92%. (B) e (C) espículas, óxeas observadas ao microscópio optico com objetivas de 40x e 100x de aumento. (D) e (E): cortes perpendiculares mostrando as malhas de fibras de espongina, observadas ao microscópio óptico com objetiva de 4x e (F) com objetiva 10 x de aumento. Escalas (A) = 6 cm, (B) = 10 µm, (C) = 5 µm, (D) e (E) = 100 µm e (F) = 50 µm.

Fonte: O autor, montagem da prancha Thalita Belmonte, 2016.

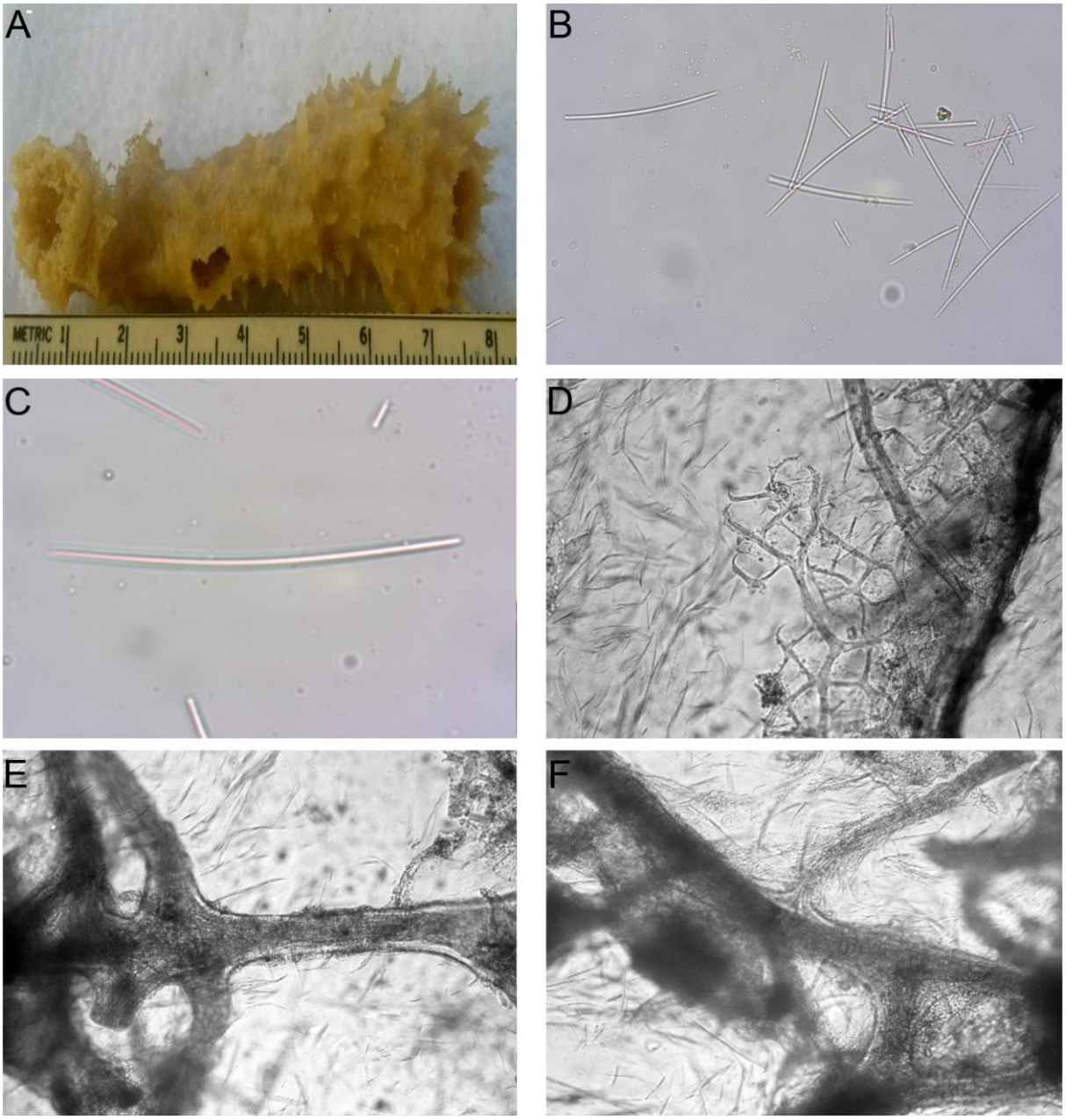
Figura 11 - Morfologia externa e interna do morfotipo laranja, UERJ 911, de *Callysponia* sp. nov.



Legenda: (A) morfotipo fixado, conservado em etanol 92%. (B) e (C) espículas, óxeas observadas ao microscópio óptico com objetiva de 40 x e 100 x de aumento. (D) a (F): cortes perpendiculares mostrando as malhas de fibras de espongina. Escalas (A) = 6 cm, (B) e (C) = 5 µm, (D) = 100 µm, (E) = 50 µm e (F) = 10 µm.

Fonte: O autor, montagem da prancha Thalita Belmonte, 2016.

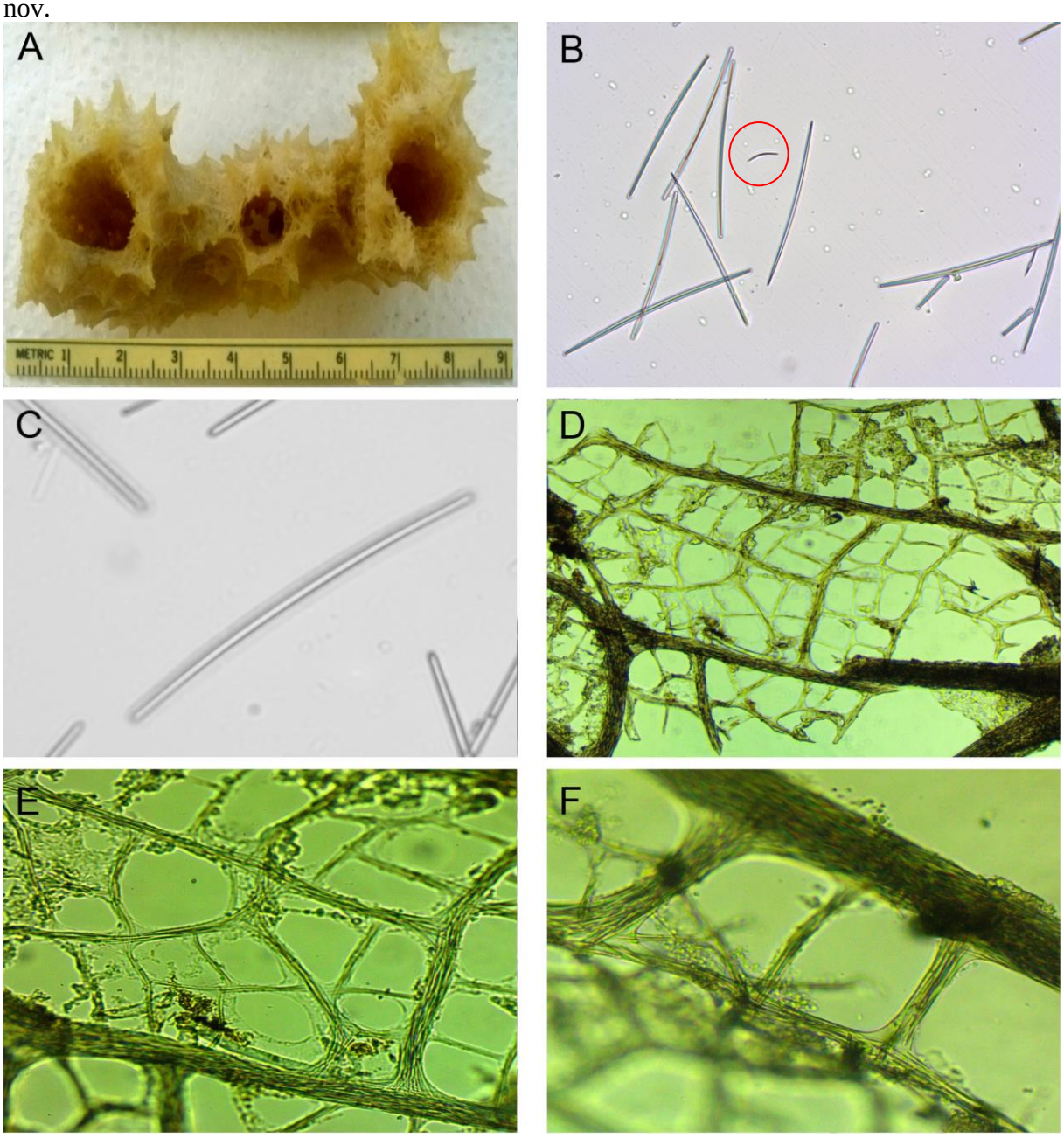
Figura 12 - Morfologia externa e interna do morfotipo cinza, UERJ 948, de *Callysponia* sp. nov.



Legenda: (A) morfotipo fixado, conservado em etanol 92%. (B) e (C) espículas, óxeas observadas ao microscópio optico com objetivas de 10 x e 40 x de aumento. (D): corte perpendicular mostrando as malhas de fibras de espongina, observadas ao microscópio óptico com objetiva de 4 x e (E) e (F) com objetiva 10 x de aumento. Escalas (A) = 8 cm, (B) = 10 µm, (C) = 5 µm, (D) = 100 µm e (E) e (F) = 50 µm.

Fonte: O autor, montagem da prancha Thalita Belmonte, 2016.

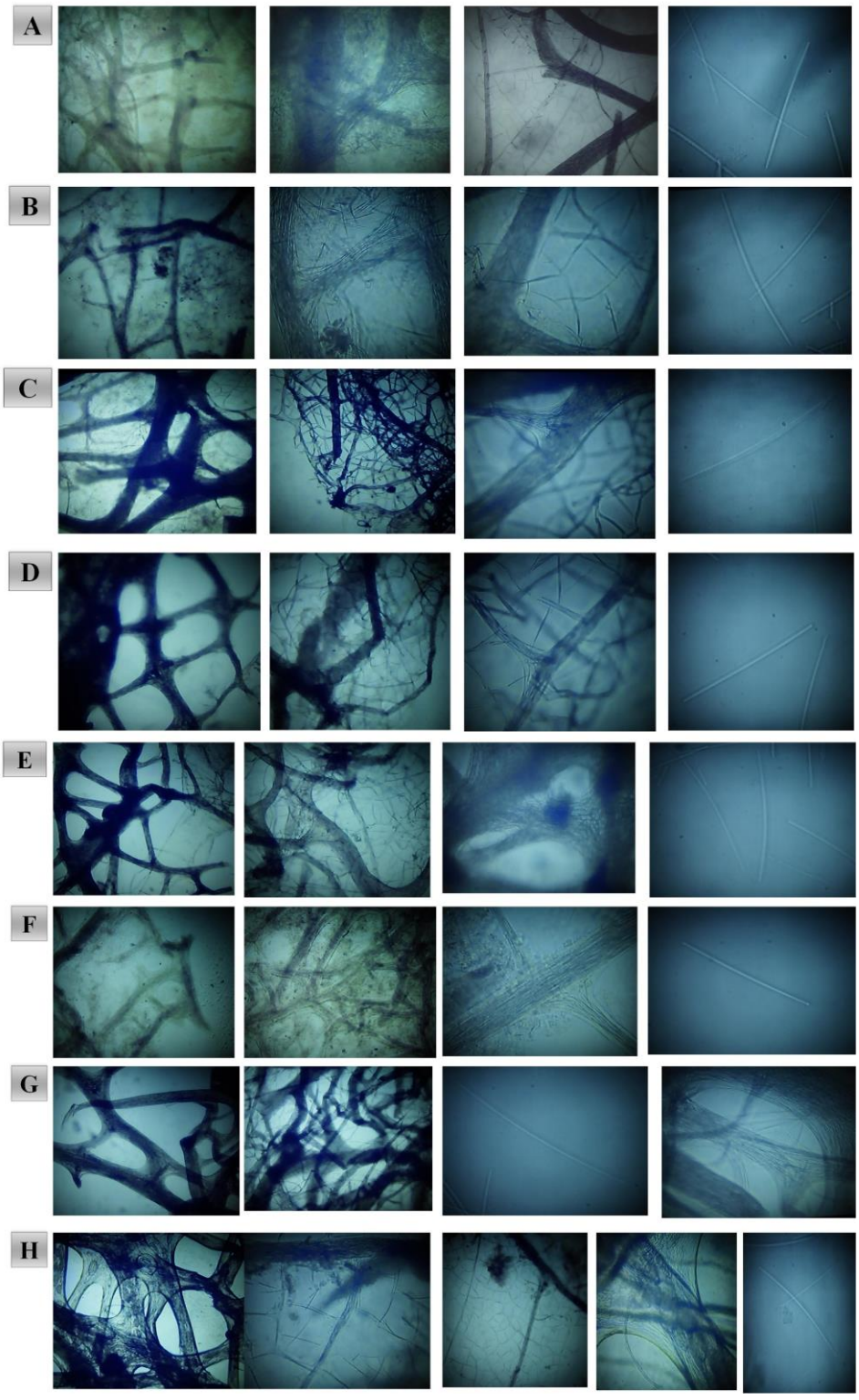
Figura 13 - Morfologia externa e interna do morfotipo vermelho, UERJ 5H, de *Callysponia* sp. nov.



Legenda: (A) morfotipo fixado, conservado em etanol 92%. (B) e (C) espículas, óxeas observadas ao microscópio óptico com objetiva de 40 x e 100 x de aumento, o círculo apresenta uma toxa. (D) cortes perpendiculares mostrando as malhas de fibras de espongina, com objetiva de 4 x, (E) cortes perpendiculares mostrando as malhas de fibras de espongina, com objetiva de 10 x e (F): cortes perpendiculares mostrando as malhas de fibras de espongina, com objetiva de 40 x. Escalas (A) = 9 cm, (B) = 10 µm, (C) = 5 µm, (D) = 100 µm, (E) = 50 µm e (F) = 10 µm.

Fonte: O autor, montagem da prancha Thalita Belmonte, 2016.

Figura 14 - Esqueleto e conjunto espicular de *Callyspongia* sp. nov.



Legenda: A: Morfotipo laranja. B-C: Morfotipo azul/roxo. D: Morfotipo azul. E: Morfotipo cinza com roxo por dentro. F-H: Morfotipo cinza, sendo F: Cinza/marrom, G: Cinza/bege, e H: Cinza/azul.
Fonte: O autor, 2014.

Tabela 8 - Dados micrométricos de espécimes de *Callyspongia* sp. nov.

UERJ	COR	COMP_MIN	COMP_MED	COMP_DP	COMP_MAX	LARG_MIN	LARG_MED	LARG_DP	LARG_MAX
910	L	71,27	68,06	8,17	104,08	2,60	2,96	0,64	5,36
911	L	67,71	84,09	14,76	103,32	2,91	4,43	1,03	5,94
912	L	84,90	74,05	9,53	121,58	3,90	4,29	1,08	5,81
957	L	63,54	68,99	9,61	104,59	2,91	3,56	0,80	5,81
958	L	61,66	74,59	9,69	119,33	2,60	3,61	0,83	5,81
920	A	67,44	73,05	10,46	120,85	2,91	3,95	1,05	6,50
921	A	67,43	87,34	11,63	115,06	2,91	4,64	0,87	6,63
922	A	51,43	58,11	12,68	94,08	2,91	2,90	0,75	5,36
923	A	59,31	66,40	11,53	108,59	3,68	3,68	0,78	6,50
924	A	66,20	67,66	10,87	112,68	2,91	4,00	1,01	6,63
926	A	65,00	71,48	10,35	109,76	3,90	4,23	0,95	6,89
927	C	67,86	85,16	10,29	102,80	3,90	4,93	0,83	7,01
928	C	59,29	63,98	8,78	97,72	2,60	3,94	1,41	8,32
929	C	79,23	102,82	10,99	121,28	3,20	3,63	0,48	4,66
930	C	80,28	106,62	11,38	120,93	3,58	5,31	0,98	6,79
931	C	68,95	92,11	12,29	116,42	3,68	5,03	0,91	7,01
932	C	72,10	84,55	9,27	102,80	2,60	4,32	0,99	5,36
933	C	56,45	81,26	12,11	103,22	2,91	4,78	1,03	6,63
934	C	67,16	99,16	14,76	120,01	2,91	4,44	1,03	5,95
935	C	79,63	105,72	9,87	118,79	2,91	4,58	0,86	6,45
936	C	76,95	99,77	10,77	114,96	3,60	4,56	0,70	6,09
938	C	78,42	100,22	9,72	119,92	3,22	4,00	0,77	5,77
939	C	86,53	104,81	10,60	121,64	3,20	4,21	0,76	6,01
940	C	81,60	101,32	8,94	112,38	2,40	3,43	0,45	3,94

UERJ	COR	COMP_MIN	COMP_MED	COMP_DP	COMP_MAX	LARG_MIN	LARG_MED	LARG_DP	LARG_MAX
941	C	80,52	88,55	7,62	100,86	2,34	3,39	0,48	4,34
942	C	80,62	88,66	7,74	101,6	2,34	3,39	0,48	4,33
943	C	52,55	81,26	12,11	103,12	2,54	3,49	0,5	4,53
944	C	52,4	83,59	13,51	102,6	3,16	4,93	0,89	5,62
945	C	79,63	105,72	9,87	118,79	2,91	4,58	0,86	6,45
946	C	76,95	99,77	10,77	114,96	3,60	4,56	0,70	6,09
947	C	78,42	100,22	9,72	119,92	3,22	4,00	0,77	5,77
948	C	86,53	104,81	10,60	121,64	3,20	4,21	0,76	6,01
949	C	81,60	101,32	8,94	112,38	2,40	3,43	0,45	3,94
1085	V	80,52	88,55	7,62	100,86	2,34	3,39	0,48	4,34
1086	V	80,62	88,66	7,74	101,6	2,34	3,39	0,48	4,33
1087	V	52,55	81,26	12,11	103,12	2,54	3,49	0,5	4,53
1088	V	52,4	83,59	13,51	102,6	2,05	3,21	0,58	4,75

Legenda: Valores (mínimo-média-máximo, desvio-padrão) de comprimento e largura em micrômetros; n=30. Onde: UERJ = numero de tombo, COMP_MIN = comprimento minimo, COMP_MED = comprimento médio, COMP_DP = desvio-padrão do comprimento, COMP_MAX = comprimento máximo, LARG_MIN = largura minima, LARG_MED = largura média, LARG_DP = desvio-padrão da largura, e LARG_MAX = largura maxima. Cores: L = laranja, A = azul, C = cinza, V = vermelho.
Fonte: O autor, 2016.

4.1.2 **Análises estatísticas dos caracteres morfológicos**

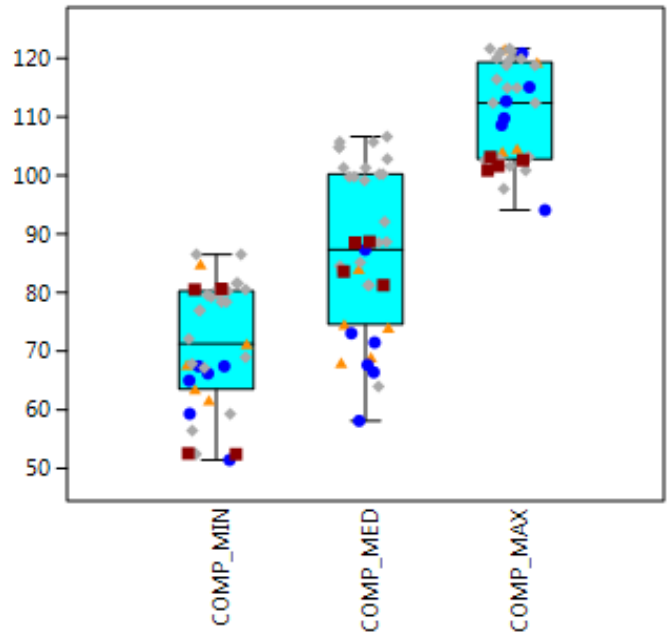
As Figuras 14 a 19 apresentam as análises estastísticas das medidas dos comprimentos e larguras das óxeas dos diferentes morfotipos de *Callyspongia* sp. nov.

