



Universidade do Estado do Rio De Janeiro  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thiago Silva de Paula

**Filogenia molecular, evolução de características morfológicas, variabilidade populacional, biogeografia e metabolômica comparativa: rumo a uma biologia integrativa para o gênero *Mycale* Gray, 1867 (Porifera)**

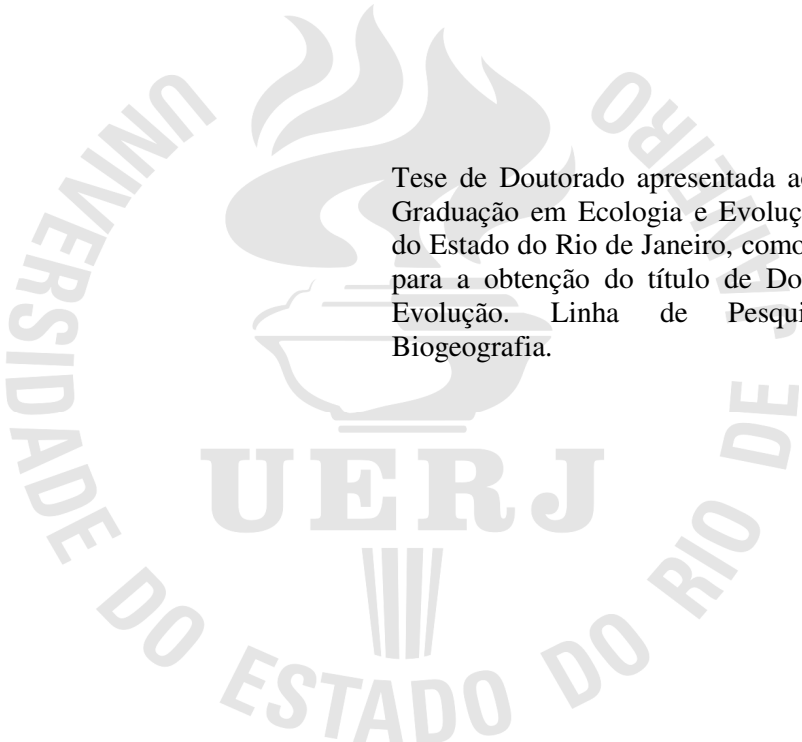
Volume 1

Rio de Janeiro  
2013

Thiago Silva de Paula

**Filogenia molecular, evolução de características morfológicas, variabilidade populacional, biogeografia e metabolômica comparativa: rumo a uma biologia integrativa para o gênero *Mycale* Gray, 1867 (Porifera)**

Volume 1



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ecologia e Evolução. Linha de Pesquisa: Filogenia e Biogeografia.

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Lôbo Hajdu

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Carlos Meduna Hajdu

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

P324

De Paula, Thiago Silva

Filogenia molecular, evolução de características morfológicas, variabilidade populacional, biogeografia e metabolômica comparativa: rumo a uma biologia integrativa para o gênero *Mycale* Gray, 1867 (Porifera) / Thiago Silva de Paula. – 2013.

f: 2v.

Orientadora: Gisele Lôbo Hajdu

Coorientador: Eduardo Carlos Meduna Hajdu.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

Inclui bibliografia.

1. Filogenia - Teses. 2. Evolução (Biologia) – Teses. 3 Biogeografia - Teses. 4. Metabolômica – Teses. I. Hajdu, Gisele Lôbo. II. Hajdu, Eduardo Carlos Medina. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 575.86

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

---

Assinatura

---

Data

Thiago Silva de Paula

**Filogenia molecular, evolução de características morfológicas, variabilidade populacional, biogeografia e metabólica comparativa: rumo a uma biologia integrativa para o gênero *Mycale* Gray, 1867 (Porifera)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ecologia e Evolução. Linha de Pesquisa: Filogenia e Biogeografia.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2013.

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Lena Geise  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

---

Prof. Dr. Eduardo Carlos Meduna Hajdu  
Museu Nacional da UFRJ

---

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio  
Instituto de Biociências da USP

---

Prof. Dr. Cristiano Valentim da Silva Lazoski  
Instituto de Biologia da UFRJ

Rio de Janeiro

2013

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é apenas resultado da conclusão do meu Doutorado, mas sim, fruto de anos de formação, a qual não seria possível sem o apoio, atenção, orientação e discussão das mais variadas pessoas, ao longo desse tempo. E, sendo assim, agradecer ao mundo pelo o que você é não é uma tarefa fácil, e, eventualmente, alguém muito importante na sua vida será “esquecida” neste momento. Às milhares de pessoas que passaram por minha vida e que não estão listadas aqui: obrigado.

Agradeço especialmente:

À Profa. Dra. Gisele Lôbo Hajdu, do Depto. de Genética da UERJ, minha orientadora, pela pelo apoio nas coletas de material, delineamento experimental, discussões e revisão deste manuscrito, além do incentivo, amizade, dedicação, confiança e paciência despendida nestes últimos anos, que, como não poderia ser de outra forma, me abraçou como filhote desde nossos primeiros contatos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Carlos Meduna Hajdu, do Depto. de Invertebrados do Museu Nacional da UFRJ, meu coorientador, pelo apoio nas coletas de material, discussões e revisão deste manuscrito, além do incentivo a realizar sempre um trabalho de qualidade.

Ao Dr. Bruno Cosme da Silva Gomes pela amizade, apoio, discussões e incentivo.

À Profa. Dra. Luzineide Wanderley Tinoco, do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da UFRJ, pela atenção e apoio metodológico nas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas e ao M.Sc. Gustavo Sette, ambos do Laboratório de Radioclimatologia e Mudanças Globais (LARAMG) do Depto. de Biofísica e Biometria da UERJ, pela utilização de equipamento.

À Profa. Dra. Norma Albarello e ao M.Sc. Ivan Gonçalves Ribeiro, do Laboratório Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN) do Depto. de Biologia Vegetal da UERJ, pela utilização das instalações e de equipamento.

Ao Prof. Dr. Marcelo Aguiar Costa Lima do Depto. de Genética da UERJ, ao Prof. Dr. Paulo Marques Machado Britto, do Depto. de Zoologia da UERJ, e ao Prof. Dr. Lúcio Paulo do Amaral Crivano Machado, do Depto. de Ensino de Ciências da UERJ, pela amizade e apoio.

Aos pesquisadores Dra. Barbara Calcinai, do Depto de Ciências do Mar da UNIVPM (Itália) e M.Sc. Holly Bolick, do Depto de Zoologia de Invertebrados do BPBM (Havaí), pelo envio de amostras.