Figura 15 - MANOVA das medidas dos comprimentos das espículas de *Callyspongia* sp. nov.

Wilks´ lambda:	0.226	**Pillai trace:**	0.9033
df1:	9	**df1:**	9
df2:	75.6	**df2:**	99
***F*:**	7.075	***F*:**	4.739
***p* (same):**	2.348E-07	***p* (same):**	3.011E-05

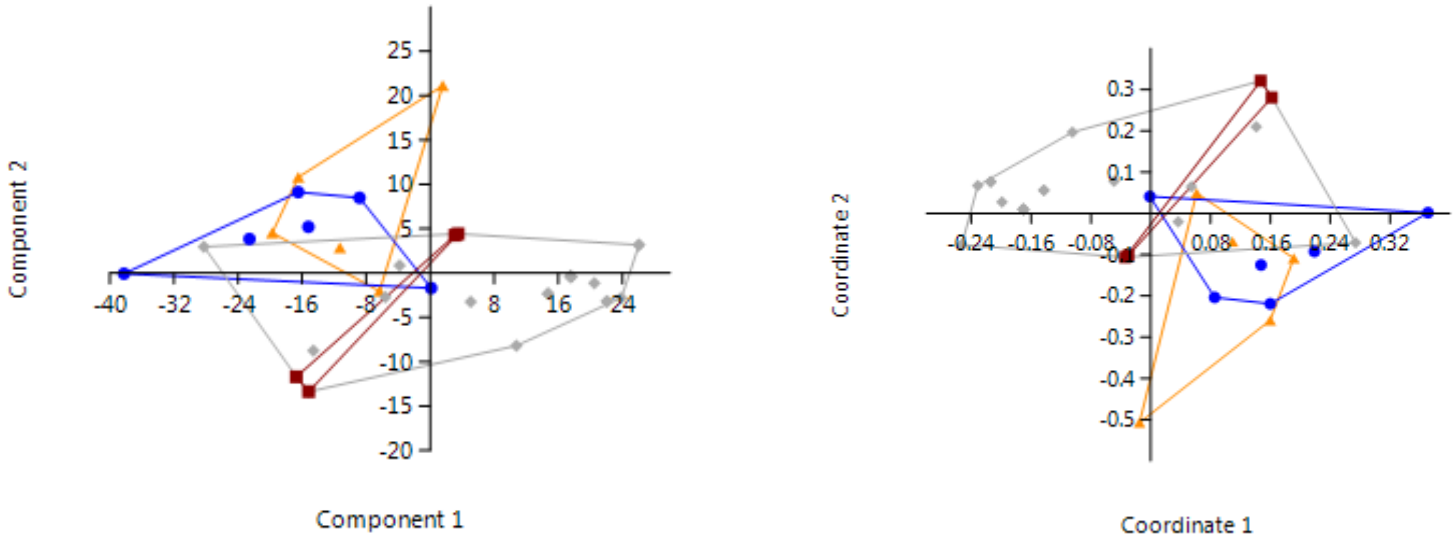
Legenda: Settings do programa PAleontological STatistics 3.13 (PAST).
Fonte: O autor, 2016.

Figura 16 - *Box jitter plot* das medidas dos comprimentos das espículas (óxeas) de *Callyspongia* sp. nov.



Legenda: onde: COMP_MIN = comprimento minimo, COMP_MED = comprimento médio, e COMP_MAX = comprimento maximo. Cada cor (forma) representa um morfotipo: azul (círculos), cinza (losangos), laranja (triângulos) e vermelho (quadrados).
Fonte: O autor, 2016.

Figura 17 - PCA e PCoA das medidas dos comprimentos das espículas (óxeas) de *Callyspongia* sp. nov.



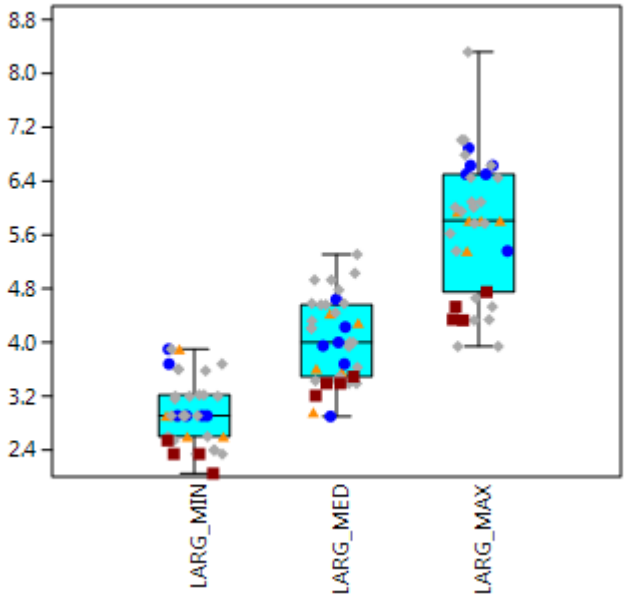
Legenda: Scatter plots das medidas dos comprimentos das espículas, onde: A) PCA, e B) PCoA. Cada cor (forma) representa um morfotipo: azul (círculos), cinza (losangos), laranja (triângulos) e vermelho (quadrados).
Fonte: O autor, 2016.

Figura 18 - MANOVA das medidas das larguras das espículas de *Callyspongia* sp. nov.

Wilks´ lambda:	0.4706	Pillai trace:	0.6201
df1:	9	df1:	9
df2:	75.6	df2:	99
F:	3.049	F:	2.866
p (same):	0.003636	p (same):	0.004783

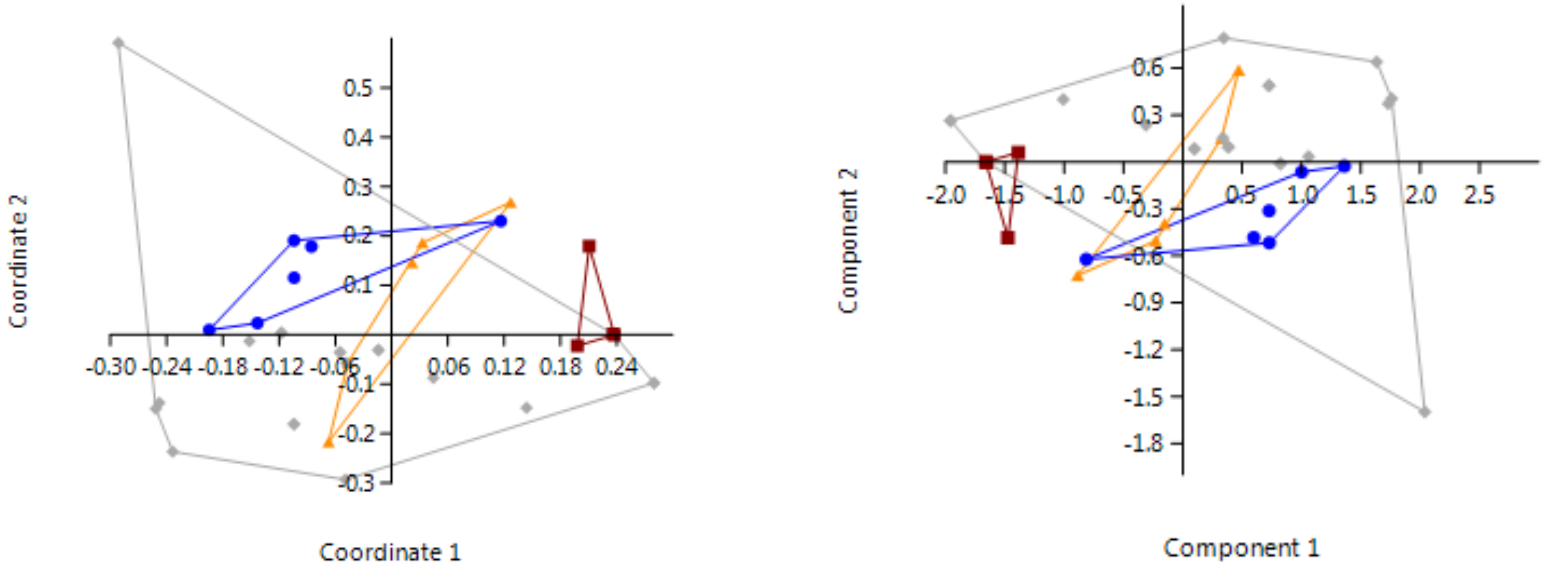
Legenda: Settings do programa PAleontological STatistics 3.13 (PAST).
Fonte: O autor, 2016.

Figura 19 - *Box jitter plot* das medidas das larguras das espículas (óxeas) de *Callyspongia* sp. nov.



Legenda: onde: LARG_MIN = largura minima, LARG_MED = largura média, e LARG_MAX = largura maxima. Cada cor (forma) representa um morfotipo: azul (círculos), cinza (losangos), laranja (triângulos) e vermelho (quadrados).
Fonte: O autor, 2016.

Figura 20 - PCA e PCoA das medidas das larguras das espículas (óxeas) de *Callyspongia* sp. nov.



Legenda: Scatter plots das medidas das larguras das espículas, onde: A) PCA, e B) PCoA. Cada cor (forma) representa um morfotipo: azul (círculos), cinza (losangos), laranja (triângulos) e vermelho (quadrados).
Fonte: O autor, 2016.

4.2 **Dados de Moléculas**

4.2.1 **Extração de DNA**

Ao todo 109 extrações foram realizadas, e todas as amostras apresentaram diferentes níveis de degradação do DNA, nenhum se apresentando de modo integro, porém algumas fornecendo condições aceitáveis para a realização do PCR.

4.2.2 **Amplificação do DNA por Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

Mais de 430 reações de amplificação pela técnica de PCR foram realizadas. Uma boa parte destas falhou em amplificar as regiões desejadas, nas condições utilizadas, seja pela amplificação não ter ocorrido, ou por ter amplificado múltiplas regiões. Somente 205 amplificações, as que produziram uma única banda de amplificação (Tabela 09 de amostras que obtiveram resultado positivo para a reação de PCR e amostras que foram enviadas para o sequenciamento), em uma concentração aceitável (acima de 30 ng/μL) foram enviadas para sequenciamento. Para conseguir amplificar as amostras trabalhadas, varias modificações de protocolo foram feitas, como alterações na diluição do DNA, bem como nas concentrações dos reagentes, e nas condições de termociclagem. No total, 72 amostras foram enviadas para seqüenciamento.

Tabela 9 - Esforço amostral realizado para a amplificação de três marcadores: ITS, 16S RNAr e cox1. O X representa as amostras que obtiveram resultado positivo para a reação de PCR e que foram enviadas para o seqüenciamento.

	PCR			Sequenciamento		
MNRJ	**ITS**	**16S**	**cox1**	**ITS**	**16S**	**cox1**
1641	X					
1642						
1648						
1693						
1819						
1824						
1946	X					
2023						
2086						
2469						
2482						
2484	X			X		
2574	X		X	X		
2730						
2750						
2752						
2759						
2769						
2777						
2805						
3041						
3042						
3164						
3195						
3827						
3852	X					
3869	X			X		
3874	X					
4266	X					
4291	X			X		
5376	X			X		
5386	X	X	X	X	X	
5410	X	X		X	X	
5412	X		X			
6447						
7084	X			X		
7093	X		X	X		
8100						

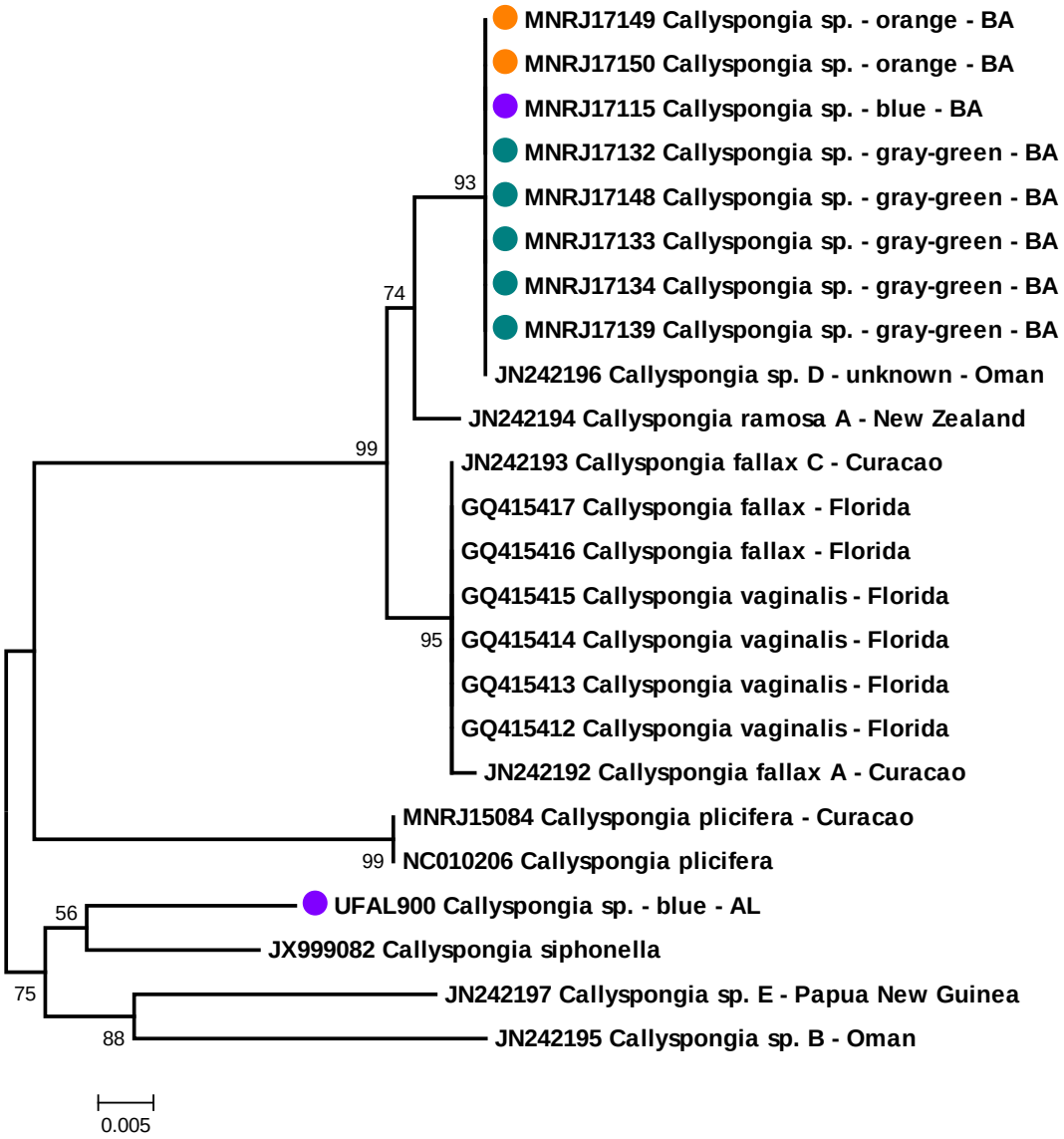
8321	X			X		
8476						
8676						
10545	X		X			
12592	X	X	X	X	X	
13540	X	X	X	X	X	
14890	X	X	X			
15031	X		X	X		
15047	X	X	X	X	X	
15088	X	X	X	X	X	
15089	X	X	X	X	X	X
15145	X	X	X	X	X	
15158	X	X	X	X	X	
15170	X	X	X	X	X	
17098	X		X			
17099	X		X			
17100	X		X			
17101	X		X			
17102	X					
17103	X	X	X	X		
17104	X	X	X			
17105	X	X	X			
17106	X	X	X			
17107	X	X	X			
17108	X	X	X			
17109	X	X	X			
17110	X	X	X			
17111	X	X	X			
17112	X	X	X			
17113	X	X	X	X	X	
17114	X	X	X	X	X	
17115	X	X		X	X	X
17116	X	X	X			
17117	X	X	X		X	
17118	X	X		X	X	
17119	X	X	X			
17120	X	X	X			
17121	X	X	X			
17122	X	X	X			
17123	X	X	X			
17124	X	X	X			
17125	X	X	X			
17126	X		X			
17127	X		X			

17128	X		X			
17129	X		X			
17130	X		X			
17131	X	X	X			
17132	X	X	X	X	X	X
17133	X	X	X	X	X	X
17134	X	X	X	X	X	X
17135	X	X	X			
17136	X	X				
17137	X	X	X			
17138	X	X	X			
17139	X	X	X	X	X	X
17140	X	X	X		X	
17141	X	X	X			
17145	X	X				
17146	X	X				
17147	X	X	X	X	X	
17148	X	X	X	X	X	X
17149	X	X	X	X	X	X
17150	X	X	X	X	X	X
UFAL797	X	X	X			
UFAL808	X		X	X		
UFAL827	X		X	X		
UFAL831	X			X		
UFAL833	X			X		
UFAL897	X	X	X	X		
UFAL900	X	X	X	X		X

4.2.3 **Relações Filogenéticas**

A Figura 21 apresenta árvore que ilustra a relação filogenética entre *Callyspongia* sp. nov. com outras espécies cogenéricas obtidas a partir do marcador molecular cox1 contendo 24 sequências. Nesta árvore podemos observar que todos os espécimes de *Callyspongia* sp. nov. estão localizados em um mesmo clado independente da coloração, apresentando 93% de robustez, estando agrupados junto com estas o espécime JN242196 de *Callyspongia* sp. de coloração indefinida proveniente de Oman (Oriente Médio) (dados do espécime foram obtidos no GeneBank).

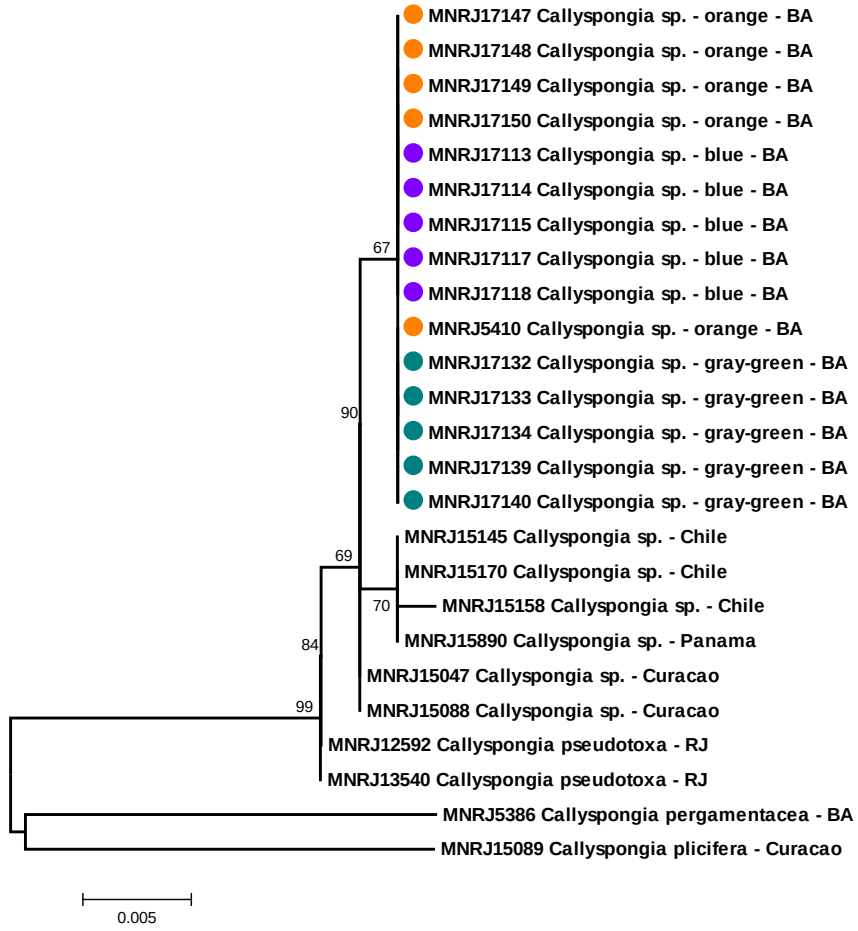
Figura 21 - Relação filogenetica entre *Callyspongia* sp. nov. com outras espécies cogenéricas.



Legenda: Reconstrução baseada no marcador molecular cox1. Topologia reconstruída através do método de *Neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura 3-parâmetros e 1000 repetições de *Bootstrap*. O morfotipo, cor e a localidade de amostras são apresentados.
Fonte: Mariana Ventura Alves (2015).

A Figura 22 apresenta árvore que ilustra a relação filogenética entre *Callyspongia* sp. nov. com outras espécies cogenericas obtida a partir de do marcador molecular 16S contendo 25 sequências. Nesta árvore podemos observar que todos os espécimes de *Callyspongia* sp. nov. estão localizados em um mesmo clado independente da coloração, apresentando 67% de suporte (*bootstrap*).

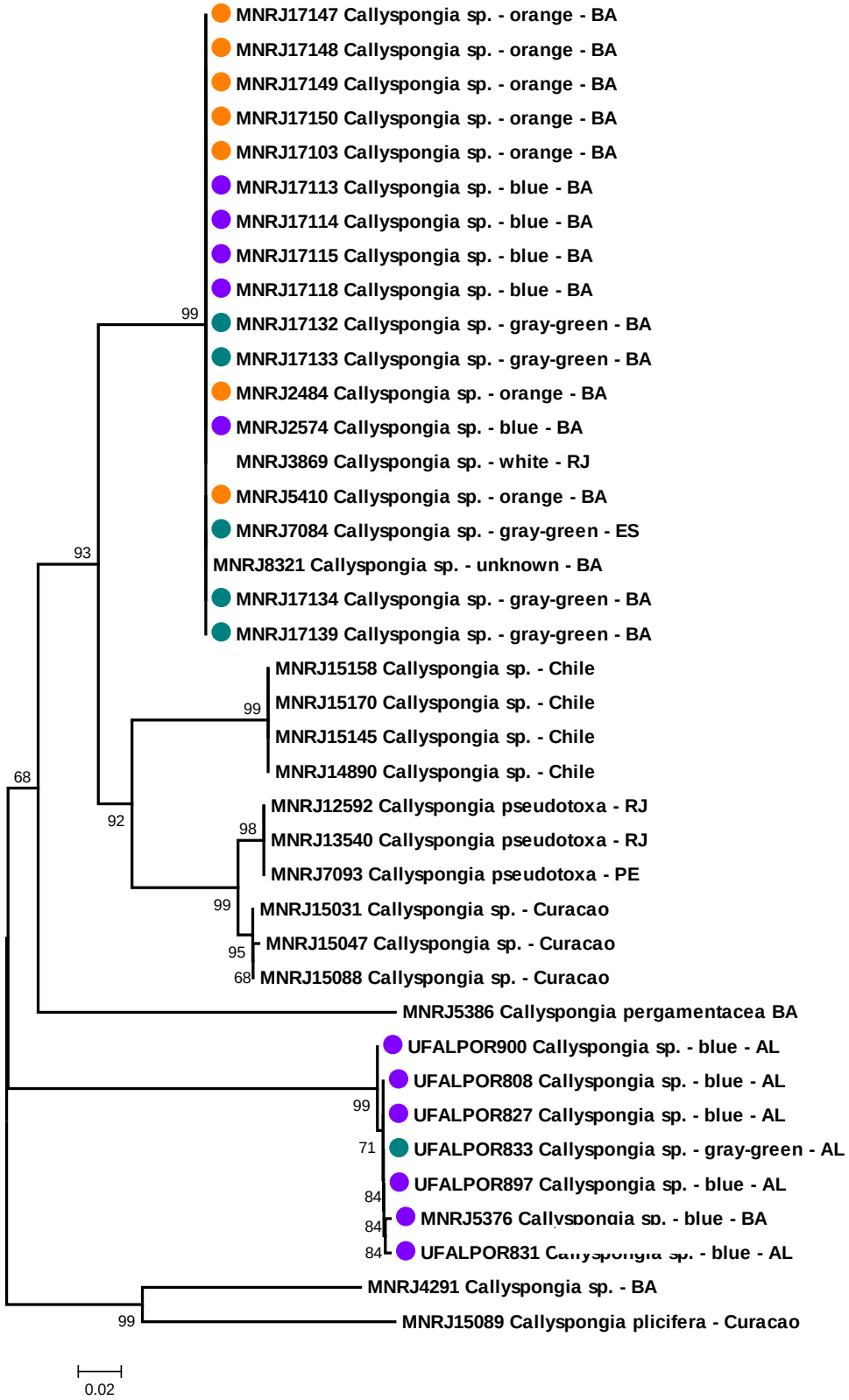
Figura 22 - Relação filogenetica entre *Callyspongia* sp. com outras espécies cogenéricas.



Legenda: Reconstrução baseada no marcador molecular 16S. Topologia reconstruída através do método de *Neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura 3-parâmetros e 1000 repetições de *Bootstrap*. O morfotipo, cor e a localidade de amostras são apresentados.
Fonte: Mariana Ventura Alves (2015).

A Figura 23 apresenta árvore que ilustra a relação filogenética entre *Callyspongia* sp. nov. com outras espécies congenéricas obtida a partir dos marcadores moleculares ITS1 e ITS2 contendo 39 sequências. Nesta árvore podemos observar que todos os espécimes de *Callyspongia* sp. nov. estão localizados em um mesmo clado independente da coloração, apresentando 99% de robustez. Situados no mesmo clado estão também o espécime MNRJ3869 *Callyspongia* sp. de coloração branca proveniente do Rio de Janeiro; MNRJ 8321 *Callyspongia* sp.de coloração indefinida (oriunda de coleta distintas das demais *Callyspongia* sp. nov. presentes no clado apresentado) proveniente da Bahia e o espécime MNRJ 7083 *Callyspongia* sp. proveniente do Espírito Santo. Um espécime erroneamente identificado como *Callyspongia* sp. azul agrupou separadamente dos demais, no entanto, MNRJ 5376 é uma *Callyspongia vaginalis*, coletada em 2002, e proveniente de Abrolhos Bahia. Todas as amostras de *Callyspongia* sp. de Alagoas foram recuperadas juntas em um clado distinto.

Figura 23 - Relação filogenética entre *Callyspongia* sp. com outras espécies cogenéricas.



Legenda: Reconstrução baseada no marcador molecular ITS1 e ITS2. Topologia reconstruída através do método de *Neighbor-joining*, usando o modelo de Tamura 3-parâmetros e 1000 repetições de *Bootstrap*. O morfotipo, cor e a localidade de amostras são apresentados no código de cor. Fonte: Mariana Ventura Alves (2015).

5 DISCUSSÃO

Todas as análises realizadas com os marcadores moleculares, sejam eles ITS, 16S ou cox1 demonstraram que os indivíduos de *Callyspongia* sp. nov. analisados devem ser dispostos em um mesmo clado, independente da cor dos morfotipos. Além de geneticamente iguais, os espécimes são também morfologicamente indistinguíveis. Os morfotipos de *Callyspongia* sp. nov. não apresentam nenhum tipo de variação significativa quanto a sua morfologia externa, ou interna, seja no que concerne ao tamanho, espessura ou composição espicular e/ou fibras de espongina. Os resultados obtidos na análise morfológica e molecular determinam que a variabilidade na coloração é um caso de polimorfismo natural desta espécie.

Nos resultados apresentados nas análises estatísticas dos quatro morfotipos de cor de *Callyspongia* sp. nov. pôde-se concluir haver um elevado grau de similaridade. Utilizando a Análise multivariada da variância (MANOVA - *Multivariate Analysis of Variance*) na análise das medidas das óxeas dos quatro morfotipos verificou-se que, tanto o comprimento das óxeas (F = 7,075; GL = 9; P = 2,35), quanto a largura das óxeas (F = 3,05; GL = 9; P = 0,0036), demonstram uma sobreposição dos valores, não sendo possível separar grupos distintos. Utilizando os métodos estatísticos Análise de componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*) e Análise de coordenadas principais (PCoA - *Principal Coordinates Analysis*) (Figuras 16 e 19) tanto no comprimento, quanto na largura das espículas, verificou-se que há um alinhamento entre os morfotipos. O agrupamento dos morfotipos também pode ser observado no gráfico criado pelo *Box Jitter* plot (Figuras 15 e 18).

O conjunto dos dados morfológicos aponta uma similaridade entre *Callyspongia* sp. nov. e *Callyspongia* (*Callyspongia*) *laboreli* Hechtel, 1983. Seria interessante conferir o tipo, que se encontra no *Yale Peabody Museum of Natural History* (YPM, Yale University, New Haven, Connecticut, USA), apesar que, possivelmente, apenas para maiores detalhes morfológicos, como mais detalhamento das micrometrias e busca das toxas. Visto que amostras mais antigas costumam ser fixadas em formol, o que dificulta a extração de um DNA genômico de qualidade para a amplificação de marcadores moleculares.

Embora a espécie seja apresentada por Hajdu e colaboradores (2011) como (provisoriamente) endêmica de Salvador (BA), ao gerarmos a árvore baseada no marcador cox1 observamos um espécime de Oman no mesmo clado das demais *Callyspongia* sp. nov.

Em uma filogenia no nível de Ordem realizada por Redmond e colaboradores (2011) usando sequências do final 5' de cox1, indivíduos de *C. vaginalis* e *C. fallax* de Lopez-Legentil e colaboradores (2010) foram agrupados em cluster, um espécime de *C. vaginalis* de Itskovich e colaboradores (2007) agrupou com uma esponja de uma subordem diferente, a esponja gigante, *Xestospongia muta*, e uma *C. armigera* de Erpenbeck e colaboradores (2007) agrupou em conjunto com *C. vaginalis* de DeBiasse e colaboradores (2010). Estes padrões filogenéticos podem ser explicados pela evolução lenta do cox1 em esponjas, identificação errônea de espécimes ou plasticidade fenotípica (DEBIASSE e HELLBERG 2015).

O uso de marcadores moleculares foi considerado como uma ferramenta fundamental para reorganizar espécies de *Callyspongia* do Caribe, pois o uso somente de características morfológicas, externas ou internas não foi suficiente para separar os organismos em diferentes linhagens, como relatado no trabalho de DeBiasse e Hellberg (2015) e DeBiasse e colaboradores (2014). Apesar de *Callyspongia armigera, C. longissima, C. eschrichtii,* e *C. vaginalis* possuírem grande variedade quanto a sua morfologia externa, não se observa diferença na morfologia espicular. Dados combinados de sequência de diferentes tipos de marcadores genéticos (COI, 28S, e genes nucleares que expressam as proteínas mep e filamina), que evoluem em velocidades diferentes, foram utilizados para delimitar espécies de *Callyspongia*. Chegou-se a conclusão de que das espécies descritas para o Caribe, somente três, *Callyspongia fallax, C. tenerrima* e *C. plicifera* são monofiléticas, enquanto que *C. armigera, C. longissima, C. eschrichtii,* e *C. vaginalis* aparecem em várias posições nas árvores. Os resultados morfológicos e moleculares desta tese são congruentes com os resultados encontrados por DeBiasse e Hellberg (2015).

A variação de cor de morfotipos é bastante comum nas espécies do gênero *Callyspongia*, caso semelhante ao apresentado por *Callyspongia* sp. nov. é relatado no trabalho de López-Legentil e colaboradores (2010) para a espécie *Callyspongia vaginalis*. Esta se apresenta em três cores diferentes: laranja, vermelho e cinza. Os estudos genéticos realizados com os marcadores cox1, 16S, 28S e 18S, indicaram que não há variabilidade genética entre os três morfotipos estudados. Estes dados corroboram com os resultados do presente trabalho, apresentando o gênero em questão como portador de ampla variabilidade intra-especifica. Assim como nesta tese, López-Legentil e colaboradores (2010) notificou que o gene 16S do DNAmt foi o marcador molecular mais variável para *Callyspongia*, apresentando uma variabilidade de nucleotídeos mais elevada do que a relatada por cox1. Na verdade, poucos estudos têm relatado falta de variabilidade genética em espécies simpátricas

que diferem na cor e forma (por exemplo: SOLÉ-CAVA e THORPE 1986, BOURY-ESNAULT *et al.* 1992). No estudo, de López-Legentil e colaboradores (2010) não havia nenhuma evidência genética de diferenciação consistente entre os três morfotipos de *C. vaginalis* e *C. fallax* para os marcadores moleculares utilizados.

O estudo realizado por Loh e colaboradoes (2012), com quatro mofotipos de *Mycale laevis*, uma demosponja da ordem Poecilosclerida, para os marcadores 18S e 28S, revelou que, embora não haja diferenças genéticas significativas entre as variantes, os mesmos apresentam diferenças de cor, e o padrão de espículas variou de acordo com a localidade da coleta. Porém, é comum encontrarmos variantes de uma espécie vivendo em simpatria, isso indica que não apenas o ambiente pode ser o desencadeador das diferenças fenotípicas, mas que a variação, que está presente no genoma (BARBIERI *et al.* 1995, JACOBS e PODOLSKY, 2010, LÓPEZ-LEGENTIL *et. at*. 2010, DONIA *et al.* 2011a,b, FRECKELTON, *et at.* 2012, LOH *et. al*. 2012) pode se manifestar de maneira desconexa com as influências ambientais.

Os marcadores utilizados neste trabalho indicam que a variação de cor entre os indivíduos de *Callyspongia* sp. constitui apenas variação fenotípica Considerando que analisamos apenas três marcadores (cox1, 16S e ITS), não podemos descartar a possibilidade de que outros marcadores venham a apresentar um resultado diferente. Outra possibilidade seria a utilização de outros caracteres, como embriológicos, bioquímicos e/ou fisiológicos.

Recomenda-se que sejam feitas análises integradas, como, por exemplo, no trabalho de Freckelton e colaboradores (2012), que adota-se uma abordagem metabolômica e de estudo de comunidade de microorganismos simbiontes, simultaneamente com utilização de dados moleculares para distinguir morfotipos de uma mesma espécie. No artigo de Freckelton e colaboradores (2012), os dados genéticos utilizando os marcadores cox1 e ITS não diferenciaram os morfotipos, apenas os dados das comunidades simbiônticas e dos perfis metabólicos conseguiram distinguir claramente os morfotipos amarelo e roxo da esponja *Ianthella basta*.

Seguindo este caminho, estudos preliminares utilizando a espectrometria de Raman, realizados pela colaboradora do LGMar, Profa. Dra. Lenize Fernandes Maia, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), indicam a presença de carotenóides, e que a composição destes e de pigmentos associados podem ser diferentes nos morfotipos (Figura A2, Anexo). Os experimentos testes estão em andamento e farão parte da publicação final da tese.

CONCLUSÕES

- Os aspectos morfológicos e métricos não foram suficientes para separar os morfotipos analisados.
- Os morfotipos de *Callyspongia* sp. nov. foram descritos. Os espécimes apresentam formato ereto tubular, com superfícies repletas de cônulos e uma reticulação visível a olho nu. A coloração apresenta uma grande variedade in vivo. O esqueleto é fortemente estratificado, as fibras de espongina sao preenchidas por espículas diactinais, do tipo óxeas, e apresenta a rede dupla integrada de fibras de espongina típica do gênero, o ectossoma é formado por fibras primárias e secundárias. As fibras primárias possuem cerca de 40 µm, e as fibras secundárias, cerca de 30 µm. O endossoma é constituído por fibras primárias 47-59,81-66 µm, secundárias 23-33,14-38 µm e terciárias 5-10,62-18 µm. As megascleras, do tipo óxeas, tem tamanhos de 48 – 121 x 2 – 8 µm e as microscleras, do tipo toxas, de 8 a 19 µm.
- A partir das análises, foram geradas três árvores de relação filogenética, para os respectivos marcadores cox1, 16S, e ITS. Todas reconstruídas através do método de Neighbor-Joining, usando o modelo de Kimura 3-parâmetros e 1000 repetições de *Bootstrap*. Todas as árvores recuperaram *Callyspongia* sp. nov. como sendo uma única espécie.
- O presente trabalho concluiu que *Callyspongia* sp. nov. apresenta-se como uma única espécie com elevada plasticidade morfológica.
- *Callyspongia* sp. nov possivelmente é uma espécie nova.

.

REFERÊNCIAS

ABDO DA, MCDONALD JI, HARVEY ES, FROMONT J, KENDRICK GA. 2008. Neighbour and environmental influences on the growth patterns of two temperate Haliclonid sponges. Marine and Freshwater Research, 59: 304–312.

ADDIS JS, PETERSON KJ. 2005. Phylogenetic relationships of freshwater sponges (Porifera, Spongillina) inferred from analyses of 18S rDNA, COI mtDNA, and ITS2 rDNA sequences. Zoologica Scripta, 34: 549–557.

ALVES MV. 2015. Plasticidade fenotípica de *Callyspongia* sp. (Duchassaing & Michelotti, 1864) (Porifera, Demospongiae) da costa de Salvador, Bahia. 75f. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Formação de Professores. Orientadora: Profª Drª Gisele Lôbo Hajdu.

ANDREAKIS N, LUTER HM, WEBSTER NS. 2012. Cryptic speciation and phylogeographic relationships in the elephant ear sponge *Ianthella basta* (Porifera, Ianthellidae) from northern Australia. Zoological Journal of the Linnean Society, 166: 225-235.

AVILA E, RIOSMENA-RODRIGUEZ R, HINOJOSA-ARANGO G. 2013. Sponge-rhodolith interactions in a subtropical estuarine system. Helgoland Marine Research, 67(2): 349-357.

BARBIERI M, BAVESTRELLO G, SARÀ, M. 1995. Morphological and ecological differences in two electrophoretically detected species of *Cliona* (Porifera, Demospongiae). Biological Journal of the Linnean Society, 54: 193–200.

BARUCCA M, AZZINI F, BAVESTRELLO G, BISCOTTI MA, CALCINAI B, CANAPA A, CERRANO C, OLMO E. 2007. The systematic position of some boring sponges (Demospongiae, Hadromerida) studied by molecular analysis. Marine Biology, 151: 529–535.

BAVESTRELLO G, SARÀ M. 1992. Morphological and genetic differences in ecologically distinct populations of *Petrosia* (Porifera, Demospongiae). Biol. Journal of the Linnean Society, 47: 49–60.