Ao Museu Nacional do Rio de Janeiro (MN/UFRJ), especialmente ao Laboratório de Taxonomia de Porifera (TAXPO) pela concessão de material, e aos devidos coletores que providenciaram a coleção de Porifera ao longo desses anos, em especial ao Dr. Eduardo Hajdu, a Dra. Gisele Lôbo-Hajdu, o Dr. Guilherme Muricy e o Dr. Philippe Willenz.

À minha banca de defesa de dissertação, pela paciência em revisar toda minha prolixia, e pelos comentários valiosos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Marinha (LGMar) do Depto. de Genética da UERJ, atuais e passados.

Aos colegas, amigos e funcionários do Depto. de Genética da UERJ e do Depto de Biologia Celular da UERJ

Aos colegas e professores de graduação e pós-graduação.

Aos amigos de idéias e de bar Feijó, Japa, Ivan, Lupa, Eduardo e Fausto, pelas discussões e idéias sobre o mundo, o universo e tudo mais.

Aos amigos Thiago, Peter, Marco André, e Luana, pelos momentos de descontração e pelas sessões em um mundo fora daqui.

Aos membros do *My Pixel is Bigger* Winterhoof-US, em especial Bolt, Mok, Oz, Ox, Nog, Mav e Wrath, pelas noites de diversão nos anos iniciais de frustração deste trabalho.

Ao grande amigo Tikão, por tudo.

Aos meus pais, Leles e Ivana, e a minha irmã Marcele, pelo apoio, atenção e educação, os quais fizeram de mim boa parte de quem eu sou.

E, por fim, agradeço à Tatiana, pela atenção, companhia, dedicação, apoio e paciência ao longo desse trabalho.

De fim a fim com trabalho árduo;  
E aqui, pobre imbecil, com todo meu saber  
Eu não sou mais sábio do que antes.

*Johann Wolfgang von Goethe, Fausto*

## RESUMO

DE PAULA, Thiago Silva. *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 Alcântara Gomes, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O objetivo desta tese foi abordar a diversidade de *Mycale* Gray, 1867 sob um ponto de vista multidisciplinar. No Capítulo 1 foram realizadas reconstruções filogenéticas supra- e subgenéricas com base em dados moleculares, utilizando os marcadores 16S, 28S e *cox1*, a fim de estabelecer uma hipótese evolutiva para o grupo. No capítulo 2 são realizadas reconstruções ancestrais das características morfológicas do gênero dada a hipótese filogenética estabelecida no capítulo anterior, além de determinar limites na variação morfológica das anisoquetas tipo I por meio de análises morfométricas e estimar o padrão evolutivo das dimensões dos principais tipos espiculares de *Mycale*. No Capítulo 3 foi estimada a variabilidade genética do complexo *Mycale* (*Carmia*) *microsigmatosa* Arndt, 1927 por meio de análise de haplótipos do gene 16S do RNA ribossomal mitocondrial, além de correlacionar a sua variabilidade morfológica, estimada por meio de dimensões espiculares, com fatores genéticos e geográficos. No Capítulo 4 foram estabelecidas hipóteses biogeográficas para *Mycale* por meio de análise de três itens tendo como base as reconstruções filogenéticas moleculares e também foram determinados padrões de distribuição geográfica do gênero a partir da ocorrência de espécies em áreas de endemismo. Por fim, no Capítulo 5, os perfis metabólicos de três espécies do gênero *Mycale* foram obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos núcleos de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e comparados estatisticamente, além de suas similaridades terem sido contrastadas com suas relações filogenéticas e suas diferenças entre grupos de indivíduos metabolicamente relacionados determinadas.

Palavras-chaves: Sistemática. Biodiversidade. Poecilosclerida. Multidisciplinaridade.



## ABSTRACT

DE PAULA, Thiago Silva. *Molecular phylogeny, character evolution, populational variability, biogeography and comparative metabolomics: towards an integrative biology for the genus Mycale Gray, 1867 (Demospongia: Poecilosclerida)*. 2013. 2 v. Thesis (Doctor of Philosophy in Ecology and Evolution) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The aim of this thesis was to address the diversity of *Mycale* Gray, 1867 under a multi-disciplinary perspective. In Chapter 1 were carried out phylogenetic reconstructions based on molecular data at the supra- and sub-generic levels, using the 16S, 28S and *cox1* markers, in order to establish evolutionary hypothesis for the group. In chapter 2 were performed ancestral state reconstructions for the morphological characteristics of the genus, given the phylogenetic hypothesis established in the previous chapter, the limits in the morphological variation of anisochelae type I were determine by morphometric analysis and the evolutionary pattern of the *Mycale's* main spicule types dimensions were estimated. In Chapter 3 the genetic variability of complex *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927 were estimated by haplotype analysis of 16S gene, and it was correlated with its morphological variability, which were estimated by the dimensions of the spicules, against genetic and geographical factors. In Chapter 4 biogeographic hypotheses were inferred through Three-item analysis based on molecular phylogenies, and patterns of geographic distribution were determined based on the occurrence of species of *Mycale* in areas of endemism. Finally, in Chapter 5, the metabolic profiles of three species of the genus *Mycale* were obtained by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of hydrogen nuclei ( $^1\text{H}$  NMR) and statistically compared, their similarities were contrasted against their evolutionary relationships and their differences among groups of individuals metabolically related were determined.

Keywords: Systematics. Biodiversity. Poecilosclerida. Multidisciplinarity.