BAVESTRELLO G, BONITO M, SARÀ M. 1993. Influence of depth on the size of sponge spicules. Scientia Marina, 57: 415–420.

BAVESTRELLO G, CALCINAI B, CECCATI L, CERRANO C, SARA M. 2000. Skeletal development in two species of *Tethya* (Porifera, Demospongiae). Italian Journal of Zoology, 67: 241-244.

BELL JJ. 2004. Evidence for morphology-induced sediment settlement prevention on the tubular sponge *Haliclona urceolus*. Marine Biology, 146: 29–38.

BELL JJ. 2008. The functional roles of marine sponges. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 79: 341–353.

BELL JJ, BARNES DKA. 2000a. The influences of bathymetry and flow regime upon the morphology of sublittoral sponge communities. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 80(4): 707-718.

BELL JJ, BARNES DKA. 2000b. The distribution and prevalence of sponges in relation to environmental gradients within a temperate sea lough: vertical cliff surfaces. Diversity and Distributions, 6: 283-303.

BELL JJ, BARNES DKA. 2000c. The distribution and prevalence of sponges in relation to environmental gradients within a temperate sea lough: inclined cliff surfaces. Diversity and Distributions, 6(6): 305-323.

BELL JJ, BARNES DKA. 2000d. A sponge diversity within a 'marine island'. In: Jones MB, Azevedo JMN, Neto AI, Costa AC, Martins AMF. (eds), Island, Ocean and Deep-Sea Biology. Developments in Hydrobiology, 152, pp. 55-64, Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1982-7_6.

BELL JJ, BARNES DKA. 2001. Sponge morphological diversity: A qualitative predictor of species diversity? Aquatic conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 11: 109–121.

BELL JJ, BARNES DKA. 2002a. Modelling sponge species diversity using a morphological predictor: a tropical test of a temperate model. Journal for Nature Conservation, 10(1): 41-50.

BELL JJ, BARNES DKA. 2002b. The relationship between sedimentation, flow rates, depth and time at Lough Hyne Marine Nature Reserve. The Irish Naturalists' Journal, 27: 106-116.

BELL JJ, SMITH D. 2004. Ecology of sponge assemblages (Porifera) in the Wakatobi region, south-east Sulawesi, Indonesia: richness and abundance. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 84: 581–591.

BELL JJ, BARNES DKA, TURNER JR. 2002a. The importance of micro and macro morphological variation in adaptation of a sublittoral demosponge to current extremes. Marine Biology, 140: 75-81.

BELL JJ, BARNES DKA, SHAW C. 2002b. Branching dynamics of two species of arborescent demosponge: the effect of flow regime and bathymetry. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 82: 279–294.

BELL JJ, BURTON M, BULLIMORE B, NEWMAN PB, LOCK K. 2006. Morphological monitoring of subtidal sponge assemblages. Marine Ecology Progress Series, 311: 79–91.

BENZIE JAH, SANDUSKY C, WILKINSON CR. 1994. Genetic structure of dictyoceratid sponge populations on the western Coral Sea reefs. Marine Biology, 119: 335-345.

BERGQUIST, PR. Sponges. Hutchinson e Co, Londres. 268, 1978.

BERTOLINO M, CERRANO C, BAVESTRELLO G, CARELLA M, PANSINI M, CALCINAI B. 2013. Diversity of Porifera in the Mediterranean coralligenous accretions, with description of a new species. Zookeys, 27(336): 1-37. doi: 10.3897/zookeys.336.5139. eCollection.

BIDDER GP. 1923. The relation of the form of a sponge to its currents. Journal of Cell Science, 2(266): 293-324. https://doi.org/10.1242/jcs.s2-67.266.293.

BLANQUER A, URIZ M-J. 2007. Cryptic speciation in marine sponges evidenced by mitochondrial and nuclear genes: A phylogenetic approach. Molecular Phylogenetics and Evolution, 45: 392-397.

BLANQUER A, URIZ M-J. 2008. ‘A posteriori’ searching for phenotypic characters to describe new cryptic species of sponges revealed by molecular markers (Dictyonellidae: Scopalina). Invertebrate Systematics, 22: 489–502.

BOND C., HARRIS AK. 1988. Locomotion of sponges and its physical mechanism. Journal of Experimental Zoology, 246(3): 271-284.

BLAXTER M, FLOYD R. 2003. Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. Trends in Ecology and Evolution, 18: 268-269.

BOURY-ESNAULT N, RÜTZLER K. 1997. Thesaurus of sponge morphology. Smithsonian Contributions to Zoology, 596: 1-55.

BOURY-ESNAULT N, SOLÉ-CAVA AM. 2004. Recent contribution of genetics to the study of sponge systematics and biology. BMIB-Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici, Univ. Genova, 68: 3-18.

BOURY-ESNAULT N, SOLÉ-CAVA AM, THORPE JP. 1992. Genetic and cytological divergence between colour morphs of the Mediterranean sponge *Oscarella lobularis* Schmidt (Porifera, Demospongiae, Oscarellidae). Journal of Natural History, 26: 271-284.

BRADSHAW A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. Advances in Genetics, 13: 115-155.

BURTON M. 1947. XVIII. - The significance of size in sponges. Annals and Magazine of Natural History, 14(111): 216-220.

BUSS L.W. 1979. Habitat selection, directional growth, and spatial refuges: why colonial animals have more hiding places. Biology and systematics of colonial organisms, pp. 459-497.

BYRNE M., SEWELL M. A., PROWSE T. A. A. 2008. Nutritional ecology of sea urchin larvae: influence of endogenous and exogenous nutrition on echinopluteal growth and phenotypic plasticity in *Tripneustes gratilla*. Functional Ecology 2008, 22, 643–648. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01427.x

CALCINAI B., BAVESTRELLO G., BERTOLINO M., PICA D., WAGNER D., CERRANO C. 2013. Sponges associated with octocorals in the Indo-Pacific, with the description of four new species. Zootaxa, 3617: 1-61. doi: 10.11646/zootaxa.3617.1.1.

CARBALLO JL, AGUILAR-CAMACHO J.M., KNAPP I.S., BELL J.J., 2013. Wide distributional range of marine sponges along the Pacific Ocean. Marine Biology Research, 9: 768-775, http://dx.doi.org/10.1080/17451000.2013.765581.

CARBALLO J.L., AVILA E., ENRIQUEZ S., CAMACHO L., 2006. Phenotypic plasticity in a mutualistic association between the sponge *Haliclona caerulea* and the calcareous macroalga Jania adherens induced by transplanting experiments. I: Morphological responses of the sponge. Marine Biology, 148: 467-478.

CÁRDENAS P, PEREZ T, BOURY-ESNAULT N. 2012. Sponge systematics facing new challenges. Advances in Marine Biology, 61: 81–201.

CARDONE F, GAINO E, CORRIERO G. 2010. The budding process in *Tethya citrina* Sarà & Melone (Porifera, Demospongiae) and the incidence of post-buds in sponge population maintenance. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 389: 93–100.

CAVALCANTI FF, ZILBERBERG C, KLAUTAU M. 2007. Seasonal variation of morphological characters of *Chondrilla* aff. *nucula* (Porifera: Demospongiae) from the south-east coast of Brazil. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 87: 1727–1732.

CRUZ-BARRAZA JA, CARBALLO JL, ROCHA-OLIVARES A, EHRLICH H, HOG M. 2012. Integrative Taxonomy and Molecular Phylogeny of Genus *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific. PLoS ONE 7(8): e42049. doi:10.1371/journal.pone.0042049.

DAILIANIS T, TSIGENOPOULOS CS, DOUNAS C, VOULTSIADOU E. 2011. Genetic diversity of the imperilled bath sponge *Spongia officinalis* Linnaeus, 1759 across the Mediterranean Sea: patterns of population differentiation and implications for taxonomy and conservation. Molecular Ecology, 20: 3757-3772.

DAMATO ME, CORACH D. 1996. Genetic diversity of populations of the freshwater shrimp *Macrobrachium borelli* (Cardidea, Palaemonidae) evaluated by RAPD analysis. Journal of Crustacean Biology, 16(4): 650-655.

DEBIASSE MB, HELLBERG ME. 2015. Discordance between morphological and molecular species boundaries among Caribbean species of the reef sponge *Callyspongia*. Ecology and Evolution, 5(3): 663–675.

DEBIASSE MB, NELSON B, HELLBERG M. 2014. Evaluating summary statistics used to test for incomplete lineage sorting: mito-nuclear discordance in the reef sponge *Callyspongia vaginalis*. Mol. Ecol., 23: 225–238.

DEBIASSE MB, RICHARDS V, SHIVJI M. 2010. Genetic assessment of connectivity in the common reef sponge, *Callyspongia vaginalis* (Demospongiae: Haplosclerida) reveals high population structure along the Florida reef tract. Coral Reefs, 29: 47–55.

de LAUBENFELS MW. 1936. A Discussion of the Sponge Fauna of the Dry Tortugas in Particular and the West Indies in General, with Material for a Revision of the Families and Orders of the Porifera. Carnegie Institute of Washington Publication. 467 (Tortugas Laboratory Paper 30) 1-225, pls 1-22.

DE PAULA TS. 2013. Filogenia molecular, evolução de características morfológicas, variabilidade populacional, biogeografia e metabolômica comparativa: rumo a uma biologia integrativa para o gênero *Mycale Gray*, 1867 (Porifera). 2013. 2 v. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

DE PAULA TS, ZILBERBERG C, HAJDU E, LOBO-HAJDU G. 2012. Morphology and molecules on opposite sides of the diversity gradient: four cryptic species of the *Cliona celata* (Porifera, Demospongiae) complex in South America revealed by mitochondrial and nuclear markers. Molecular Phylogenetics and Evolution, 62: 529–41.

DESQUEYROUX-FAÚNDEZ R, VALENTINE C. 2002. Family Callyspongiidae de Laubenfels, 1936. In: Hooper JNA van Soest RWM (eds). Systema Porifera: a guide to the classification of sponge. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nova Iorque; Springer, Boston, MA. Pp. 835-851.

DONIA MS, FRICKE WF, PARTENSKY F, COX J, ELSHAHAWI SI, WHITE JR, PHILLIPPY AM, SCHATZ MC, PIEL J, HAYGOOD MG, RAVEL J, SCHMIDT EW. 2011a. Complex microbiome underlying secondary and primary metabolism in the tunicate-*Prochloron* symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(51): E1423-E1432.

DONIA MS, FRICKE WF, RAVEL J, SCHMIDT EW. 2011b. Variation in tropical reef symbiont metagenomes defined by secondary metabolism. PLoS One. 6:e17897.

DUCHASSAING de Fonbressin P, MICHELOTTI G. 1864. Spongiaires de la mer Caraibe. Natuurkundige verhandelingen van de Hollandsche maatschappij der wetenschappen te Haarlem. 21(2): 1-124, pls I-XXV

DUNCAN EJ, GLUCKMAN PD, DEARDEN PK. 2014. Epigenetics, plasticity, and evolution: how do we link epigenetic change to phenotype? Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 322(4): 208-220.

DURAN S, RÜTZLER K. 2006. Ecological speciation in a Caribbean marine sponge. Molecular Phylogenetics and Evolution, 40: 292–297.

ELVIN DW. 1972. Effect of germanium upon development of siliceous spicules of some fresh-water sponges. Experimental Cell Research, 72(2): 551-553.

ENRÍQUEZ S, ÁVILA E, CARBALLO JL. 2009. Phenotypic plasticity induced in transplant experiments in a mutualistic association between the red alga *Jania adhaerens* (Rhodophyta, Corallinales) and the sponge *Haliclona caerulea* (Porifera: Haplosclerida): morphological responses of the alga. Journal of Phycology, 45 (1): 81-90, doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00640.x.

ERPENBECK D, WÖRHEIDE G. 2007. On the molecular phylogeny of sponges (Porifera). Zootaxa, 1668: 107–126.

ERPENBECK D, BREEUWER JAJ, PARRA-VELANDIA FJ, VAN SOEST RWM, 2006. Speculation with spiculation? Three independent gene fragments and biochemical characters versus morphology in demosponge higher classification, Molecular Phylogenetics and Evolution, 38: 293-305.

ERPENBECK D, DURAN S, RÜTZLER K, et al. 2007. Towards a DNA taxonomy of Caribbean Demosponges: a gene tree reconstructed from partial mitochondrial CO1 gene sequences supports previous rDNA phylogenies and provides a new perspective on the systematics of Demospongiae. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 87: 1563–1570.

ERPENBECK D, MCCORMACK GP, BREEUWER JAJ, VAN SOEST RWM, 2004. Order level differences in the structure of partial LSU across demosponges (Porifera): new insights into an old taxon. Molecular Phylogenetics and Evolution, 32: 388–395.

ERWIN PM, THACKER RW. 2007. Phylogenetic analyses of marine sponges within the order Verongida: a comparison of morphological and molecular data. Invertebrate Biology, 126: 220-234.

ESCOBAR D, ZEA S, SÁNCHEZ JA. 2012. Phylogenetic relationships among the Caribbean members of the *Cliona viridis* complex (Porifera, Demospongiae, Hadromerida) using nuclear and mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 64 (2): 271–284.

FAITH DP. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. Biological Conservation, 61: 1-10.

FASSINI D, PARMA L, WILKIE IC, BAVESTRELLO G, BONASORO F, CARNEVALI MDC. 2012. Ecophysiology of mesohyl creep in the demosponge *Chondrosia reniformis* (Porifera: Chondrosida). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 428: 24–31.

FOLMER O, HOEH W, BLACK M, LUTZ R, VRIJENHOEK R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(5): 294-299.

FRECKELTON ML, LUTER HM, ANDREAKIS N, WEBSTER NS, MOTTI CA. 2012. Qualitative variation in colour morphotypes of *Ianthella basta* (Porifera: Verongida). Hydrobiologia, 687(1): 191-203.

GAINO E, MACONI R, PRONZATO R. 1995. Organizational plasticity as a successful conservative tactic in sponges. Animal Biology, 4: 31-43.

GALETTI M, DONATTI C, PIZO MA, GIACOMINI H. 2008. Big fish are the best: seed dispersal of *Bactris glaucescens* by the pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in the Pantanal, Brazil. Biotropica 40, 386–389.

GUARDIOLA M, FROTSCHER J, URIZ M. 2016. High genetic diversity, phenotypic plasticity, and invasive potential of a recently introduced calcareous sponge, fast spreading across the Atlanto-Mediterranean basin. Mar Biol, 163:123 doi 10.1007/s00227-016-2862-6.

GRANT RE. 1836. Animal Kingdom. Volume 1, pp. 107-118. In: Todd, RB (Ed.), The Cyclopaedia of Anatomy and Physiology. Sherwood, Gilbert e Piper: pp. 813.

HAJDU E, BERLINCK RGS, FREITAS JC. 1999. Porifera. Capítulo 4, pp. 21-30. In: MIGOTTO AE, TIAGO CG (Eds.), Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX, (3): Invertebrados marinhos. FAPESP, São Paulo.

HAJDU E, MURICY G, BERLINCK RGS, FREITAS JC. 1996. Marine porifean diversity in Brasil: through knowledge to management, pp. 157-171. In: BICUDO CEM, MENEZES NA (Eds.), Biodiversity in Brazil, a First Approach. CNPq, São Paulo.

HAJDU E, PEIXINHO S, FERNANDEZ JCC. 2011. Esponjas Marinhas da Bahia. Guia de Campo e Laboratório. Rio de Janeiro: Museu Nacional, pp. 276.

HAMDOUN AM, CHENEY DP, CHERR GN. 2003. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. The Biological Bulletin, 205(2): 160-169.

HARTMAN WD. 1955. A collection of sponges from the west coast of the Yucatan Peninsula with descriptions of two new species. Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean, 5 (3): 161-189.

HARTMAN WD. 1958. Natural history of the marine sponges of southern New England. Bulletin of the Peabody Museum of Natural History, 12: 1-155.

HAYE PA, SALINAS P, ACUÑA E, POULIN E. 2010. Heterochronic phenotypic plasticity with lack of genetic differentiation in the southeastern Pacific squat lobster *Pleuroncodes monodon*. Evolution & Development, 12(6): 628-634.

HECHTEL GJ. 1965. A systematic study of the Demospongiae of Port Royal, Jamaica. Bulletin of the Peabody Museum of Natural History. 20: 1-103.

HECHTEL GJ. 1983. New species of marine Demospongiae from Brazil. Iheringia (Zoologia). 63: 58-89.

HENTSCHEL E. 1929. Die Kiesel-und Hornschwämme des Nördlichen Meeres. Fauna Artica, 5: 859–1042.

HILL MS, HILL AL. 2002. Morphological plasticity in the tropical sponge *Anthosigmella varians*: responses to predators and wave energy. Biological Bulletin, 202: 86-95.

HOOPER JNA. 2000. Sponguide: guide to sponge collection and identification. http://www.qmuseum.qld.gov.au/naturewelcome ["sponges", "download sponge classification"]

HOOPER JNA, VAN SOEST RWM. 2002. Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York, USA Vol.1.

HOOPER JNA, CAPON RJ, KEENAN CP, PARRY DL. 1991. Morphometric and biochemical differences between sympatric populations of the *Clathria spicata* species complex (Demospongiae: Poecilosceridа: Microcionidae) from northern Australia. In: Reitner J, Keupp H (eds) Fossil and recent sponges. Springer-Verlag, Berlin, p 271–288.

HOSHINO S, SAITO DS, FUJITA T, 2008. Contrasting genetic structure of two Pacific Hymeniacidon species. Hydrobiologia, 603: 313–326.

ITSKOVICH V, BELIKOV S, EFREMOVA S, et al. 2007. Phylogenetic relationships between freshwater and marine Haplosclerida (Porifera, Demospongiae) based on the full length 18S rRNA and partial COXI gene sequences. Pp. 383–391. In: CUSTÓDIO MR, LÔBO-HAJDU G, HAJDU E, MURICY G (eds.) Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. Museu Nacional, Rio de Janeiro, 694 p.

JACOBS MW, RD PODOLSKY. 2010. Variety is the spice of life histories: comparison of intraspecific variability in marine invertebrate. Integrative and Comparative Biology, 50(4): 630-642.

JORGENSEN CB. 1944. On the spicule-formation of *Spongilla lacustris* (L.) 1. The dependence of the spicule-formation on the content of dissolved and solid silicic acid of the milieu. Det Kgl Danske Vidensks Selsk Biol Medd, 19: 2–45.

KAANDORP JA. 1999. Morphological analysis of growth forms of branching marine sessile organisms along environmental gradients. Marine Biology, 134(2): 295-306.

KLAUTAU M, RUSSO CA, LAZOSKI C, BOURY-ESNAULT N, THORPE JP, SOLÉ-CAVA AM. 1999. Does cosmopolitanism result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. Evolution, 53:1414-1422.

KLAUTAU M, SOLÉ-CAVA AM, BOROJEVIC R. 1994. Biochemical Systematics of sibling sympatric species of *Clathrina* (Porifera" Calcarea). Biochemical Systematics and Ecology, 22: 367-375.

KLÖPPEL A, PUTZ A, PFANNKUCHEN M, FRITZ G, JAKLIN A, PROKSCH P, BRÜMMER F. 2009. Depth profile of *Aplysina* ssp.: Morphological, histological and biochemical aspects and their role in species distinction. Marine Biodiversity, 39: 121–129.