## LISTA DE FIGURAS

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Figura I.1 –  | Duas hipóteses filogenéticas recentes contrastantes para as relações de Porifera com os demais Metazoários .....  | 28 |
| Figura I.2 –  | Plano corporal básico de uma esponja .....  | 30 |
| Figura I.3 –  | Ilustrações esquemáticas dos principais elementos morfológicos em <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....  | 32 |
| Figura I.4 –  | Variação do número e nível taxonômico dos táxons associados à <i>Mycale</i> Gray, 1867 ao longo do tempo em relação às revisões taxonômicas realizadas .....  | 38 |
| Figura 1.1 –  | Filogenia para o gênero <i>Mycale</i> Gray, 1867 obtida por Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994) .....  | 43 |
| Figura 1.2 –  | Árvore consenso de maioria para as relações filogenéticas entre os subgêneros de <i>Mycale</i> obtida por Hajdu (1999) .....  | 44 |
| Figura 1.3 –  | Relações evolutivas entre <i>Mycale</i> Gray, 1867 e outras Poecilosclerida inferidas a partir do gene 28S do RNA ribossomal (RNAr) .....   | 46 |
| Figura 1.4 –  | Filogramas de <i>Mycale</i> Gray, 1867 reconstruídos por Loh <i>et al.</i> (2011) a partir de dados moleculares .....   | 47 |
| Figura 1.5 –  | Gráfico de dispersão entre distância genética e transições e transversões de pares de sequências dos alinhamentos 16S-supra (A) e 16S-sub (B) .....   | 59 |
| Figura 1.6 –  | Gráfico de dispersão entre distância genética e transições e transversões de pares de sequências dos alinhamentos 28S-supra (A) e 28S-sub (B) .....   | 60 |
| Figura 1.7 –  | Gráfico de dispersão entre distância genética e transições e transversões de pares de sequências do alinhamento <i>cox1</i> considerando todas as posições (A) e independentemente para cada posição do código genético (B) ..... | 61 |
| Figura 1.8 –  | Matriz de distâncias genéticas pareadas entre sequências do alinhamento 16S-supra .....   | 64 |
| Figura 1.9 –  | Matriz de distâncias genéticas pareadas entre sequências do alinhamento 16S-sub .....   | 65 |
| Figura 1.10 – | Matriz de distâncias genéticas pareadas entre sequências do alinhamento 28S-supra .....   | 66 |
| Figura 1.11 – | Matriz de distâncias genéticas pareadas entre sequências do alinhamento 28S-sub .....   | 67 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.12 – Matriz de distâncias genéticas pareadas entre sequências do alinhamento <i>cox1</i> .....   | 68 |
| Figura 1.13 – Reconstrução filogenética supragenérica de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando o marcador 16S (16S-supra) pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) ..... | 71 |
| Figura 1.14 – Reconstrução filogenética supragenérica de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando o marcador 16S (16S-supra) pelo método de Inferência Bayesiana (BI) .....   | 72 |
| Figura 1.15 – Reconstrução filogenética subgenérica de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando o marcador 16S (16S-sub) pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) .....     | 73 |
| Figura 1.16 – Reconstrução filogenética subgenérica de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando o marcador 16S (16S-sub) pelo método de Inferência Bayesiana (BI) .....       | 74 |
| Figura 1.17 – Reconstrução filogenética supragenérica de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando o marcador 28S (28S-supra) pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) ..... | 76 |
| Figura 1.18 – Reconstrução filogenética supragenérica de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando o marcador 28S (28S-supra) pelo método de Inferência Bayesiana (BI) .....   | 77 |
| Figura 1.19 – Reconstrução filogenética subgenérica de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando o marcador 28S (28S-sub) pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) .....     | 78 |
| Figura 1.20 – Reconstrução filogenética subgenérica de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando o marcador 28S (28S-sub) pelo método de Inferência Bayesiana (BI) .....       | 79 |
| Figura 1.21 – Reconstrução filogenética de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando o marcador <i>cox1</i> pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) .....                   | 81 |
| Figura 1.22 – Reconstrução filogenética de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando o marcador <i>cox1</i> pelo método de Inferência Bayesiana (BI) .....                     | 82 |
| Figura 1.23 – Reconstrução filogenética de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando dados combinados de 16S e 28S pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) .....            | 84 |
| Figura 1.24 – Reconstrução filogenética de <i>Mycale</i> Gray, 1867, utilizando dados combinados de 16S e 28S pelo método de Inferência Bayesiana (BI) .....              | 85 |
| Figura 1.25 – Clados de <i>Mycalina</i> deduzidos a partir dos resultados deste trabalho e outros disponíveis na literatura .....   | 95 |
| Figura 1.26 – Sumário das relações filogenéticas entre espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867 obtido a partir das reconstruções realizadas por meio de dados                |    |

|               |  |     |
|---------------|--|-----|
|               | moleculares .....  | 106 |
| Figura 2.1 –  | Exemplos da diversidade morfológica encontrada em <i>Mycale</i> Gray, 1867   | 108 |
| Figura 2.2 –  | Ilustrações esquemáticas de algumas das possíveis formas de crescimento (A-F) e esculturações superficiais (G-L) encontradas em <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....   | 109 |
| Figura 2.3 –  | Exudação de muco em <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....   | 110 |
| Figura 2.4 –  | Organização típica dos esqueletos ectossomal (A-C) e coanossomal (D-F) encontrada em espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....  | 112 |
| Figura 2.5 –  | Principais microscleras de <i>Mycale</i> Gray, 1927 .....  | 114 |
| Figura 2.6 –  | Exemplos de características microscópicas observadas nas anisoquelas de <i>Mycale</i> Gray, 1927 .....   | 115 |
| Figura 2.7 –  | Hipóteses de evolução das micracantóxeas de Mycalidae. segundo a filogenia proposta por Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994) .....   | 118 |
| Figura 2.8 –  | Esquema das mensurações realizadas para análise morfométrica das anisoquelas tipo I encontradas no gênero <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....   | 122 |
| Figura 2.9 –  | Cladogramas expressando as hipóteses filogenéticas de <i>Mycale</i> Gray, 1867 assumidas para a análise morfométrica comparativa das principais espículas encontradas no gênero (esquerda) e para a reconstrução de características ancestrais por parcimônia das características morfológicas (direita) ..... | 124 |
| Figura 2.10 – | Análise morfométrica das anisoquelas I encontradas em <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....   | 130 |
| Figura 2.11 – | Gráfico de dispersão entre o comprimento do subtilóstilo I (L) e sua largura (W) das espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867, analisadas neste trabalho   | 131 |
| Figura 2.12 – | Gráfico de dispersão entre o comprimento do subtilóstilo I (L) e o comprimento da sigma I (S) das espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867, analisadas neste trabalho .....  | 132 |
| Figura 2.13 – | Gráfico de dispersão entre o comprimento do subtilóstilo I (L) e o comprimento da anisoquela I (A) das espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867, analisadas neste trabalho .....   | 133 |
| Figura 2.14 – | Evolução das características morfológicas de <i>Mycale</i> Gray, 1867, determinada pela reconstrução de estados ancestrais por parcimônia .....  | 139 |
| Figura 2.15 – | Evolução das características morfológicas de <i>Mycale</i> Gray, 1867, determinada pela reconstrução de estados ancestrais por parcimônia .....  | 140 |