KNAPP IS, FORSMAN ZH, WILLIAMS GJ, TOONEN RJ, BELL JJ. 2015. Cryptic species obscure introduction pathway of the blue Caribbean sponge (*Haliclona* (*Soestella*) *caerulea*), (Order: Haplosclerida) to Palmyra Atoll, Central Pacific. PeerJ, 3:e1170; doi 10.7717/peerj.1170.

KNOWLTON N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. Hydrobiologia, 420: 73–90.

LAMARCK J-B de. 1814 [1813]. Sur les polypiers empâtés. Annales du Museum national d'Histoire naturelle. 20: 294-312; 370-386; 432-458.

LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG. 2007. ClustalW2 and ClustalX version 2. Bioinformatics, 23: 2947-2948.

LAVROV DV, WANG X, KELLY M. 2008. Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 49: 111–124.

LAZOSKI C, SOLÉ-CAVA AM, BOURY-ESNAULT N, KLAUTAU M, RUSSO CA. 2001. Cryptic speciation in a high gene flow scenario in the oviparous marine sponge *Chondrosia reniformis*. Marine Biology, 139: 421–429.

LEAL MC, PUGA J, SERODIO J, GOMES NCM, CALADO R. 2012. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades—where and what are we bioprospecting. PLoS One, 7:e30580.

LEHNERT H, VAN SOEST RWM. 1999. More North Jamaican deep fore-reef sponges. Beaufortia, 49 (12): 141-169.

LESSER MP, SLATTERY M. 2013. Ecology of Caribbean sponges: are top-down or bottom-up processes more important? PLoS One, 8(11): e79799. doi:10.1371/journal.pone.0079799.

LINNAEUS C. 1759. Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus II. Editio decima, reformata. pp. [1-4], 825-1384. Holmiæ. (L. Salvii).

LÔBO-HAJDU G. 2006. Dados morfológicos *versus* dados moleculares em sistemática: controvérsia ou congruência? p. 197-218. In: GALLO V, BRITO PM, SILVA HMA, FIGUEIREDO FJ (eds.), Paleontologia de Vertebrados: Grandes Temas e Contribuições Científicas, Pp. 356, ISBN: 85-7193-133-X.

LÔBO-HAJDU G, MANSURE JJ, SALGADO A, HAJDU E, MURICY G, ALBANO RM, 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis can reveal intraspecific evolutionary patterns in Porifera. Memoirs of the Queensland Museum, 44: 317-328.

LÔBO-HAJDU, G, GUIMARÃES, ACR, SALGADO, A, LAMARÃO FRM, VIEIRALVES, T, MANSURE, JJ, ALBANO, RM. 2004. Intragenomic, intra and interspecific variation in the rDNA ITS of Porifera revealed by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). BMIB-Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici, Univ. Genova, 68: 413-423.

LOH TL, PAWLIK JR. 2009. Bitten down to size: Fish predation determines growth form of the Caribbean coral reef sponge *Mycale laevis*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 374: 45–50.

LOH TL, PAWLIK JR. 2011. Sponges rising: Sponge communities shift in response to reduced predation pressure. Benthic Ecology Meeting, Mobile, Alabama, 16-20.

LOH TL, LEGENTIL SL, SONG B, PAWLIK JR. 2012. Phenotypic variability in the Caribbean Orange Icing sponge *Mycale laevis* (Demospongiae: Poecilosclerida). Hydrobiologia, 687: 205–217, doi 10.1007/s10750-011-0806-1.

LÓPEZ-LEGENTIL S, TURON X. 2005. How do morphotypes and chemotypes relate to genotypes? The colonial ascidian *Cystodytes* (Polycitoridae). Zoologica Scripta, 34: 3–14.

LÓPEZ-LEGENTIL S, ERWIN PM, HENKEL TP, LOH TL, PAWLIK JR. 2010. Phenotypic plasticity in the Caribbean sponge *Callyspongia vaginalis* (Porifera: Haplosclerida). Scientia Marina, 74(3): 445-453.

MALDONADO M, YOUNG CM. 1998. Limits on the bathymetric distribution of keratose sponges: a field test in the deep water. Marine Ecology Progress Series, 174: 123-139.

MALDONADO M, CARMONA MC, URIZ MJ, CRUZADO A. 1999. Decline in Mesozoic reef-building sponges explained by silicon limitation. Nature, 401: 785–788.

MANCONI R, PRONZATO R. 1991. Life cycle of *Spongilla lacustris* (Porifera, Spongillidae): a cue for environment-dependent phenotype. Hydrobiologia, 220: 155-160.

MANCONI R, PRONZATO R, 2016. How to survive and persist in temporary freshwater? Adaptive traits of sponges (Porifera: Spongillida): A review. Hydrobiologia. DOI 10.1007/s10750-016-2714-x.

MASSARO AJ, WEISZ JB, HILL MS, WEBSTER NS. 2012. Behavioral and morphological changes caused by thermal stress in the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 416: 55–60.

MCDONALD JI, HOOPER JNA, MCGUINNESS KA. 2002. Environmentally influenced variability in the morphology of *Cinachyrella australiensis* (Carter 1886) (Porifera: Spirophorida: Tetillidae). Mar. Freshw. Res., 52: 79-84.

MCMURRAY SE, PAWLIK JR, FINELLI CM. 2014. Trait-mediated ecosystem impacts: how morphology and size affect pumping rates of the Caribbean giant barrel sponge. Aquatic Biology, 23: 1–13, doi: 10.3354/ab00612.

MEHBUB MF, LEI J, FRANCO C, ZHANG W. 2014. Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. Marine Drugs, 12(8): 4539-4577; doi:10.3390/md12084539.

MENDOLA D, DE CARALT S, URIZ MJ, VAN DEN END F, VAN LEEUWEN JL, WIJFFELS RH. 2008. Environmental flow regimes for *Dysidea avara* sponges. Marine Biotechnol, 10: 622–630, doi 10.1007/s10126-008-9102-0.

MERCURIO M, CORRIERO G, GAINO E. 2006. Sessile and non-sessile morphs of *Geodia cydonium* (Jameson) (Porifera, Demospongiae) in two semi-enclosed Mediterranean bays. Mar. Biol., 148: 489-501.

MERCURIO M, CORRIERO G, SCALERA LIACI L, GAINO E. 2000. Silica content and spicule size variations in *Pellina semitubulosa* (Porifera: Demospongiae). Marine Biology, 137(1): 87-92.

MEROZ-FINE E, SHEFER S, ILAN M. 2005. Changes in morphology and physiology of an East Mediterranean sponge in different habitats. Marine Biology, 147(1): 243-250.

MILLER K, ALVAREZ B, BATTERSHILL C, NORTHCOTE P, PARTHASARATHY H. 2001. Genetic, morphological, and chemical divergence in the sponge genus *Latrunculia* (Porifera: Demospongiae) from New Zealand. Marine Biology, 139: 235–250.

MINER, B.G., SULTAN, S.E., MORGAN, S.G., PADILLA, D.K., RELYEA, R.A., 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. Trends in Ecology & Evolution, 20(12): 685-692.

MORITZ C, HILLIS DM. 1996. Molecular Systematics: context and controversies, pp. 1-13. In: HILLIS DM, MORITZ C, MABLE BK (1996, eds.). Molecular Systematics, 2nd. edition. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., USA.

MORROW C, CÁRDENAS P. 2015. Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). Frontiers in Zoology, 12: 7, doi: 10.1186/s12983-015-0099-8.

MURICY G, HAJDU E. 2006. Porifera Brasilis: guia de identificação das esponjas marinhas mais comuns do Sudeste do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional / UFRJ. 104 p.

MURICY G, RIBEIRO SM. 1999. Shallow-water Haplosclerida (Porifera, Demospongiae) from Rio de Janeiro State, Brazil (Southwestern Atlantic). Beaufortia, 49(9): 83-108

MURICY G, SILVA OC. 1999. Esponjas marinhas do Estado do Rio de Janeiro: Um recurso renovável inexplorável. In: SILVA SHG, LAVRADO HP (eds). Ecologia dos ambientes costeiros do Estado do Rio de Janeiro. Série Oecologia Brasiliensis, vol. VII. PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. pp155-178.

MURICY G, LOPES D, HAJDU E, CARVALHO MS, MORAES FC, KLAUTAU M, MENEGOLA C, PINHEIRO U. 2011. Catalogue of Brazilian Porifera. Museu Nacional, Rio de Janeiro. Série Livros 46, 299 p.

MURICY, G., SOLÉ-CAVA, A.M., THORPE, J.P., BOURY-ESNAULT, N. 1996. Genetic evidence for extensive cryptic speciation in the subtidal sponge *Plakina trilopha* (Porifera: Demospongiae: Homoscleromorpha). Marine Ecology Progress Series, 138: 181–187.

NICHOLS SA, BARNES PAG. 2005. A molecular phylogeny and historical biogeography of the marine sponge genus *Placospongia* (Phylum Porifera) indicate low dispersal capabilities and widespread crypsis. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 323: 1-15.

OREN M, STEINDLER L, ILAN M, 2005. Transmission, plasticity and the molecular identification of cyanobacterial symbionts in the Red Sea sponge *Diacarnus erythraenus*. Marine Biology, 148: 35–41.

PADILLA DK, SAVADO M. 2013. A systematic review of phenotypic plasticity in marine invertebrate and plant systems. Adv. Mar. Biol., 65: 67–94.

PALLAS PS. 1766. Elenchus zoophytorum sistens generum adumbrationes generaliores et specierum cognitarum succintas descriptiones, cum selectis auctorum synonymis. Fransiscum Varrentrapp, Hagae -Comitum, XVI+(17-28), pp. 451

PALUMBI SR. 1984. Tactics of acclimation: morphological changes of sponges in an unpredictable environment. Science, 225: 1478–1480.

PALUMBI SR. 1986. How body plan limits acclimation: Responses of a demosponge to wave force. Ecology, 67: 208–214, doi: 10.2307/1938520.

PALUMBI SR. 1996. Nucleid Acids II: the polymerase chain reaction. In: HILLIS DM, MORITZ C, MABLE BK (eds.), Molecular Systematics, 2nd. edition. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., pp. 205-248.

PAWLIK JR, LOH T-L, MCMURRAY SE, FINELLI CM. 2013. Sponge communities on Caribbean coral reefs are structured by factors that are top-down, not bottom-up. PLoS One, 8(5): e62573, doi:10.1371/journal.pone.0062573.

PFENNIG DW, WUND MA, SNELL-ROOD EC, CRUICKSHANK T, SCHLICHTING CD, MOCZEK AP. 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. Trends in Ecology & Evolution, 25(8): 459–467.

PIGLIUCCI M. 2001. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.

PINHEIRO US, HAJDU E. 2001. Shallow-water *Aplysina* Nardo (Aplysinidae, Verongida, Demospongiae) from the São Sebastião Channel and its environs (Tropical southwestern Atlantic), with the description of a new species and a literature review of other Brazilian records of the genus. Revista Brasileira de Zoologia, 18: 143-160.

PRONZATO R, MANCONI R. 2008. Mediterranean commercial sponges: over 5000 years of natural history and cultural heritage. Marine Ecology, 29: 146–166.

PRONZATO R, BAVESTRELLO G, CERRANO C. 1998. Morph-functional adaptations of three species of *Spongia* (Porifera, Demospongiae) from a Mediterranean vertical cliff. Bulletin of Marine Science, 63(2): 317-328.

PULITZER-FINALI G. (1986). A collection of West Indian Demospongiae (Porifera). In appendix, a list of the Demospongiae hitherto recorded from the West Indies. Annali del Museo civico di storia naturale Giacomo Doria, 86: 65-216.

PUTNAM H. M, DAVIDSON J.M., GATES R.D. 2016. Ocean acidification influences host DNA methylation and phenotypic plasticity in environmentally susceptible corals. Evolutionary Aplications: Evolutionary approaches to environmental, biomedical and socio-economic issues, 9(9): 1165-1178. Special Issue: transgenerational plasticity, epigenetics and the evolution of marine species under global change.

RAMSBY B, MASSARO A, MARSHALL E, WILCOX T, HILL M. 2012. Epibiont–basibiont interactions: examination of ecological factors that influence specialization in a two-sponge association between Geodia vosmaeri (Sollas, 1886) and Amphimedon erina (de Laubenfels, 1936). Hydrobiologia, 687: 331–340, doi 10.1007/s10750-011-0878-y.

REDMOND NE, RALEIGH J, VAN SOEST RWM, KELLY M, TRAVERS SAA, BRADSHAW B, VARTIA S, STEPHENS KM, MCCORMACK GP. 2011. Phylogenetic relationships of the marine Haplosclerida (Phylum Porifera) employing ribosomal (28S rRNA) and mitochondrial (cox1, nad1) gene sequence data. PloS One, 6(9): e24344.

REDMOND NE, VAN SOEST RWM, KELLY M, RALEIGH J, TRAVERS SAA, MCCORMACK GP, 2007. Reassessment of the classiWcation of the Order Haplosclerida (Class Demospongiae, Phylum Porifera) using 18S rRNA gene sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 43: 344–352.

REVEILLAUD J, REMERIE T, VAN SOEST R, ERPENBECK D, CÁRDENAS P, DERYCKE S, XAVIER JR, RIGAUX A, VANREUSEL A. 2010. Species boundaries and phylogenetic relationships between Atlanto-Mediterranean shallow-water and deep-sea coral associated *Hexadella* species (Porifera, Ianthellidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 56: 104–114.

REVEILLAUD J, VAN SOEST R, DERYCKE S, PICTON B, RIGAUX A, VANREUSEL A. 2011. Phylogenetic Relationships among NE Atlantic Plocamionida Topsent (1927) (Porifera, Poecilosclerida): Under-Estimated Diversity in Reef Ecosystems. PLoS One, 6(2): e16533, doi:10.1371/journal.pone.0016533

RIBEIRO SM, CASSIANO KM, CAVALCANTI DN, TEIXEIRA VL, PEREIRA RC. 2012. Isolated and synergistic effects of chemical and structural defenses of two species of *Tethya* (Porifera: Demospongiae). Journal of Sea Research, 68: 57–62.

RIDLEY SO. 1881. XI. Spongida. Horny and Siliceous Sponges of Magellan Straits, S.W. Chili, and Atlantic off SW Brazil. in: Account of the Zoological Collections made during the Survey of H.M.S. 'Alert' in the Straits of Magellan and on the Coast of Patagonia. Gunther, A. (Ed.). Proceedings of the Zoological Society of London. 107-141, pls X-XI.

RIDLEY SO, DENDY A. 1886. Preliminary report on the Monaxonida collected by H.M.S. Challenger. Part I. Annals and Magazine of Natural History, 18: 325-351, 470-493.

RITSON-WILLIAMS R, ARNOLD SN, FOGARTY ND, STENECK RS, VERMEIJ MJ, PAUL VJ. 2009. New perspectives on ecological mechanisms affecting coral recruitment on reefs. Smithsonian Contributions to the Marine Sciences, 38: 437-457. https://nsuworks.nova.edu/occ_facarticles/503.

ROBERTS DE, CUMMINS SP, DAVIS AR, CHAPMAN MG. 2006. Structure and dynamics of sponge-dominated assemblages on exposed and sheltered temperate reefs. Marine Ecology Progress Series, 321: 19–30.

ROHDE S, GOCHFELD DJ, ANKISETTY S, AVULA B, SCHUPP PJ, SLATTERY M. 2012. Spatial Variability in Secondary Metabolites of the Indo-Pacific Sponge *Stylissa massa*. Journal of Chemical Ecology, 38(5): 463–475, doi 10.1007/s10886-012-0124-8.

RUIZ C, IVANISEVIC J, CHEVALDONNE P, ERESKOVSKY AV, BOURY-ESNAULT N, VACELET J, THOMAS OP, PEREZ T. 2014. Integrative taxonomic description of Plakina kanaky, a new polychromatic sponge species from New Caledonia (Porifera: Homoscleromorpha). Marine Ecology, p. 1–15, doi:10.1111/maec.12209.

RÜTZLER K. 1978. Sponges in coral reefs. In: STODDART DR, JOHANNES RE (eds.), Coral reefs: research methods. In: Monographs on Oceanographic Methodology, 5. Paris: Unesco, pp 299-313.

RÜTZLER K. 1990. Association between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. In: RÜTZLER K (ed.), New Perspective in Sponge Biology: 3d International Sponge Conference, 1985. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 533 pp.

RÜTZLER K, DURAN S, PIANTONI C. 2007. Adaptation of reef and mangrove sponges to stress: evidence for ecological speciation exemplified by *Chondrilla caribensis* new species (Demospongiae, Chondrosida). Mar. Ecol, 28: 95–111.

SALGADO MENDES AM. 2006. Variabilidade morfológica e gênica de *Dragmacidon reticulatum* (Ridley & Dendy, 1886) (Demospongiae, Axinellidae) da costa brasileira. Dissertação de Mestrado, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Rio de Janeiro, RJ, xxi, 166p. il.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, NY.

SÁNCHEZ JA, AGUILAR C, DORADO D, MANRIQUE N. 2007. Phenotypic plasticity and morphological integration in a marine modular invertebrate. BMC Evolutionary Biology, 7: 122, doi:10.1186/1471-2148-7-122

SARÀ M. 1956. Aspetti genetici ed ecologici dell'ibridazione naturale fra differenti specie di *Leucosolenia* (Calcispongie) a Roscoff. Bolletino di Zoologia, 23(2): 149-161.

SARÀ M. 1959. Sulla coesistenza di specie strettamente affini di Poriferi in biotopi litoral. Bolletino di Zoologia, 26 (2): 89-96.

SARÁ M. 1988. Two new species of *Tethya* (Porifera Demospongiae) from New Caledonia. Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle, Section A, Zoologie, biologie et écologie animales, 10(4): 651-659.

SCHMIDT O. 1870. Grundzüge einer Spongien-Fauna des atlantischen Gebietes. (Wilhelm Engelmann: Leipzig): iii-iv, 1-88, pls I-VI.

SCHMIDT-ROACH S, MILLER K J, ANDREAKIS N. 2013. *Pocillopora aliciae*: a new species of scleractinian coral (Scleractinia, Pocilloporidae) from subtropical Eastern Australia. Zootaxa, 3626(4): 576-582.

SLATTERY M, GOCHFELD DJ, DIAZ MC, THACKER RW, LESSER MP. 2016. Variability in chemical defense across a shallow to mesophotic depth gradient in the Caribbean sponge *Plakortis angulospiculatus*. Coral Reefs, 35(1): 11-22, doi 10.1007/s00338-015-1324-9.

SMITH LD. 2009. Chapter 10. The Role of Phenotypic Plasticity in Marine Biological Invasions. In: RILOV G, CROOKS JA (Eds.), Biological Invasions in Marine Ecosystems, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. Pp. 177-202.

SOLÉ-CAVA AM, BOURY-ESNAULT N. 1999. Patterns of intra and interspecific genetic divergence in marine sponges. Memoirs Queensland Museum, 44: 591–601.

SOLÉ-CAVA AM, THORPE JP. 1986. Genetic differentiation between morphotypes of the marine sponge *Suberites ficus* (Demospongiae: Hadromerida). Marine Biology, 93(2): 247-253.

SOLÉ-CAVA AM, THORPE JP, 1991. High levels of gene variation in marine invertebrates. Biological Journal of the Linnean Society, 44(1): 65-80.

SOLÉ-CAVA AM, THORPE JP, 1994. Evolutionary genetics of marine sponges. In: van Soest RWM, van Kempen ThMG, Brackman JC (eds.), Sponges in Time and Space. Balkema, Rotterdam, pp. 55-63.