|               |   |     |
|---------------|---|-----|
| Figura 2.16 – | Evolução das características morfológicas de <i>Mycale</i> Gray, 1867, determinada pela reconstrução de estados ancestrais por parcimônia .....                             | 141 |
| Figura 2.17 – | Evolução das características morfológicas de <i>Mycale</i> Gray, 1867, determinada pela reconstrução de estados ancestrais por parcimônia .....                             | 142 |
| Figura 2.18 – | Hipótese de evolução das ráfides, toxas, rafidotoxas, micróxeas e micracantóxeas de <i>Mycale</i> Gray, 1867 segundo as relações filogenéticas obtidas neste trabalho ..... | 156 |
| Figura 3.1 –  | Ilustração dos efeitos da plasticidade fenotípica e da ocorrência de espécies crípticas sobre a diversidade .....   | 164 |
| Figura 3.2 –  | Varição morfológica, arquitetura esquelética e tipos espiculares encontrados em <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....                                     | 167 |
| Figura 3.3 –  | Distribuição geográfica dos haplótipos do gene 16S do DNA mitocondrial do complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....                                  | 176 |
| Figura 3.4 –  | Rede de haplótipos baseada no gene 16S do DNA mitocondrial do complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....  | 177 |
| Figura 3.5 –  | Dendrograma entre as localidades do complexo <i>Mycale microsigmatosa</i> Arndt, 1927 estimada a partir do gene 16S do DNA mitocondrial .....                               | 180 |
| Figura 3.6 –  | Correlações entre os parâmetros morfométricos do complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....   | 185 |
| Figura 3.7 –  | Variabilidade morfológica entre os haplótipos do complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 encontrados no Rio de Janeiro .....                             | 186 |
| Figura 3.8 –  | Variabilidade morfológica entre as localidades do haplótipo A do complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....   | 187 |
| Figura 3.9 –  | Variabilidade morfológica entre as localidades do haplótipo B do complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....   | 188 |
| Figura 4.1 –  | Dendrograma das relações hierárquicas entre reinos marinhos com base na distribuição geográfica de espécies obtido por van Soest e colaboradores (2012) .....               | 201 |
| Figura 4.2 –  | Cladograma geral de área com base nas relações filogenéticas do gênero <i>Mycale</i> Gray, 1867 obtido por Hajdu (1995) .....   | 202 |
| Figura 4.3 –  | Cladogramas de táxons utilizados para as análises biogeográficas de <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....  | 205 |
| Figura 4.4 –  | Reinos biogeográficos conforme definidos por Spalding e colaboradores (2007) .....  | 206 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 4.5 – Inferência biogeográfica entre as áreas de endemismo das espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867 a partir das hipóteses filogenéticas mais conservadora (A) e abrangente (B) por meio de análise de três itens (3ia) ..... | 210 |
| Figura 4.6 – Padrões de distribuição geográfica inferidos a partir da totalidade dos registros de espécies válidas descritas para o gênero <i>Mycale</i> Gray, 1867 ..   | 212 |
| Figura 5.1 – Perfis metabólicos de espécies de Homoscleromorpha e classificação gerada a partir de dados moleculares e metabolômicos .....   | 221 |
| Figura 5.2 – Estrutura química de alguns dos principais compostos químicos isolados a partir de espécies do gênero <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....  | 222 |
| Figura 5.3 – Princípio da espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN) .....   | 225 |
| Figura 5.4 – Intensidade de sinais de frequência obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) em função do deslocamento químico .....   | 226 |
| Figura 5.5 – Efeito do acoplamento escalar na espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) .....   | 228 |
| Figura 5.6 – Exemplo do espectro de RMN <sup>1</sup> H do etanol plotado como intensidade do sinal contra o deslocamento químico .....   | 229 |
| Figura 5.7 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) obtidos para as amostras de <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....  | 235 |
| Figura 5.8 – Análise dos perfis metabólicos de <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....  | 237 |
| Figura 5.9 – Topologia das relações entre as amostras de <i>Mycale</i> Gray, 1867, obtida por Inferência bayesiana (BI) binária a partir dos sinais encontrados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H .....                            | 238 |
| Figura 5.10 – Diferenças interespecíficas dos perfis metabólicos das espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867, para os espectros de RMN <sup>1</sup> H na faixa de 9,5 a 5,5 ppm .....   | 240 |
| Figura 5.11 – Diferenças interespecíficas dos perfis metabólicos das espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867, para os espectros de RMN <sup>1</sup> H na faixa de 4,5 a 0,5 ppm .....   | 241 |
| Figura 5.12 – Diferenças intraespecíficas dos perfis metabólicos das espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867, para os espectros de RMN <sup>1</sup> H na faixa de 9,5 a 5,5 ppm .....   | 242 |
| Figura 5.13 – Diferenças intraespecíficas dos perfis metabólicos das espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867, para os espectros de RMN <sup>1</sup> H na faixa de 4,5 a 0,5 ppm .....   | 243 |



## LISTA DE TABELAS

|              |   |     |
|--------------|---|-----|
| Tabela I.1 – | Classificação dos táxons associados à <i>Mycale</i> Gray, 1867 ao longo do tempo em relação às revisões taxonômicas realizadas .....                              | 37  |
| Tabela 1.1 – | Resumo dos melhores modelos de substituição de nucleotídeos estimados a partir de cada alinhamento .....  | 57  |
| Tabela 2.1 – | Medidas das principais espículas encontradas no gênero <i>Mycale</i> Gray, 1867, das espécies analisadas neste trabalho .....                                     | 126 |
| Tabela 2.2 – | Medidas dos parâmetros morfométricos das anisoquelas tipo I de espécies de <i>Mycale</i> , Gray, 1867 .....   | 128 |
| Tabela 2.3 – | Valores dos parâmetros morfométricos para as diferentes formas de anisoquelas tipo I de <i>Mycale</i> , Gray, 1867 .....  | 129 |
| Tabela 2.4 – | Matriz das características morfológicas tabuladas para as espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867, analisadas neste trabalho .....                                   | 137 |
| Tabela 2.5 – | Sumário da diagnose das características morfológicas de <i>Mycale</i> Gray, 1867, dada a hipótese filogenética aceita com base em dados moleculares .             | 143 |
| Tabela 2.6 – | Comparação das características morfológicas entre os grupos de <i>Mycale</i> Gray, 1867 definidos neste trabalho .....  | 161 |
| Tabela 3.1 – | Comparação entre as dimensões espiculares de diferentes populações de <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....                                     | 168 |
| Tabela 3.2 – | Comparação entre as características morfológicas de <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 com outras espécies correlatas .....                        | 169 |
| Tabela 3.3 – | Resumo das posições variáveis do gene 16S do DNA mitocondrial entre os haplótipos encontrados no complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 ..... | 175 |
| Tabela 3.4 – | Frequência e distribuição dos haplótipos de 16S encontrados no complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....                                   | 176 |
| Tabela 3.5 – | Sumário dos testes de qui-quadrado para cada localidade de ocorrência dos haplótipos de 16S do complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....   | 178 |
| Tabela 3.6 – | Diversidade genética das localidades do complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 estimada a partir do gene 16S do DNA mitocondrial .....        | 179 |
| Tabela 3.7 – | Sumário dos testes de diferenciação populacional do complexo <i>Mycale</i>  |     |



|               |  |     |
|---------------|--|-----|
|               | <i>(Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....   | 179 |
| Tabela 3.8 –  | Médias e desvios-padrão das variáveis morfométricas das amostras do complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....   | 181 |
| Tabela 3.9 –  | Correlações entre as variáveis morfométricas do complexo <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....   | 184 |
| Tabela 3.10 – | Sumário dos Testes Multivariados de Significância (MTS) entre os haplótipos e localidades do complexo de <i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i> Arndt, 1927 .....   | 186 |
| Tabela 4.1 –  | Áreas de endemismo das espécies utilizadas na inferência biogeográfica de <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....   | 207 |
| Tabela 4.2 –  | Lista das afirmações de três itens (3is) produzida pela inferência biogeográfica por meio de análise de três itens (3ia) a partir do cladograma abrangendo as hipóteses filogenéticas mais conservadora (A) e abrangente (B) de <i>Mycale</i> Gray, 1867 ..... | 209 |
| Tabela 4.3 –  | Matriz quadrada indicando o número de espécies reportadas ocorrer nas mesmas áreas .....   | 211 |
| Tabela 5.1 –  | Sumário do procedimento de extração metanólica dos metabólitos de <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....   | 234 |
| Tabela 5.2 –  | Sumário da análise de componentes principais (PCA) dos espectros de RMN <sup>1</sup> H .....   | 236 |
| Tabela 5.3 –  | Diferença aproximada na intensidade dos sinais de frequência encontrados nos intervalos de deslocamento químico dos espectros de RMN <sup>1</sup> H das espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....   | 239 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                            |   |
|----------------------------|---|
| 16S –                      | gene 16S do RNAr mitocondrial   |
| 16S-sub –                  | no âmbito deste trabalho, alinhamento de sequências de 16S abrangendo somente representantes sub-genéricos de <i>Mycale</i> |
| 16S-supra –                | no âmbito deste trabalho, alinhamento de sequências de 16S abrangendo representantes supra-genéricos a <i>Mycale</i>        |
| 18S –                      | gene 18S do RNAr nuclear  |
| 28S –                      | gene 28S do RNAr nuclear  |
| 28S-sub –                  | no âmbito deste trabalho, alinhamento de sequências de 28S abrangendo somente representantes sub-genéricos de <i>Mycale</i> |
| 28S-supra –                | no âmbito deste trabalho, alinhamento de sequências de 28S abrangendo representantes supra-genéricos a <i>Mycale</i>        |
| 3ia –                      | Análise de três itens, do inglês <i>Three-item analysis</i>   |
| A –                        | comprimento total da anisoquela-I   |
| A –                        | Ártico  |
| <i>Aeg.</i> –              | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Aegogropila</i>   |
| AICc –                     | Critério de Informação de Akaike corrigido, do inglês <i>Akaike Information Criterion, corrected</i>                        |
| <i>Ano.</i> –              | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Anomomycale</i>   |
| <i>Are.</i> –              | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Arenochalina</i>  |
| BI –                       | Inferência Bayeasiana, do inglês <i>Bayesian Inference</i>  |
| BIC –                      | Critério de Informação Bayesiana, do inglês <i>Bayesian Information Criterion</i>   |
| BLAST –                    | Ferramenta Local Básica da Busca do Alinhamento, do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                         |
| BPBM –                     | Museu Bernice Pauahi Bishop do Havaí, <i>Bernice Pauahi Bishop Museum</i>   |
| <i>Car.</i> ou <i>C.</i> – | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Carmia</i>  |
| CHCl <sub>3</sub> –        | clorofórmio   |

|                 |   |
|-----------------|---|
| CI –            | Índice de Consistência, do inglês <i>Consistency Index</i>  |
| CIP –           | Indo-Pacífico Central, do inglês <i>Central Indo-Pacific</i>  |
| Compl –         | Índice de Completude, do inglês <i>completeness index</i>   |
| cox1 –          | gene da subunidade I da Citocromo c oxidase   |
| d –             | distância   |
| D1-D2 –         | intervalo entre as regiões divergentes 1 e 2 do genes 28S   |
| D3-D5 –         | intervalo entre as regiões divergentes 3 e 5 do genes 28S   |
| df –            | grau de liberdade, do inglês <i>degree of freedom</i>   |
| DNA –           | ácido desoxirribonucléico   |
| DNAmit –        | DNA mitocondrial  |
| dNTP –          | desoxinucleotídeos  |
| e.g. –          | por exemplo, do latim <i>exempli gracia</i>   |
| EDTA –          | ácido etileno diaminotetracético  |
| EIP –           | Indo-Pacífico Oriental, do inglês <i>Eastern Indo-Pacific</i>   |
| <i>et al.</i> – | e colaboradores, do latim <i>et alli</i> ,  |
| EUA –           | Estados Unidos da América   |
| evo-devo        | evolução do desenvolvimento, do inglês <i>evolution of development</i>                                |
| FFT –           | Transformação Rápida de Fourier, do inglês <i>Fast Fourier Transform</i>                              |
| FID –           | <i>Free induction decay</i>   |
| Fst –           | índice de fixação   |
| G –             | distribuição gamma  |
| GC –            | Cromatografia gasosa, do inglês <i>Gas chromatography</i>   |
| G-fit –         | Ajuste de Goloboff, do inglês <i>Goloboff's implied weights</i>                                       |
| <i>Gra.</i> –   | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Grapelia</i>  |
| GTR –           | Modelo de substituição generalizado reversível no tempo, do inglês <i>Generalised time-reversible</i> |
| GuHCl –         | hidroclereto de guanidina   |