SOLÉ-CAVA AM, BOURY-ESNAULT N, VACELET J, THORPE JP. 1992. Biochemical genetic divergence in sponges of the genera *Corticium* and *Oscarella* (Demospongiae: Homoscleromorpha) in the Mediterranean Sea. Marine Biology, 113(2): 299–304.

SOLLAS WJ. 1885. A Classification of the Sponges. Annals and Magazine of Natural History, (5) 16(95): 395.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.

TOPSENT E. 1928. Spongiaires de l'Atlantique et de la Méditerranée provenant des croisières du Prince Albert ler de Monaco. Résultats des campagnes scientifiques accomplies par le Prince Albert I. Monaco. 74:1-376, pls I-XI.

URIZ MJ, MALDONADO M. 1995. A reconsideration of the relationship between polyaxonid and monaxonid spicules in Demospongiae: new data from the genera *Crambe* and *Discorhabdella* (Porifera). Biological Journal of the Linnean Society, 55: 1-15.

VACELET J. 1999. Outlook to the future of sponges. Memoirs of the Queensland Museum 44: 27-32.

VALISANO L, POZZOLINI M, GIOVINE M, CERRANO C. 2012. Biosilica deposition in the marine sponge *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789): The model of primmorphs reveals time dependence of spiculogenesis. Hydrobiologia, 687:259–273.

VAN SOEST RWM, BOURY-ESNAULT N, HOOPER JNA, RÜTZLER K, DE VOOGD NJ, ALVAREZ DE GLASBY B, HAJDU E, PISERA AB, MANCONI R, SCHOENBERG C, JANUSSEN D, TABACHNICK KR, KLAUTAU M, PICTON B, KELLY M, VACELET J, DOHRMANN M, DÍAZ MC, CÁRDENA P. 2016. *World*

Porifera Database. Acessado em http://www.marinespecies.org/porifera em 24 de julho de 2016.

VOLKMER-RIBEIRO C. 1999. Esponjas. In: JOLY CA, BICUDO CEM (eds.), Biodiversidade do Estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do século XX. São Paulo: FAPESP, 4. p. 1-9.

VOLKMER-RIBEIRO C, PAULS SM. 2000. Esponjas de agua dulce (Porifera, Demospongiae) de Venezuela. Acta Biologica Venezuelica, 20(1): 1-28.

VOULTSIADOU E. 2007. Sponges: an historical survey of their knowledge in Greek antiquity. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 87: 1757–1763.

WAHAB A.M.A., FROMONT J., WHALAN S., WEBSTER N., ANDREAKIS N., 2014. Combining morphometrics with molecular taxonomy: How different are similar foliose keratose sponges from the Australian tropics? Molecular Phylogenetics and Evolution, 73: 23-39.

WEST-EBERHARD MJ. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. Annual review of Ecology and Systematics, 20(1): 249–278.

WHITMAN DW, AGRAWAL AA. 2009. What is phenotypic plasticity and why is it important? In: WHITMAN DW, ANANTHAKRISHNAN TN (Eds.), Phenotypic Plasticity of Insects, pp. 1–63.

WÖRHEIDE G, DOHRMANN M, ERPENBECK D, LARROUX C, MALDONADO M, VOIGT O, BORCHIELLINI C, LAVROV DV. 2012. Deep Phylogeny and Evolution of Sponges (Phylum Porifera). Advances in Marine Biology, 61: 1–78.

WÖRHEIDE G, NICHOLS SA, GOLDBERG J, 2004. Intragenomic variation of the rDNA internal transcribed spacers in sponges (Phylum Porifera): implications for phylogenetic studies. Molecular Phylogenetics and Evolution, 33: 816–830.

WULFF J. 2006. Ecological interactions of marine sponges. Canadian Journal of Zoology, 84(2): 146– 166.

XAVIER JR, RACHELLO-DOLMEN PG, PARRA-VELANDIA F, SCHÖNBERG CHL, BREEUWER JAJ, VAN SOEST RWM. 2010. Molecular evidence of cryptic speciation in the ‘‘cosmopolitan’’ excavating sponge *Cliona celata* (Porifera, Clionaidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 56: 13–20.

ZEA S. 1987. Esponjas del Caribe Colombiano. Catálogo Científico. Pp.76.

ANEXO A - Lista dos 61 artigos analisados no estudo de plasticidade fenotípica em Porifera:

ABDO DA, MCDONALD JI, HARVEY ES, FROMONT J, KENDRICK GA. 2008. Neighbour and environmental influences on the growth patterns of two temperate Haliclonid sponges. Marine and Freshwater Research, 59: 304–312.
AVILA E, RIOSMENA-RODRIGUEZ R, HINOJOSA-ARANGO G. 2013. Sponge-rhodolith interactions in a subtropical estuarine system. Helgoland Marine Research, 67(2): 349-357.
BARBIERI M, BAVESTRELLO G, SARÀ, M. 1995. Morphological and ecological differences in two electrophoretically detected species of *Cliona* (Porifera, Demospongiae). Biological Journal of the Linnean Society, 54: 193–200.
BAVESTRELLO G, SARÀ M. 1992. Morphological and genetic differences in ecologically distinct populations of *Petrosia* (Porifera, Demospongiae). Biol. Journal of the Linnean Society, 47: 49–60.
BAVESTRELLO G, BONITO M, SARÀ M. 1993. Influence of depth on the size of sponge spicules. Scientia Marina, 57: 415–420.
BAVESTRELLO G, CALCINAI B, CECCATI L, CERRANO C, SARA M. 2000. Skeletal development in two species of *Tethya* (Porifera, Demospongiae). Italian Journal of Zoology, 67: 241-244.
BELL JJ. 2004. Evidence for morphology-induced sediment settlement prevention on the tubular sponge *Haliclona urceolus*. Estuar. Marine Biology, 146: 29–38.
BELL JJ, BARNES DKA. 2000a. The influence of bathymetry and flow regime on the morphology of sublittoral sponge populations at Lough Hyne MNR. J Mar Biol Assoc UK, 80: 707-718.
BELL JJ, BARNES DKA. 2000b. The distribution and prevalence of sponges in relation to environmental gradients within a temperate sea lough: vertical cliff surfaces. Divers Distrib 6: 283-303.
BELL JJ, BARNES DKA. 2000c. The distribution and prevalence of sponges in relation to environmental gradients within a temperate sea lough: inclined cliff surfaces. Divers Distrib 6: 305-323.
BELL JJ, BARNES DKA. 2000d. A sponge diversity within a 'marine island'. Hydrobiologia, 440: 55-64.
BELL JJ, BARNES DKA. 2001. Sponge morphological diversity: A qualitative predictor of Species Diversity? Aquatic conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 11: 109–121.
BELL JJ, BARNES DKA. 2002a. Modelling sponge species diversity using a morphological predictor: A tropical test of a temperate model. J. Nat. Conserv., 10: 41–50.
BELL JJ, BARNES DKA. 2002b. The relationship between sedimentation, flow rates, depth and time at Lough Hyne Marine Nature Reserve. Irish Nat J, 27: 106-116.
BELL JJ, BARNES DKA, TURNER JR. 2002a. The importance of micro and macro morphological variation in adaptation of a sublittoral demosponge to current extremes. Mar Biol, 140: 75-81.
BELL JJ, BARNES DKA, SHAW C. 2002b. Branching dynamics of two species of arborescent demosponge: the effect of flow regime and bathymetry. J Mar Biol Assoc UK, 82:279–294.
BELL JJ, BURTON M, BULLIMORE B, NEWMAN PB, LOCK K. 2006. Morphological monitoring of subtidal sponge assemblages. Marine Ecology Progress Series, 311: 79–91.

BERTOLINO M, CERRANO C, BAVESTRELLO G, CARELLA M, PANSINI M, CALCINAI B. 2013. Diversity of Porifera in the Mediterranean coralligenous accretions, with description of a new species. Zookeys, 27(336):1-37. doi: 10.3897/zookeys.336.5139. eCollection.
BLANQUER A, URIZ M-J. 2008. 'A posteriori' searching for phenotypic characters to describe new cryptic species of sponges revealed by molecular markers (Dictyonellidae: Scopalina). Invertebrate Systematics, 22: 489–502.
CALCINAI B, BAVESTRELLO G, BERTOLINO M, PICA D, WAGNER D, CERRANO C. 2013. Sponges associated with octocorals in the Indo-Pacific, with the description of four new species. Zootaxa, 3617: 1-61. doi: 10.11646/zootaxa.3617.1.1.
CARBALLO J.L., AVILA E., ENRIQUEZ S., CAMACHO L., 2006. Phenotypic plasticity in a mutualistic association between the sponge *Haliclona caerulea* and the calcareous macroalga *Jania adherens* induced by transplanting experiments. I: Morphological responses of the sponge. Marine Biology, 148: 467-478.
CARBALLO JL, AGUILAR-CAMACHO JM, KNAPP IS, BELL JJ. 2013. Wide distributional range of marine sponges along the Pacific Ocean. Marine Biology Research, 9: 768-775, http://dx.doi.org/10.1080/17451000.2013.765581.
CARDONE F, GAINO E, CORRIERO G. 2010. The budding process in *Tethya citrina* Sarà & Melone (Porifera, Demospongiae) and the incidence of post-buds in sponge population maintenance. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 389: 93–100.
CAVALCANTI FF, ZILBERBERG C, KLAUTAU M. 2007. Seasonal variation of morphological characters of *Chondrilla* aff. *nucula* (Porifera: Demospongiae) from the south-east coast of Brazil. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 87: 1727–1732.
DE BIASSE B, HELLBERG ME. 2015. Discordance between morphological and molecular species boundaries among Caribbean species of the reef sponge *Callyspongia*. Ecology and Evolution, 5(3): 663–675.
DURAN S, RÜTZLER K. 2006. Ecological speciation in a Caribbean marine sponge. Molecular Phylogenetics and Evolution, 40: 292–297.
ENRÍQUEZ S, ÁVILA E, CARBALLO JL. 2009. Phenotypic plasticity induced in transplant experiments in a mutualistic association between the red alga *Jania adhaerens* (Rhodophyta, Corallinales) and the sponge *Haliclona caerulea* (Porifera: Haplosclerida): morphological responses of the alga. Journal of Phycology, 45 (1): 81-90, doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00640.x.
FASSINI D, PARMA L, WILKIE IC, BAVESTRELLO G, BONASORO F, CARNEVALI MDC. 2012. Ecophysiology of mesohyl creep in the demosponge *Chondrosia reniformis* (Porifera: Chondrosida). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 428: 24–31.
FRECKELTON ML, LUTER HM, ANDREAKIS N, WEBSTER NS, MOTTI CA. 2012. Qualitative variation in colour morphotypes of *Ianthella basta* (Porifera: Verongida). Hydrobiologia, 687(1): 191-203.
GAINO E, MACONI R, PRONZATO R. 1995. Organizational plasticity as a successful conservative tactic in sponges. Anim Biol, 4: 31-43.
GUARDIOLA M, FROTSCHER J, URIZ M. 2016. High genetic diversity, phenotypic plasticity, and invasive potential of a recently introduced calcareous sponge, fast spreading across the Atlanto-Mediterranean basin. Mar Biol, 163:123 doi 10.1007/s00227-016-2862-6.

HILL MS, HILL AL. 2002. Morphological plasticity in the tropical sponge *Anthosigmella varians*: responses to predators and wave energy. Biol Bull, 202:86-95.
HOOPER JNA, CAPON RJ, KEENAN CP, PARRY DL. 1991. Morphometric and biochemical differences between sympatric populations of the *Clathria spicata* species complex (Demospongiae: Poecilosclerida: Microcionidae) from northern Australia. In: Reitner J, Keupp H (eds) Fossil and recent sponges. Springer-Verlag, Berlin, p 271–288.
KLÖPPEL A, PUTZ A, PFANNKUCHEN M, FRITZ G, JAKLIN A, PROKSCH P, BRÜMMER F. 2009. Depth profile of Aplysina ssp.: Morphological, histological and biochemical aspects and their role in species distinction. Marine Biodiversity, 39:121–129.
LESSER MP, SLATTERY M. 2013. Ecology of Caribbean sponges: are top-down or bottom-up processes more important? PLoS ONE, 8(11): e79799. doi:10.1371/journal.pone.0079799.
LOH TL, PAWLIK JR. 2009. Bitten down to size: Fish predation determines growth form of the Caribbean coral reef sponge *Mycale laevis*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 374: 45–50.
LOH TL, LEGENTIL SL, SONG B, PAWLIK JR. 2012. Phenotypic variability in the Caribbean Orange Icing sponge *Mycale laevis (*Demospongiae: Poecilosclerida). Hydrobiologia, 687: 205–217, doi 10.1007/s10750-011-0806-1.
LÓPEZ-LEGENTIL S, TURON X. 2005. How do morphotypes and chemotypes relate to genotypes? The colonial ascidian *Cystodytes* (Polycitoridae). Zoologica Scripta, 34: 3–14.
LÓPEZ-LEGENTIL S, ERWIN PM, HENKEL TP, LOH TL, PAWLIK JR. 2010. Phenotypic plasticity in the Caribbean sponge *Callyspongia vaginalis* (Porifera: Haplosclerida). Scientia Marina Sci. Mar., 74(3):445-453.
MANCONI R, PRONZATO R, 2016. How to survive and persist in temporary freshwater? Adaptive traits of sponges (Porifera: Spongillida): A review. Hydrobiologia. DOI 10.1007/s10750-016-2714-x.
MASSARO AJ, WEISZ JB, HILL MS, AND WEBSTER NS. 2012. Behavioral and morphological changes caused by thermal stress in the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 416–417: 55–60.
MCMURRAY SE, PAWLIK JR, FINELLI CM. 2014. Trait-mediated ecosystem impacts: how morphology and size affect pumping rates of the Caribbean giant barrel sponge. Aquatic Biology, 23: 1–13, doi: 10.3354/ab00612.
MENDOLA D, DE CARALT S, URIZ MJ, VAN DEN END F, VAN LEEUWEN JL, WIJFFELS RH. 2008. Environmental flow regimes for *Dysidea avara* sponges. Mar Biotechnol, 10: 622–630, doi 10.1007/s10126-008-9102-0.
MERCURIO M, CORRIERO G, SCALERA LIACI L, GAINO E. 2000. Silica content and spicule size variations in *Pellina semitubulosa* (Porifera: Demospongiae). Marine Biology, 137(1):87-92.
MERCURIO M, CORRIERO G, GAINO E. 2006. Sessile and non-sessile morphs of *Geodia cydonium* (Jameson) (Porifera, Demospongiae) in two semi-enclosed Mediterranean bays. Mar. Biol., 148: 489-501.
MEROZ-FINE E, SHEFER S, ILAN M. 2005. Changes in morphology and physiology of an East Mediterranean sponge in different habitats. Mar. Bio., 147(1): 243-250.
MILLER K, ALVAREZ B, BATTERSHILL C, NORTHCOTE P, PARTHASARATHY H. 2001. Genetic, morphological, and chemical divergence in the sponge genus *Latrunculia* (Porifera: Demospongiae) from New Zealand. Marine Biology, 139: 235–250.
OREN M, STEINDLER L, ILAN M, 2005. Transmission, plasticity and the molecular identification of cyanobacterial symbionts in the Red Sea sponge *Diacarnus erythraenus*. Marine Biology, 148: 35–41.

PALUMBI SR. 1984. Tactics of acclimation: morphological changes of sponges in an unpredictable environment. Science, 225: 1478–1480.
PALUMBI SR. 1986. How body plan limits acclimation: Responses of a demosponge to wave force. Ecology, 67: 208–214, doi: 10.2307/1938520.
RAMSBY B, MASSARO A, MARSHALL E, WILCOX T, HILL M. 2012. Epibiont–basibiont interactions: examination of ecological factors that influence specialization in a two-sponge association between *Geodia vosmaeri* (Sollas, 1886) and *Amphimedon erina* (de Laubenfels, 1936). Hydrobiologia, 687: 331–340, doi 10.1007/s10750-011-0878-y.
REVEILLAUD J, REMERIE T, VAN SOEST R, ERPENBECK D, CÁRDENAS P, DERYCKE S, XAVIER JR, RIGAUX A, VANREUSEL A. 2010. Species boundaries and phylogenetic relationships between Atlanto-Mediterranean shallow-water and deep-sea coral associated *Hexadella* species (Porifera, Ianthellidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 56: 104–114.
RIBEIRO SM, CASSIANO KM, CAVALCANTI DN, TEIXEIRA VL, PEREIRA RC. 2012. Isolated and synergistic effects of chemical and structural defenses of two species of *Tethya* (Porifera: Demospongiae). Journal of Sea Research, 68: 57–62.
ROBERTS DE, CUMMINS SP, DAVIS AR, CHAPMAN MG. 2006. Structure and dynamics of sponge-dominated assemblages on exposed and sheltered temperate reefs. Marine Ecology Progress Series, 321: 19–30.
ROHDE S, GOCHFELD DJ, ANKISETTY S, AVULA B, SCHUPP PJ, SLATTERY M. 2012. Spatial Variability in Secondary Metabolites of the Indo-Pacific Sponge *Stylissa massa*. J Chem Ecol, 38: 463–475, doi 10.1007/s10886-012-0124-8.
RÜTZLER K, DURAN S, PIANTONI C. 2007. Adaptation of reef and mangrove sponges to stress: evidence for ecological speciation exemplified by *Chondrilla caribensis* new species (Demospongiae, Chondrosida). Mar. Ecol, 28: 95–111.
SARÀ M. 1956. Aspetti genetici ed ecologici dell'ibridazione naturale fra differenti specie di *Leucosolenia* (Calcispongie) a Roscoff. Bolletino di zoologia, 23(2): 149-161.
SARÀ M. 1959. Sulla coesistenza di specie strettamente affini di Poriferi in biotopi litoral. Bolletino di zoologia, 26 (2): 89-96.
SLATTERY M., GOCHFELD D.J., DIAZ M.C., THACKER R.W., LESSER M.P., 2016. Variability in chemical defense across a shallow to mesophotic depth gradient in the Caribbean sponge *Plakortis angulospiculatus*. Coral Reefs, doi 10.1007/s00338-015-1324-9.
URIZ MJ, MALDONADO M. 1995. A reconsideration of the relationship between polyaxonid and monaxonid spicules in Demospongiae: new data from the genera *Crambe* and *Discorhabdella* (Porifera). BiologicalJournal of the Linnean Society, 55: 1-15.
VALISANO L, POZZOLINI M, GIOVINE M, CERRANO C. 2012. Biosilica deposition in the marine sponge *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789): The model of primmorphs reveals time dependence of spiculogenesis. Hydrobiologia, 687:259–273.
WAHAB A.M.A., FROMONT J., WHALAN S., WEBSTER N., ANDREAKIS N., 2014.Combining morphometrics with molecular taxonomy: How different are similar foliose keratose sponges from the Australian tropics? Molecular Phylogenetics and Evolution, 73: 23-39.

Fonte: O autor, 2016.

ANEXO B – Tabelas e Figuras suplementares.