|                     |   |
|---------------------|---|
| H –                 | diversidade haplotípica   |
| Hav –               | no âmbito deste trabalho, Havaí   |
| HI –                | Índice de Homoplasia, do inglês <i>Homoplasia Index</i>   |
| HPLC –              | cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High-performance liquid chromatography</i> |
| Hz –                | hertz   |
| I –                 | proporção de sítios invariáveis   |
| <i>i.e.</i> –       | isto é, do latim <i>id est</i>  |
| iFW –               | número inteiro do peso fracionário exato, do inglês <i>exact (integer) fractional weight</i>      |
| indels –            | tipo de mutação que inclui inserções e/ou deleções de nucleotídeos                                |
| K80 –               | Modelos de substituição Kimura 2-parâmetros   |
| L –                 | comprimento total do subtilóstilo   |
| lnL –               | logaritmo neperiano dos valores de verossimilhança máxima   |
| LSR –               | Algoritmo de rearranjo de sub-árvores preguiçosas, do inglês <i>Lazy Subtree Rearrangement</i>    |
| M –                 | molar   |
| MCMC –              | Algoritmo de Monte Carlo via cadeias de Markov, do inglês <i>Markov chain Monte Carlo</i>         |
| MgCl <sub>2</sub> – | cloreto de magnésio   |
| MHz –               | megahertz   |
| ML –                | Verossimilhança Máxima, do inglês <i>Maximum Likelihood</i>                                       |
| mM –                | milimolar   |
| MN/UFRJ –           | Museu Nacional / Universidade Federal do Rio de Janeiro   |
| MNRJ –              | Coleção de Poríferos do MN/UFRJ   |
| MS –                | Espectroscopia de massa, do inglês <i>Mass spectroscopy</i>                                       |
| MTS –               | Teste multivariado de Significância, do inglês <i>Multivariate Test of Significance</i>           |

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <i>Myc.</i> ou <i>M.</i> – | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Mycale</i>   |
| N –                        | número amostral  |
| <i>Nav.</i> –              | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Naviculina</i>   |
| NCBI –                     | Centro Nacional para Informação Biotecnológica, do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| ng –                       | nanogramas   |
| NIPALS –                   | <i>Non-Linear Iterative Partial Least Squares</i>  |
| NJ –                       | Agrupamentos de Vizinhos, do inglês <i>Neighbor Joining</i>  |
| nm –                       | nanômetros   |
| OD –                       | Densidade Óptica, do inglês <i>Optic Density</i>   |
| <i>Oxy.</i> –              | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Oxymycale</i>  |
| p –                        | probabilidade  |
| p. –                       | página   |
| Pan –                      | no âmbito deste trabalho, Panamá   |
| <i>Par.</i> –              | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Paresperella</i>   |
| pb –                       | pares de bases   |
| PCA –                      | Análise de Componentes Principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>                               |
| PCR –                      | Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>                                     |
| <i>pers. comm.</i> –       | comunicação pessoal, do inglês <i>personal communication</i>   |
| pH –                       | potencial hidrogeniônica   |
| p <sub>MC</sub> –          | probabilidade do teste exato estimado por Monte Carlo  |
| pp. –                      | páginas  |
| ppm –                      | partes por milhão  |
| PSRF –                     | Fator de Redução de Escala Potencial, do inglês <i>Potential Scale Reduction Factor</i>                        |
| R –                        | razão entre os número de transições e o número de transversões   |
| r –                        | coeficiente de correlação de Pearson   |

|               |  |
|---------------|--|
| R –           | coeficiente de correlação  |
| $R^2$ –       | coeficiente de determinação  |
| RC –          | Índice de Retenção Redimensionado, do inglês <i>Rescaled Retention Index</i>                     |
| <i>Rha.</i> – | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Rhaphidoteca</i>   |
| RI –          | Índice de Retenção, do inglês <i>Retention Index</i>   |
| RMN –         | Ressonância magnética nuclear  |
| RNA –         | ácido ribonucléico   |
| RNAr –        | RNA ribossomal   |
| s –           | transição, tipo de mutação onde ocorre substituição de nucleotídeos com a mesma base nitrogenada |
| S –           | comprimento total da sigma-I   |
| <i>s.s.</i> – | em sentido estrito, do latim <i>strictu sensu</i>  |
| SO –          | Oceano Sul, do inglês <i>Southern Ocean</i>  |
| spp. –        | espécies   |
| T –           | largura máxima da cabeça do subtilóstilo   |
| T –           | Tesla  |
| T92 –         | Modelo de substituição Tamura 3-parâmetros   |
| TA –          | Atlântico Tropical, do inglês, <i>Tropical Atlantic</i>  |
| TAA –         | Australásia Temperada, do inglês <i>Temperate Australasia</i>                                    |
| TEP –         | Pacífico Oriental Tropical, do inglês <i>Tropical Eastern Pacific</i>                            |
| TMS –         | tetrametilsilano   |
| TN93 –        | Modelo de substituição Tamura-Nei  |
| TNA –         | Atlântico Norte Temperado, do inglês <i>Temperate Northern America</i>                           |
| TNP –         | Pacífico Norte Temperado, do inglês <i>Temperate Northern Pacific</i>                            |
| Tris –        | (hidroximetil) aminometano   |
| TSA –         | América do Sul Temperada, do inglês <i>Temperate South America</i>                               |
| TSAF –        | África do Sul Temperada, do inglês <i>Temperate Southern Africa</i>                              |

|                 |  |
|-----------------|--|
| U –             | Unidade, medida de atividade enzimática  |
| UPGMA –         | do inglês <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>                                       |
| v –             | transversões, tipo de mutação onde ocorre substituição de nucleotídeos com bases nitrogenadas diferentes |
| W –             | largura máxima do subtilóstilo   |
| WIP –           | Indo-Pacífico Ocidental, do inglês <i>Western Indo-Pacific</i>   |
| $\chi^2$ –      | qui-quadrado   |
| ZMA –           | Museu Zoológico de Amsterdã, <i>Zoological Museum of Amsterdam</i>                                       |
| ZMAPOR –        | Coleção de Poríferos do ZMA  |
| Zyg. –          | no âmbito deste trabalho, sub-gênero <i>Zygomycete</i>   |
| $\mu\text{g}$ – | microgramas  |
| $\mu\text{l}$ – | microlitros  |
| $\mu\text{M}$ – | micromolar   |
| $\pi$ –         | diversidade nucleotídica   |