Tabela A1 - Amostras utilizadas neste trabalho com cor em vida, identificação preliminar, localidade, data da coleta e profundidade. Onde: MNRJ = número de tombo do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFAL = número de tombo da coleção da Universidade Federal de Alagoas, UERJ = número de tombo da coleção da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

MNRJ	UERJ	Identificaçãopreliminar	Coremvida	Localidade	ITS	28S	cox1	sp	Datadacoleta	Coletor	Prof.
2484		*Callyspongia*sp.1	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x			A	30/vii/1999	E.Hajdu*etal.*	
2574		*Callyspongia*sp.1	roxa	Brasil,BA,Salvador,PontadeHumaitá	x	x		A	05/viii/1999	E.Hajdu*etal.*	ca.2m
3869		*Callyspongia*sp.1	branca	Brasil,RJ,RiodeJaneiro,ArquipelagodasCagarras	x			A	11/i/01	G.Muricy,L.MonteiroeE.Vilanova	6-12m
5410		*Callyspongia*sp.1	amareloclaro	Brasil,BA,Abrolhos	x			A	03/iii/2002	E.VilanovaeG.Muricy	18m
7084		*Callyspongia*sp.1	verde-acinzentado	Brasil,ES,ArquipélagodeTrêsIlhas	x			A		S.Gandolfi	
8321		*Callyspongia*sp.1		Brasil,BA,Salvador,"NaufrágiodoGermania"	x			A	03/vi/2004	E.Hajdu*etal.*	5m
17103	911	*Callyspongia*sp.1	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x			A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17113	921	*Callyspongia*sp.1	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x			A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17114	922	*Callyspongia*sp.1	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x			A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17115	923	*Callyspongia*sp.1	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x		x	A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17118	926	*Callyspongia*sp.1	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x			A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17132	940	*Callyspongia*sp.1	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x		x	A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17133	941	*Callyspongia*sp.1	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x		x	A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17134	942	*Callyspongia*sp.1	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x		x	A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17139	947	*Callyspongia*sp.1	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x		x	A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17147	955	*Callyspongia*sp.1	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x			A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17148	956	*Callyspongia*sp.1	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x		x	A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17149	957	*Callyspongia*sp.1	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x		x	A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17150	958	*Callyspongia*sp.1	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	x		x	A	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
14890		*Callyspongia*cf.*latituba*/*ramosa*		Chile		x		B			
15145		*Callyspongia*cf.*latituba*/*ramosa*		Chile	x	x		B			
15158		*Callyspongia*cf.*latituba*/*ram*		Chile	x	x		B			

		osa										
15170		*Callyspongia*cf.*latituba*/*ramosa*		Chile		x		B				
7093		*Callyspongia*cf.*pseudotoxa*	marrom-escuraebege	Brasil,PE,Recife,PraiadeBoaViagem	x	x		C	02/i/2003	E.Esteves		
12592		*Callyspongia*cf.*pseudotoxa*	lilasabeje	Brasil,RJ,RiodeJaneiro,IlhaRasa	x	x		C	11/vi/2006	G.Muricy		
13540		*Callyspongia*cf.*pseudotoxa*	lilás	Brasil,RJ,ArmaçãodosBúzios,PraiaJoãoFernandinho	x	x		C	06/vii/2009	E.Hajdu	ca.3m	
15031		*Callyspongia*cf.*fallax*/*multiformis*		Curaçao	x	x		D				
15047		*Callyspongia*cf.*fallax*/*multiformis*		Curaçao	x	x		D				
15088		*Callyspongia*cf.*fallax*/*multiformis*		Curaçao	x	x		D				
5386		*Callyspongiapergamentacea*	bege	Brasil,BA,Abrolhos	x	x		E	01/iii/2002	E.Vilanova	10-15m	
5412		*Callyspongiapergamentacea*	bege	Brasil,BA,Abrolhos		x		E	01/iii/2002	G.Muricy	10-15m	
10545		*Callyspongiapergamentacea*	creme	Brasil,BA,Salvador,BoiãodaBarra		x		E	12/xii/2007	E.Hajdu	13.3m	
5376		*Callyspongia*sp.2	begealilas	Brasil,BA,Abrolhos	x			F	04/iii/2002	E.VilanovaeG.Muricy	16m	
UFAL797		*Callyspongia*sp.2		Brasil,AL		x		F				
UFAL808		*Callyspongia*sp.2		Brasil,AL	x			F				
UFAL827		*Callyspongia*sp.2		Brasil,AL	x	x		F				
UFAL831		*Callyspongia*sp.2		Brasil,AL	x			F				
UFAL833		*Callyspongia*sp.2		Brasil,AL	x			F				
UFAL897		*Callyspongia*sp.2		Brasil,AL	x			F				
UFAL900		*Callyspongia*sp.2		Brasil,AL	x	x	x	F				
4291		*Callyspongia*sp.3	amarelo-claro	Brasil,BA,BancoRoyalCharlotte	x			G	30/vi/2001	N/Oc.AstroGaroupa	40m	
15089		*Callyspongia*cf.*plicifera*		Curaçao	x	x	x	H				
17098	906	*Callyspongia*sp.	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra					22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.	
17099	907	*Callyspongia*sp.	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra					22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.	
17100	908	*Callyspongia*sp.	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra					22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.	
17101	909	*Callyspongia*sp.	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra					22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.	
17102	910	*Callyspongia*sp.	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra					22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.	

17104	912	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17105	913	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17106	914	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17107	915	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17108	916	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17109	917	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17110	918	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17111	919	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17112	920	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17116	924	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17117	925	*Callyspongia*sp.	azul/roxo	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17119	927	*Callyspongia*sp.	cinza/verde-begepordentro	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17120	928	*Callyspongia*sp.	cinza/verde-escurapordentro	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17121	929	*Callyspongia*sp.	cinza/verde-escura/lilásporden tro	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17122	930	*Callyspongia*sp.	cinza/verde-escura/lilásporden tro	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17123	931	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17124	932	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17125	933	*Callyspongia*sp.	cinza/verde-escurapordentro	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17126	934	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17127	935	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17128	936	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17129	937	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17130	938	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17131	939	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17135	943	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17136	944	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17137	945	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17138	946	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17140	948	*Callyspongia*sp.	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.

17141	949	*Callyspongia*sp.(diferente)	cinza/verde	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17145	953	*Callyspongia*sp.	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
17146	954	*Callyspongia*sp.	laranja	Brasil,BA,Salvador,PortodaBarra	22/04/2013	G.Lobo-HajdueH.Fortunato	2-3m.
1641		*Callyspongia*sp.		DogIsland,Florida,GolfodoMéxico,EUA	26-30/i/98	F.Sandford	
1642		*Callyspongia*		DogIsland,Florida,GolfodoMéxico,EUA	26-30/i/98	F.Sandford	
1648		*Callyspongiavaginalis*		DogIsland,Florida,GolfodoMéxico,EUA	26-30/ii/1998	F.Sandford	
1693		*Callyspongia*sp.		SãoSebastião,SP,Brasil	18/iv/1998	E.Hajdu	
1819		*Callyspongia*	branca	SacodasAnchovas,Ilhabela,SP,Brasil	11/ix/1998	E.Hajdu	10m
1824		*Callyspongia*sp.	rosa-lilas	IlhaVitória,Ubatuba,SP,Brasil	08/ix/1998	E.Hajdu	15m
1946		*Callyspongia*sp.		PontadoItapebuçu,RiodasOstras,RJ,Brasil	24/xi/1998	S.Siciliano	
2023		*Callyspongia*sp.	Brancaalilás	IlhadeBúzios(faceO),Ilhabela,SP,Brasil	7/ii/1999	E.HajdueM.C.Guerrazzi	6-10m
2086		*Callyspongia*sp.		PraiadeUnamar,CaboFrio,RJ,Brasil	10/vii/1999	A.P.G.C.Sousa	Arribação
2469		*Callyspongia*aff.*arcesiosa*	verde	PortodaBarra,FortedeSantaMaria,Salvador,BA,Brasil	30/vii/1999	E.Hajdu*etal.*	
2482		*Callyspongia*aff.*arcesiosa*	verde	PortodaBarra,FortedeSantaMaria,Salvador,BA,Brasil	30/vii/1999	E.Hajdu*etal.*	
2730		*Callyspongia*sp.	cinza/azul	BehindReef,Motupore,PapuaNovaGuiné	07/i/99	M.Leblanc	15-20m
2750		*Callyspongia*sp.	amarelo	Passinbarrierreef,Motupore,PapuaNovaGuiné	09/i/99	M.Leblanc	15m
2752		*Callyspongia*sp.	roxo	Passinbarrierreef,Motupore,PapuaNovaGuiné	09/i/99	M.Leblanc	10-15m
2759		*Callyspongia*sp.	amarelo/laranja	Outerreef,Motupore,PapuaNovaGuiné	10/i/99	M.Leblanc	
2769		*Callyspongia*sp.	cinza/azul	MagicPassage,Madang,PapuaNovaGuiné	12/i/99	M.Leblanc	15m
2777		*Callyspongia*sp.	azulcinza	MagicPassage,Madang,PapuaNovaGuiné	12/i/99	M.Leblanc	15-20m
2805		*Callyspongia*sp.	azul/verde	RauschPassage,Madang,PapuaNovaGuiné	14/i/99	M.Leblanc	
3041		*Callyspongiavaginalis*	bege	1hdeCanoaQuebrada,CE,Brasil	II/2000	M.GuimarãeseAlexandre	25m
3042		*Callyspongia*sp.	marromclara	1hdeCanoaQuebrada,CE,Brasil	II/2000	M.GuimarãeseAlexandre	25m
3164		*Callyspongia*sp.		PontaVerde,Maceió,Alagoas,Brasil	2000	M.D.Correia	entre-marés
3195		*Callyspongiapallida*	roxaebranco	PedraVermelha,ArraialdoCabo,RJ,Brasil	19/vii/00	E.Vilanova	
3827		*Callyspongia*sp.	branca	IlhadePalmas,ArquipelagodasCagarras,RiodeJaneiro,RJ,Brasil	11/i/01	G.Muricy,L.MonteiroeE.Vilanova	6-12m
3852		*Callyspongia*sp.	branca	LajedaCagarra,ArquipelagodasCagarras,RiodeJaneiro,RJ,Brasil	11/i/01	G.Muricy,L.MonteiroeE.Vilanova	6-12m
3874		*Callyspongia*sp.	roxaporcimaficandobrancaproximoabase	LajedaCagarra,ArquipelagodasCagarras,RiodeJaneiro,RJ,Brasil	11/i/01	G.Muricy,L.MonteiroeE.Vilanova	6-12m

4266	*Callyspongia*sp.	bege	#12raso,BancoMinerva,direçãodoMontePascoal,BA, Brasil	x	30/vi/2001	N/Oc.AstroGaroupa	50m
5376	*Callyspongiavaginalis*	begealilas	ChaperaoentreRosalinaeSantaBarbara,Abrolhos,BA, Brasil		04/iii/2002	E.VilanovaeG.Muricy	16m
6447	*Callyspongia*sp.	cinzaescuroevinhoescuro	#R3-1,BA,Brasil		21/vi/2002	N.Oc.AstroGaroupa	83m
8100	*Callyspongia*sp.	branca	EntreasIlhasSiribaeRedonda,Abrolhos,BA		20/x/2003	FabianaASouza	5m
8476	*Callyspongiapergamentacea*		Estação30,CE,Brasil				
8676	*Callyspongiafallax*		Fortaleza,CE		14/VII/04	E.Hajdu	22m
1085	*Callyspongiasp.*	vermelha	PortodaBarra,Salvador,BA,Brasil,n°campo2H		19/II/2016	Lobo-Hajduetal.	3m
1086	*Callyspongiasp*	vermelha	PortodaBarra,Salvador,BA,Brasil,n°campo64HF		15/II/20016	Lobo-Hajduetal.	3m
1087	*Callyspongiasp.*	vermelha	PortodaBarra,Salvador,BA,Brasil,n°campo68HF,cor vermelha		15/II/20016	Lobo-Hajduetal.	3m
1088	*Callyspongiasp.*	vermelha	PortodaBarra,Salvador,BA,Brasil,n°campo5H		15/II/20016	Lobo-Hajduetal.	3m

Fonte: O autor, 2016.

Tabela A2 - Números de acesso, espécies e localidades de sequências provenientes do GeneBank.

Tombo	Espécie	Localidade
JN242192	*Callyspongia fallax*	Curaçao
JN242193	*Callyspongia fallax*	Curaçao
JN242194	*Callyspongia ramosa*	Nova Zelandia
JN242195	*Callyspongia* sp.	Oman
JN242196	*Callyspongia* sp.	Oman
JN242197	*Callyspongia* sp.	Papua Nova Guinéa
JX999082	*Callyspongia siphonella*	-
NC010206	*Callyspongia plicifera*	-
GQ415412	*Callyspongia vaginalis*	Florida
GQ415413	*Callyspongia vaginalis*	Florida
GQ415414	*Callyspongia vaginalis*	Florida
GQ415415	*Callyspongia vaginalis*	Florida
GQ415416	*Callyspongia fallax*	Florida
GQ415417	*Callyspongia fallax*	Florida

Fonte: O autor, 2016.

Tabela A3 - Dados micrométricos de espécimes de *Callyspongia* sp. Valores (mínimo-média-máximo, desvio-padrão): comprimento/largura em micrômetros; n=30.

AMOSTRA	COMP_MIN	COMP_MED	COMP_MAX	LARG_MIN	LARG_MED	LARG_MAX	COR	ST_COMP_MIN	ST_COMP_MED	ST_COMP_MAX	ST_LARG_MIN	ST_LARG_MED	ST_LARG_MAX
910	69,34	89,43	102,6	2,91	4,79	5,81	LARANJA	-0,208787989	0,269051014	-0,563090724	-0,439797025	0,875297621	-0,281552987
911	75,4	87,32	100,4	3,9	5,05	5,81	LARANJA	0,473903674	0,119454812	-0,671210433	1,610747975	1,259286454	-0,281552987
912	75,14	92,58	116,27	2,91	4,71	5,81	LARANJA	0,444613272	0,492381836	0,108725835	-0,439797025	0,757147211	-0,281552987
920	82,07	91,58	106	3,9	5,58	7,9	AZUL	1,225315125	0,421483162	-0,395996627	1,610747975	2,042032921	2,002195045
921	67,86	85,58	100,63	2,6	3,18	4,69	AZUL	-0,375517966	-0,00390888	-0,659907009	-1,081886874	-1,502479381	-1,505379684
922	82,09	96,87	117,27	2,91	3,79	5,36	AZUL	1,227568232	0,796537146	0,157871158	-0,439797025	-0,601582505	-0,77326907
923	71,27	88,47	104,08	2,6	3,84	5,36	AZUL	0,008636913	0,200988287	-0,490355647	-1,081886874	-0,527738498	-0,77326907
924	71,27	68,06	104,08	2,6	2,96	5,36	AZUL	0,008636913	-1,246053644	-0,490355647	-1,081886874	-1,827393009	-0,77326907
927	84,9	74,05	121,58	3,9	4,29	5,81	AZUL	1,544129878	-0,821370588	0,369687498	1,610747975	0,136857558	-0,281552987
928	63,54	68,99	104,59	2,91	3,56	5,81	CINZA	-0,862189251	-1,180117877	-0,465291532	-0,439797025	-0,941264934	-0,281552987
929	61,66	74,59	119,33	2,6	3,61	5,81	CINZA	-1,073981384	-0,783085304	0,259110522	-1,081886874	-0,867420927	-0,281552987
930	67,44	73,046	120,85	2,91	3,95	6,5	CINZA	-0,42283323	-0,892552857	0,333811412	-0,439797025	-0,365281684	0,472411674
931	67,43	87,34	115,06	2,91	4,64	6,63	CINZA	-0,423959784	0,120872786	0,049259995	-0,439797025	0,653765602	0,614462987
932	51,43	58,11	94,08	2,91	2,9	5,36	CINZA	-2,226446023	-1,951495447	-0,981808872	-0,439797025	-1,916005817	-0,77326907
933	59,31	66,4	108,59	3,68	3,68	6,5	CINZA	-1,33872155	-1,363745442	-0,268710242	1,155071308	-0,764039318	0,472411674
934	66,2	67,66	112,68	2,91	4	6,63	CINZA	-0,562525914	-1,274413113	-0,067705873	-0,439797025	-0,291437678	0,614462987
935	65	71,48	109,76	3,9	4,23	6,89	CINZA	-0,697712382	-1,00358018	-0,211210214	1,610747975	0,048244751	0,898565613
936	67,86	85,16	102,8	3,9	4,93	7,01	CINZA	-0,375517966	-0,033686323	-0,553261659	1,610747975	1,082060839	1,029689902
938	59,29	63,98	97,72	2,6	3,94	8,32	CINZA	-1,340974658	-1,535320233	-0,802919898	-1,081886874	-0,380050486	2,461130056
939	79,23	102,82	121,28	3,2	3,63	4,66	CINZA	0,905373817	1,218384255	0,354943901	0,160867672	-0,837883325	-1,538160756
940	80,28	106,62	120,93	3,58	5,31	6,79	CINZA	1,023661977	1,487799215	0,337743038	0,947945551	1,643275287	0,789295372
941	68,95	92,11	116,42	3,68	5,03	7,01	CINZA	-0,252723591	0,459059459	0,116097634	1,155071308	1,229748851	1,029689902
942	72,1	84,55	102,8	2,6	4,32	5,36	CINZA	0,102140887	-0,076934514	-0,553261659	-1,081886874	0,181163962	-0,77326907

943	56,45	81,26	103,22	2,91	4,78	6,63	CINZA	-1,660915966	-0,310191151	-0,532620624	-0,439797025	0,86052882	0,614462987
944	67,16	99,16	120,01	2,91	4,44	5,95	CINZA	-0,454376739	0,958895109	0,292529342	-0,439797025	0,358389577	-0,12857465
945	79,63	105,72	118,79	2,91	4,58	6,45	CINZA	0,950435973	1,423990408	0,232572048	-0,439797025	0,565152795	0,417776554
946	76,95	99,77	114,96	3,6	4,56	6,09	CINZA	0,648519528	1,0021433	0,044345463	0,989370702	0,535615192	0,024403687
947	78,42	100,22	119,92	3,22	4	5,77	CINZA	0,814122951	1,034047703	0,288106262	0,202292823	-0,291437678	-0,325261083
948	86,53	104,81	212,65	3,2	4,21	6,01	CINZA	1,727758164	1,359472615	4,845352022	0,160867672	0,018707148	-0,063012506
949	81,6	101,318	112,38	2,4	3,43	3,94	CINZA	1,172367091	1,111894447	-0,082449469	-1,496138389	-1,13325935	-2,324906489

Fonte: O autor, 2016.

Figura A1. Opções de analise do programa MEGA 6.