## SUMÁRIO

|         |  |    |
|---------|--|----|
|         | <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | 27 |
| 1       | <b>DA FILOGENIA MOLECULAR</b> .....  | 40 |
| 1.1     | <b>Introdução</b> .....  | 40 |
| 1.1.1   | <u>A relevância de aspectos moleculares na sistemática de <i>Mycale</i></u> .....              | 40 |
| 1.1.2   | <u>Relações filogenéticas de <i>Mycale</i> Gray, 1867 com base em dados morfológicos</u> ..... | 42 |
| 1.1.3   | <u>Relações filogenéticas com base em dados moleculares</u> .....                              | 44 |
| 1.1.4   | <u>Objetivos</u> .....   | 47 |
| 1.2     | <b>Material e Métodos</b> .....  | 48 |
| 1.2.1   | <u>Material examinado</u> .....  | 48 |
| 1.2.2   | <u>Extração e quantificação do DNA</u> .....   | 48 |
| 1.2.3   | <u>Marcadores moleculares e amplificação de DNA</u> .....                                      | 49 |
| 1.2.4   | <u>Sequenciamento, edição e alinhamento das sequências</u> .....                               | 50 |
| 1.2.5   | <u>Modelos e saturação de substituição</u> .....   | 53 |
| 1.2.6   | <u>Reconstruções filogenéticas</u> .....   | 54 |
| 1.3     | <b>Resultados</b> .....  | 56 |
| 1.3.1   | <u>Extração, amplificação e sequenciamento</u> .....   | 56 |
| 1.3.2   | <u>Modelos e saturação de substituição</u> .....   | 56 |
| 1.3.3   | <u>Reconstruções filogenéticas</u> .....   | 69 |
| 1.3.3.1 | Reconstruções com o marcador 16S .....   | 69 |
| 1.3.3.2 | Reconstruções com o marcador 28S .....   | 75 |
| 1.3.3.3 | Reconstruções com o marcador <i>cox1</i> .....   | 80 |
| 1.3.3.4 | Reconstruções com os dados combinados de 16S e 28S .....                                       | 83 |
| 1.4     | <b>Discussão</b> .....   | 86 |
| 1.4.1   | <u>Adequação dos marcadores moleculares</u> .....  | 86 |



|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 1.4.2   | <u>Taxas evolutivas e espécies crípticas</u> .....        | 88  |
| 1.4.3   | <u>Relações filogenéticas de Mycalina</u> .....           | 91  |
| 1.4.4   | <u>Relações sub-genéricas de Mycale</u> .....             | 95  |
| 1.4.4.1 | Espécies não relacionadas à <i>Mycale</i> .....           | 95  |
| 1.4.4.2 | Classificação sub-genérica e clados recuperados .....     | 97  |
| 1.4.4.3 | Relações de parentesco entre os clados .....              | 103 |
| 2       | <b>DA EVOLUÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS</b> ..... | 107 |
| 2.1     | <b>Introdução</b> .....                                   | 107 |
| 2.1.1   | <u>Morfologia externa</u> .....                           | 107 |
| 2.1.2   | <u>Estrutura do esqueleto</u> .....                       | 111 |
| 2.1.3   | <u>Elementos do esqueleto</u> .....                       | 112 |
| 2.1.4   | <u>Homologias e homoplasias em Mycale</u> .....           | 117 |
| 2.1.5   | <u>Objetivos</u> .....                                    | 119 |
| 2.2     | <b>Material e Métodos</b> .....                           | 120 |
| 2.2.1   | <u>Tabulação dos dados morfológicos</u> .....             | 120 |
| 2.2.2   | <u>Hipóteses filogenéticas</u> .....                      | 120 |
| 2.2.3   | <u>Morfometria de anisoquelas tipo I</u> .....            | 121 |
| 2.2.4   | <u>Morfometria comparativa das espículas</u> .....        | 123 |
| 2.2.5   | <u>Reconstrução das características ancestrais</u> .....  | 123 |
| 2.3     | <b>Resultados</b> .....                                   | 125 |
| 2.3.1   | <u>Morfometria de anisoquelas tipo I</u> .....            | 125 |
| 2.3.2   | <u>Morfometria comparativa das espículas</u> .....        | 131 |
| 2.3.3   | <u>Reconstrução das características ancestrais</u> .....  | 134 |
| 2.4     | <b>Discussão</b> .....                                    | 144 |
| 2.4.1   | <u>Morfologia das anisoquelas tipo I</u> .....            | 144 |
| 2.4.2   | <u>Dimensões das espículas</u> .....                      | 146 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 2.4.3 | <u>Sinapomorfias dos clados reconhecidos</u> .....  | 148 |
| 2.4.4 | <u>Características homoplásticas</u> .....  | 152 |
| 2.4.5 | <u>Redefinindo os subgêneros?!</u> .....  | 155 |
| 3     | <b>DA VARIABILIDADE POPULACIONAL DE <i>Mycale</i> (<i>Carmia</i>)<br/><i>microsigmatosa</i> ARNDT, 1927</b> ..... | 163 |
| 3.1   | <b>Introdução</b> .....   | 163 |
| 3.1.1 | <u>Variabilidade e delimitação de espécies</u> .....  | 163 |
| 3.1.2 | <u>Variabilidade em <i>Mycale</i> (<i>Carmia</i>) <i>microsigmatosa</i> Arndt, 1927</u> .....                     | 166 |
| 3.1.3 | <u>Espécies correlatas a <i>M. microsigmatosa</i> e sua variabilidade</u> .....                                   | 168 |
| 3.1.4 | <u>Objetivos</u> .....  | 170 |
| 3.2   | <b>Material e Métodos</b> .....   | 171 |
| 3.2.1 | <u>Material examinado</u> .....   | 171 |
| 3.2.2 | <u>Extração, amplificação, sequenciamento, edição e alinhamento de DNA</u> .....                                  | 171 |
| 3.2.3 | <u>Análise de haplótipos</u> .....  | 171 |
| 3.2.4 | <u>Variabilidade morfológica</u> .....  | 173 |
| 3.3   | <b>Resultados</b> .....   | 175 |
| 3.3.1 | <u>Análise de haplótipos</u> .....  | 175 |
| 3.3.2 | <u>Variabilidade morfológica</u> .....  | 180 |
| 3.4   | <b>Discussão</b> .....  | 189 |
| 3.4.1 | <u>16S como marcador populacional</u> .....   | 189 |
| 3.4.2 | <u>Plasticidade <i>versus</i> Cripticismo</u> .....   | 191 |
| 3.4.3 | <u>Distribuição geográfica dos haplótipos</u> .....   | 192 |
| 3.4.4 | <u><i>Mycale</i> sem microscleras</u> .....   | 194 |
| 3.4.5 | <u>Correlações morfométricas</u> .....  | 197 |
| 4     | <b>DA BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA</b> .....  | 199 |
| 4.1   | <b>Introdução</b> .....   | 199 |
| 4.1.1 | <u>Distribuição geográficas das esponjas</u> .....  | 199 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 4.1.2   | <u>Biogeografia de <i>Mycale</i> Gray, 1867</u> .....  | 201 |
| 4.1.3   | <u>Objetivos</u> .....   | 203 |
| 4.2     | <b>Material e Métodos</b> .....  | 204 |
| 4.3     | <b>Resultados</b> .....  | 208 |
| 4.4     | <b>Discussão</b> .....   | 213 |
| 4.4.1   | <u>Biogeografia histórica</u> .....  | 213 |
| 4.4.2   | <u>Padrões de distribuição geográfica</u> .....  | 214 |
| 4.4.3   | <u>Biogeografia de <i>Mycale</i> e padrões de distribuição das esponjas</u> .....              | 216 |
| 5       | <b>DA METABOLÔMICA COMPARADA</b> .....   | 218 |
| 5.1     | <b>Introdução</b> .....  | 218 |
| 5.1.1   | <u>Produtos naturais de esponjas: importância farmacológica e papel ecológico</u> .            | 218 |
| 5.1.2   | <u>Metabolômica comparativa</u> .....  | 219 |
| 5.1.3   | <u>Metabólitos de <i>Mycale</i> Gray, 1867</u> .....   | 220 |
| 5.1.4   | <u>Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear na identificação de moléculas</u><br>..... | 223 |
| 5.1.4.1 | Deslocamento químico .....   | 224 |
| 5.1.4.2 | Acoplamento escalar .....  | 226 |
| 5.1.4.3 | Espectroscopia por RMN do etanol: um exemplo .....   | 227 |
| 5.1.5   | <u>Objetivos</u> .....   | 229 |
| 5.2     | <b>Material e Métodos</b> .....  | 230 |
| 5.2.1   | <u>Coleta de material</u> .....  | 230 |
| 5.2.2   | <u>Extração de metabólitos</u> .....   | 230 |
| 5.2.3   | <u>Ressonância Magnética Nuclear</u> .....   | 231 |
| 5.2.4   | <u>Análise de dados</u> .....  | 231 |
| 5.3     | <b>Resultados</b> .....  | 233 |
| 5.3.1   | <u>Extração dos metabólitos</u> .....  | 233 |
| 5.3.2   | <u>Espectro de RMN <sup>1</sup>H</u> .....   | 233 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 5.3.3 | <u>Análise dos dados</u> .....  | 234 |
| 5.4   | <b>Discussão</b> .....  | 244 |
| 5.4.1 | <u>Aplicação do método</u> .....  | 244 |
| 5.4.2 | <u>Comparação dos perfis metabólicos</u> .....  | 245 |
| 6     | <b>CONCLUSÕES FINAIS</b> .....  | 249 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 256 |
|       | <b>APÊNDICE A</b> - Material examinado .....  | 274 |
|       | <b>APÊNDICE B</b> - Protocolos de extração e amplificação .....   | 287 |
|       | <b>APÊNDICE C</b> - Testes de padronização dos marcadores moleculares .....   | 289 |
|       | <b>APÊNDICE D</b> - Sequências de bancos de dados públicos na Internet utilizadas neste trabalho .....  | 292 |
|       | <b>APÊNDICE E</b> - Estimativa de modelos de substituição de nucleotídeos .....   | 296 |
|       | <b>APÊNDICE F</b> - Dados morfológicos de <i>Mycale</i> Gray, 19867 revisados da literatura e referências utilizadas por espécie .....  | 301 |
|       | <b>APÊNDICE G</b> - Resultado univariado para cada variável dependente (VD) e testes post-hoc de Bonferoni dos Testes Multivariado de Significância (MTS) entre os haplótipos e localidades ..... | 306 |
|       | <b>APÊNDICE H</b> - Matriz de presença e ausência de espécies de <i>Mycale</i> em relação a áreas de endemismo .....  | 310 |
|       | <b>APÊNDICE I</b> - Lista dos metabólitos secundários isolados a partir de espécies de <i>Mycale</i> Gray, 1867 obtida da literatura .....  | 314 |
|       | <b>APÊNDICE J</b> - Lista e matriz de presença e ausência de sinais de frequência dos espectros de RMN <sup>1</sup> H obtidos para as amostras de <i>Mycale</i> Gray, 1867 .....                  | 341 |
|       | <b>ANEXO</b> - Artigo de revisão da Qualificação de Doutorado .....   | 347 |