Analysis Options

Analysis
- Analysis ---------- Phylogeny Reconstruction
- Scope ---------- All Selected Taxa
- Statistical Method ---------- Neighbor-joining

Phylogeny Test
- Test of Phylogeny ---------- Bootstrap method
- No. of Bootstrap Replications ------- 1000

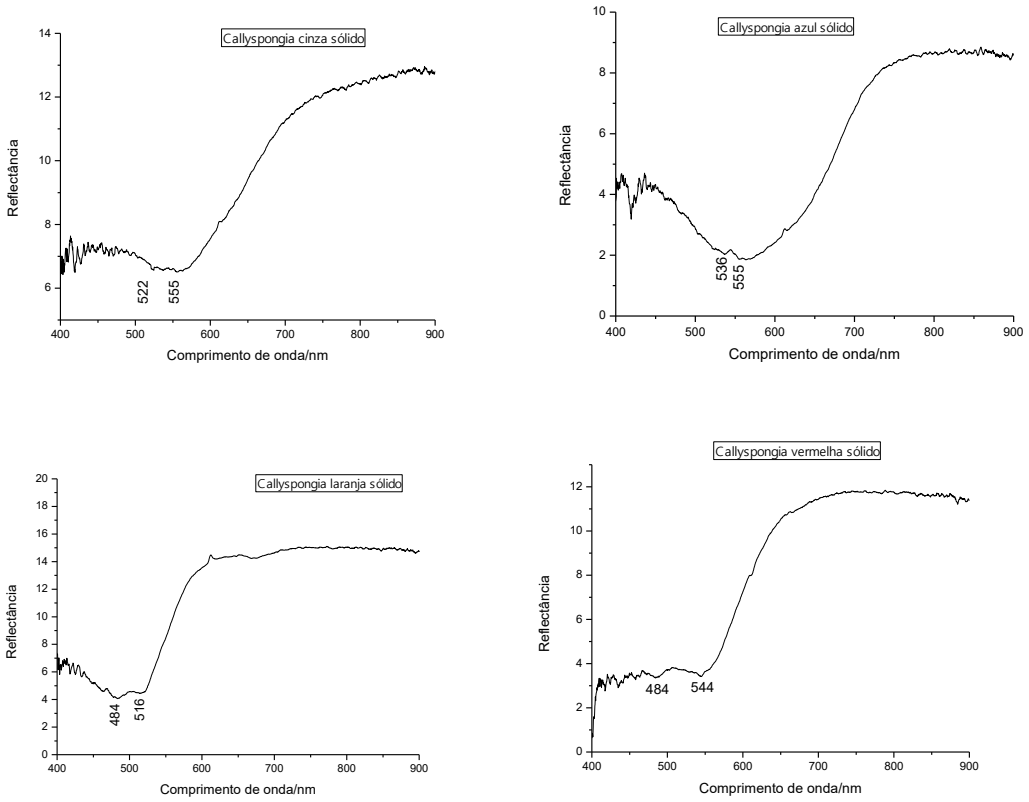
Substitution Model
- Substitutions Type ---------- Nucleotide
- Model/Method ---------- Maximum Composite Likelihood
- Substitutions to Include ---------- d: Transitions + Transversions

Rates and Patterns
- Rates among Sites ---------- Uniform rates
- Pattern among Lineages ---------- Same (Homogeneous)

Data Subset to Use
- Gaps/Missing Data Treatment --------- Complete deletion
- Codons Included ---------- 1st+2nd+3rd+Non-Coding

Fonte: TAMURA *et al.* (2013).

Figura A2. Espectros Raman de diferentes morfotipos de *Callyspongia* sp.



Fonte: Maia, LF (dados não publicados).

ANEXO C – Lista de sequencias de 16 S e cox1 sequenciadas nesta tese.

#16S

MNRJ17147_Callyspongia_sp._laranja

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17148_Callyspongia_sp._laranja

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17149_Callyspongia_sp._laranja

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17150_Callyspongia_sp._laranja

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17113_Callyspongia_sp._azul

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17114_Callyspongia_sp._azul

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17115_Callyspongia_sp._azul

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17117_Callyspongia_sp._azul

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17118_Callyspongia_sp._azul

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ5386_Callyspongia_pergamentacea_BA

ATTGGGGGTGATGCCTGCCCAATGATTGTATCTAAATTCAAGTAATAACACAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCTCACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTA
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGAGACTTGTATTGTTTTTTTTGAATTATGTTAGGTG
GGGGTTAATCACTATTTAATTTTTTAAGAACTAAAATTGTTTAGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTTG
GGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATA-----
AAATAAAGGCTTGACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGTATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTT
AGGGTGGGATAGCTAACGAGCGACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTC
ATATCGATGATGATGTTTC

MNRJ5410_Callyspongia_vaginalis_BA

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ12592_Callyspongia_cf._pseudotoxa_RJ

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCCACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTA
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ13540_Callyspongia_pseudotoxa_RJ

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCCACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTA
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ15047_Callyspongia_sp._Curacao

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTA
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAWAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGAGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ15088_Callyspongia_sp._Curacao

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTA
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGRGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ15089_Callyspongia_sp._Curacao

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGATTGTATCTAAACCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCCACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTA
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTCCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGATTAATCACTATTTAATTTTTTAAGAACTAAAATTATCTAGATTAAAGATGTAAGTTGGACAGTTTGGTTG
GGGCGACCGCCTTCTAAACAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAGAATAAAGTAAAGGCCTGA
CAGCAAGGAGGACCTACTGAGCTGACACGGTATCGTGGGTTATAATGATCCGTTGGTTTAGGGTGGGATAGCT
AACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGATGACGAT
GTTTC

MNRJ15145_Callyspongia_sp._Chile

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTA
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTAAATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ15158_Callyspongia_sp._Chile L

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATATGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTA
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTAAATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ15170_Callyspongia_sp._Chile

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTA
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTAAATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ15890_Aaptos_sp._BocasdelToro

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTA
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTAAATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17132_Callyspongia_sp._cinza

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17133_Callyspongia_sp._cinza

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17134_Callyspongia_sp._cinza

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17139_Callyspongia_sp._cinza

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

MNRJ17140_Callyspongia_sp._cinza

ATTGGAGGTGATGCCTGCCCAATGGTTGTATCTAAATCCAAGTAATAACATAGGTTAATTGGTTAAGGGCAAT
TAAATGGCCGCGGTAAAACTGACCGTGATAATGTAGCGCAATCAATAGCCAATTAATTGTTGGCAAGTATGA
ATGGCTTAACGAATGCCCTACTGTCTCAAGATAAAAACCAGTGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTG
CAAGTTGTTAGACGAGAAGACCCTATTGAGCTTTACTGGGGACTTGCATTGTTTTTTTTGAATTATATTAGGT-
GGGCCAAATCACTATTTAATTTTAAAAGAACTAAAATTGTTTTGATTAAAGGTGTAAGTTGGACAGTTTGGTT
GGGGCGACCGCCTTCTAAAAAGTAACGAAGGCGTACATAAGGTAATATATAATAAAATCAAATAAAGGCCTG
ACAGCAAGGAGGACTTACTGAGCTGACACGGGATCGTGGGTTATAATGACCCGTTGGCTTAGGGTGGGATAG
CTAACGAGCAACGAATAAAAGTTACCATAGGGATAACAGCGTAATATCGTTTGAGAGTTCATATCGACGACG
ATGTTTC

#cox1

MNRJ15084_Callyspongia_sp._Curacao

GGATGATAGGTACAGCCTTTAGTATGCTTATTAGGCTAGAATTATCGGCTCCGGGGTCAATGTTAGGGGATGA
TCATTTATATAATGTTATAGTAACAGCCCACGCATTTGTAATGATATTTTTTTTAGTTATGCCAGTAATGATCG
GGGGTTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGTGCTCCAGATATGGCTTTTCCTAGATTAAATAATATT
AGTTTTTGGTTGTTACCTCCAGCGCTTACTTTATTATTAGGTTCGGCTTTTGTGGAACAAGGGGCTGGAACAGG
TTGAACGGTTTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACCCATTCTGGGGGATCTGTGGATATGGTGATATTTAGTC
TTCATTTAGCCGGAATTTCTTCTATATTAGGTGCTATGAATTTTATCACAACAATATTTAATATGAGGGCACCG
GGAATAACTATGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTTTTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATCGTTG
CCAGTATTAGCCGGTGCTATAACAATGCTTTTAACCGATCGAAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCGGCTGG
GGGGGGAGATCCAATATTATATCAACATTTATTCTGATTCTTC

MNRJ17103_Callyspongia_sp._laranja

ATCGGGGGGTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGGGCTCCTGATATGGCTTTCCCTAGATTAAACAA
TATTAGTTTCTGGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTTTATTGTTAGGTTCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCCGGTA
CGGGTTGAACAGTGTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATTCTGGGGGGTCTGTGGATATGGTTATATTT
AGTCTTCATTTAGCAGGAATATCTTCAATATTGGGTGCTATGAATTTTATAACTACAATATTTAATATGAGGGC
ACCAGGGATAACTCTGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTTTTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATC
CTTGCCAGTATTAGCCGGTGCAATAACAATGCTTTTAACTGACCGGAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCAG
CTGGAGGGGGGGATCCAATATTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCTGGAAGTTTA

MNRJ17113_Callyspongia_sp._azul

TAGTTCCATTATATATTGGGGCTCCTGATATGGCTTTCCCTAGATTAAACAATATTAGTTTCTGGTTGTTACCTC
CGGCGCTTACTTTATTGTTAGGTTCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACAGTGTATCCTCCT
TTATCTAGTATTCAAACTCATTCTGGGGGGTCTGTGGATATGGTTATATTTAGTCTTCATTTAGCAGGAATATC
TTCAATATTGGGTGCTATGAATTTTATAACTACAATATTTAATATGAGGGCACCAGGGATAACTCTGGATAGA
ATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTTTTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATCCTTGCCAGTATTAGCCGGTGCA
ATAACAATGCTTTTAACTGACCGGAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGGGATCCAATATT
ATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCT

MNRJ17114_Callyspongia_sp._azul

GCATTTGTAATGATATTTTTTTTAGTTATGCCAGTAATGATCGGGGGGTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATA
TATTGGTGGCTCCTGATATGGCTTTCCCTAGATTAAACAATATTAGTTTCTGGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTT
TATTGTTAGGTTCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACAGTGTATCCTCCTTTATCTAGTATT
CAAACTCATTCTGGGGGGTCTGTGGATATGGTTATATTTAGTCTTCATTTAGCAGGAATATCTTCAATATTGGG
TGCTATGAATTTTATAACTACAATATTTAATATGAGGGCACCAGGGATAACTCTGGATAGAATGCCTTTATTTG
TTTGATCTGTTTTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATCCTTGCCAGTATTAGCCGGTGCAATAACAATGCTTT
TAACTGACCGGAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGGGATCCAATATTATATCAACATTTA
TTTTGATTTTTTGGTCACCCTG

MNRJ17115_Callyspongia_sp._azul

ACTATCGGCTCCGGGGTCTATGTTAGGGGATGATCATTTATATAATGTTATAGTGACAGCTCATGCATTTGTAA
TGATATTTTTTTTAGTTATGCCAGTAATGATCGGGGGGTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGGGCT
CCTGATATGGCTTTCCCTAGATTAAACAATATTAGTTTCTGGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTTTATTGTTAGGT
TCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACAGTGTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATTC
TGGGGGGTCTGTGGATATGGTTATATTTAGTCTTCATTTAGCAGGAATATCTTCAATATTGGGTGCTATGAATT
TTATAACTACAATATTTAATATGAGGGCACCAGGGATAACTCTGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTT
TTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATCCTTGCCAGTATTAGCCGGTGCAATAACAATGCTTTTAACTGACCG
GAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGGGATCCAATATTATATCAACATTTATTTTGATTTTT
TGGTCACC

MNRJ17117_Callyspongia_sp._azul

TTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGGGCTCCTGATATGGCTTTCCCTAGATTAAACAATATTAGTTTCT
GGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTTTATTGTTAGGTTCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACA
GTGTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATTCTGGGGGGTCTGTGGATATGGTTATATTTAGTCTTCATTTA
GCAGGAATATCTTCAATATTGGGTGCTATGAATTTTATAACTACAATATTTAATATGAGGGCACCAGGGATAA
CTCTGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTTTTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATCCTTGCCAGTATT
AGCCGGTGCAATAACAATGCTTTTAACTGACCGGAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGG
GATCCAATATTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCTG

MNRJ17132_Callyspongia_sp._cinza

TATGTTAGGGGATGATCATTTATATAATGTTATAGYGACAGCTCATGCATTTGTAATGATATTTTTTTTAGTTA
TGCCAGTAATGATCGGGGGGTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGGGCTCCTGATATGGCTTTCCCT
AGATTAAACAATATTAGTTTCTGGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTTTATTGTTAGGTTCTGCTTTTGTGGAACA
AGGGGCCGGTACGGGTTGAACAGTGTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATTCTGGGGGGTCTGTGGAT
ATGGTTATATTTAGTCTTCATTTAGCAGGAATATCTTCAATATTGGGTGCTATGAATTTTATAACTACAATATT
TAATATGAGGGCACCAGGGATAACTCTGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTTTTAGTAACTGCTTTTT
TATTATTATTATCCTTGCCAGTATTAGCCGGTGCAATAACAATGCTTTTAACTGACCGGAATTTTAATACTACT
TTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGGGATCCAATATTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACC

MNRJ17133_Callyspongia_sp._cinza

ACTATCGGCTCCGGGGTCTATGTTAGGGGATGATCATTTATATAATGTTATAGTGACAGCTCATGCATTTGTAA
TGATATTTTTTTTAGTTATGCCAGTAATGATCGGGGGGTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGGGCT
CCTGATATGGCTTTCCCTAGATTAAACAATATTAGTTTCTGGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTTTATTGTTAGGT
TCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACAGTGTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATTC
TGGGGGGTCTGTGGATATGGTTATATTTAGTCTTCATTTAGCAGGAATATCTTCAATATTGGGTGCTATGAATT
TTATAACTACAATATTTAATATGAGGGCACCAGGGATAACTCTGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTT
TTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATCCTTGCCAGTATTAGCCGGTGCAATAACAATGCTTTTAACTGACCG
GAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGGGATCCAATATTATATCAACATTTATTTTGATTTTT
TGGTCACC

MNRJ17134_Callyspongia_sp._cinza

ACTATCGGCTCCGGGGTCTATGTTAGGGGATGATCATTTATATAATGTTATAGTGACAGCTCATGCATTTGTAA
TGATATTTTTTTTAGTTATGCCAGTAATGATCGGGGGGTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGGGCT
CCTGATATGGCTTTCCCTAGATTAAACAATATTAGTTTCTGGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTTTATTGTTAGGT
TCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACAGTGTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATTC
TGGGGGGTCTGTGGATATGGTTATATTTAGTCTTCATTTAGCAGGAATATCTTCAATATTGGGTGCTATGAATT
TTATAACTACAATATTTAATATGAGGGCACCAGGGATAACTCTGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTT
TTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATCCTTGCCAGTATTAGCCGGTGCAATAACAATGCTTTTAACTGACCG
GAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGGGATCCAATATTATATCAACATTTATTTTGATTTTT
TGGTCACC

MNRJ17139_Callyspongia_sp._cinza

ACTATCGGCTCCGGGGTCTATGTTAGGGGATGATCATTTATATAATGTTATAGTGACAGCTCATGCATTTGTAA
TGATATTTTTTTTAGTTATGCCAGTAATGATCGGGGGGTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGGGCT
CCTGATATGGCTTTCCCTAGATTAAACAATATTAGTTTCTGGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTTTATTGTTAGGT
TCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACAGTGTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATTC
TGGGGGGTCTGTGGATATGGTTATATTTAGTCTTCATTTAGCAGGAATATCTTCAATATTGGGTGCTATGAATT
TTATAACTACAATATTTAATATGAGGGCACCAGGGATAACTCTGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTT
TTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATCCTTGCCAGTATTAGCCGGTGCAATAACAATGCTTTTAACTGACCG
GAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGGGATCCAATATTATATCAACATTTATTTTGATTTTT
TGGTCACC

MNRJ17149_Callyspongia_sp._laranja

GACTATCGGCTCCGGGGTCTATGTTAGGGGATGATCATTTATATAATGTTATAGCGACAGCTCATGCATTTGTA
ATGATATTTTTTTTAGTTATGCCAGTAATGATCGGGGGGTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGGGC
TCCTGATATGGCTTTCCCTAGATTAAACAATATTAGTTTCTGGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTTTATTGTTAGG
TTCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACAGTGTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATT
CTGGGGGGTCTGTGGATATGGTTATATTTAGTCTTCATTTAGCAGGAATATCTTCAATATTGGGTGCTATGAAT
TTTATAACTACAATATTTAATATGAGGGCACCAGGGATAACTCTGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGT
TTTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATCCTTGCCAGTATTAGCCGGTGCAATAACAATGCTTTTAACTGACCG
GAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGGGATCCAATATTATATCAACATTTATTTTGATTTTT
TGGTCAC

MNRJ17150_Callyspongia_sp._laranja

GCTCCGGGGTCTATGTTAGGGGATGATCATTTATATAATGTTATAGTGACAGCTCATGCATTTGTAATGATATT
TTTTTTAGTTATGCCAGTAATGATCGGGGGGTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGGGCTCCTGATA
TGGCTTTCCCTAGATTAAACAATATTAGTTTCTGGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTTTATTGTTAGGTTCTGCTT
TTGTGGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACAGTGTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATTCTGGGGG
GTCTGTGGATATGGTTATATTTAGTCTTCATTTAGCAGGAATATCTTCAATATTGGGTGCTATGAATTTTATAA
CTACAATATTTAATATGAGGGCACCAGGGATAACTCTGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTTTTAGTA
ACTGCTTTTTTATTATTATTATCCTTGCCAGTATTAGCCGGTGCAATAACAATGCTTTTAACTGACCGGAATTTT
AATACTACTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGGGATCCAATATTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCA
C

MNRJ17148_Callyspongia_sp._BA

GATGATAGGTACAGCGTTTAGTATGCTGATTAGATTGGAACTATCGGCTCCGGGGTCTATGTTAGGGGATGAT
CATTTATATAATGTTATAGTGACAGCTCATGCATTTGTAATGATATTTTTTTTAGTTATGCCAGTAATGATCGG
GGGGTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGGGCTCCTGATATGGCTTTCCCTAGATTAAACAATATTA
GTTTCTGGTTGTTACCTCCGGCGCTTACTTTATTGTTAGGTTCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCCGGTACGGGT
TGAACAGTGTATCCTCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATTCTGGGGGGTCTGTGGATATGGTTATATTTAGTCT
TCATTTAGCAGGAATATCTTCAATATTGGGTGCTATGAATTTTATAACTACAATATTTAATATGAGGGCACCAG
GGATAACTCTGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTTTTAGTAACTGCTTTTTTATTATTATTATCCTTGC
CAGTATTAGCCGGTGCAATAACAATGCTTTTAACTGACCGGAATTTTAATACTACTTTTTTTGATCCAGCTGGA
GGGGGGGATCCAATATTATATCAACATTTATTTTGATTYTTTGGTCAC

UFAL900_Callyspongia_sp._AL

GATGATAGGTACAGCATTTAGTATGCTTATTAGATTAGAACTATCTGCCCCGGGGTCTATGTTAGGGGATGAT
CATTTATATAATGTTATAGTAACAGCTCATGCATTTGTAATGATATTTTTTTTAGTTATGCCAGTAATGATAGG
GGGTTTTGGTAATTGGTTAGTTCCATTATATATTGGTGCTCCTGATATGGCTTTTCCTAGATTAAATAATATTA
GTTTTTGGTTATTACCTCCAGCGCTTACTCTATTGTTAGGTTCTGCTTTTGTGGAACAAGGGGCTGGGACAGGT
TGAACGGTTTATCCGCCTTTATCTAGTATTCAAACTCATTCTGGGGGATCTGTGGACATGGTGATATTTAGTCT
TCATTTAGCAGGAATATCTTCTATATTGGGTGCTATGAACTTTATAACGACAATTTTTAATATGAGGGCACCGG
GGATAACTATGGATAGAATGCCTTTATTTGTTTGATCTGTTTTAGTGACTGCCTTTTTATTATTATTATCATTGC
CAGTATTAGCCGGTGCTATAACAATGCTTTTAACCGATCGAAACTTTAATACTACTTTTTTTGATCCGGCTGGA
GGGGGGGATCCAATATTGTATCAACATTTATTTTGATTYTTTGGTCAC

Fonte: O autor, 2016.