## INTRODUÇÃO GERAL

### O Filo Porifera

O Filo Porifera compreende os animais invertebrados aquáticos popularmente conhecidos como esponjas. As esponjas estão entre os mais antigos organismos desde a origem da vida na Terra, podendo ter surgido aproximadamente há 760 milhões de anos (BRIAN *et al.*, 2012). Possuem características muito primitivas, como ausência de organização tecidual, sendo consideradas “fósseis vivos” por Müller (1998), embora essa designação ainda seja debatida. Em tempos passados já foram classificados como sendo desde plantas, devido principalmente a seu hábito sésstil, à zoófitos. Grant, em 1836, lhes deu seu próprio lugar ao cunhar o nome Porifera, ‘portador de poros’, tendo sido interpretados como animais basais desde então. Huxley (1875) e Sollas (1884) propuseram a separação das esponjas dos demais animais, definindo-os como Parazoa, principalmente por serem destituídos de camadas germinativas e, portanto, com ausência de tecidos verdadeiros. Contudo, estudos recentes têm mostrado que o epitélio das esponjas são unidades seladas, com proteínas de adesão celular, e membranas basais, e embora elas careçam de neurônios, os tecidos sinciciais das esponjas são, todavia, excitáveis e propagam sinais elétricos (ver referências em LEYS, 2007). A derrocada dessa separação adveio de estudos de biologia evolutiva do desenvolvimento (*Evo-Devo*), demonstrando que as esponjas possuem genes que expressam para a organização do plano corporal, os chamados genes homeobox ou *hox* genes (*e.g.*, SEIMYA *et al.*, 1994; DEGNAN *et al.*, 1995), homólogos aqueles encontrados nos demais metazoários (ver CARROL *et al.*, 2004). Atualmente a filogenia do grupo tem sido amplamente debatida por meio de diversos trabalhos moleculares, sendo sua monofilia constantemente desafiada (*e.g.*, PHILIPPE *et al.*, 2009; SPERLING *et al.*, 2009), todavia, há um certo consenso em relação as relações evolutivas entre as classes de Porifera, onde Demospongiae e Hexactinellida se mostram como grupos-irmãos, mas Calcarea e

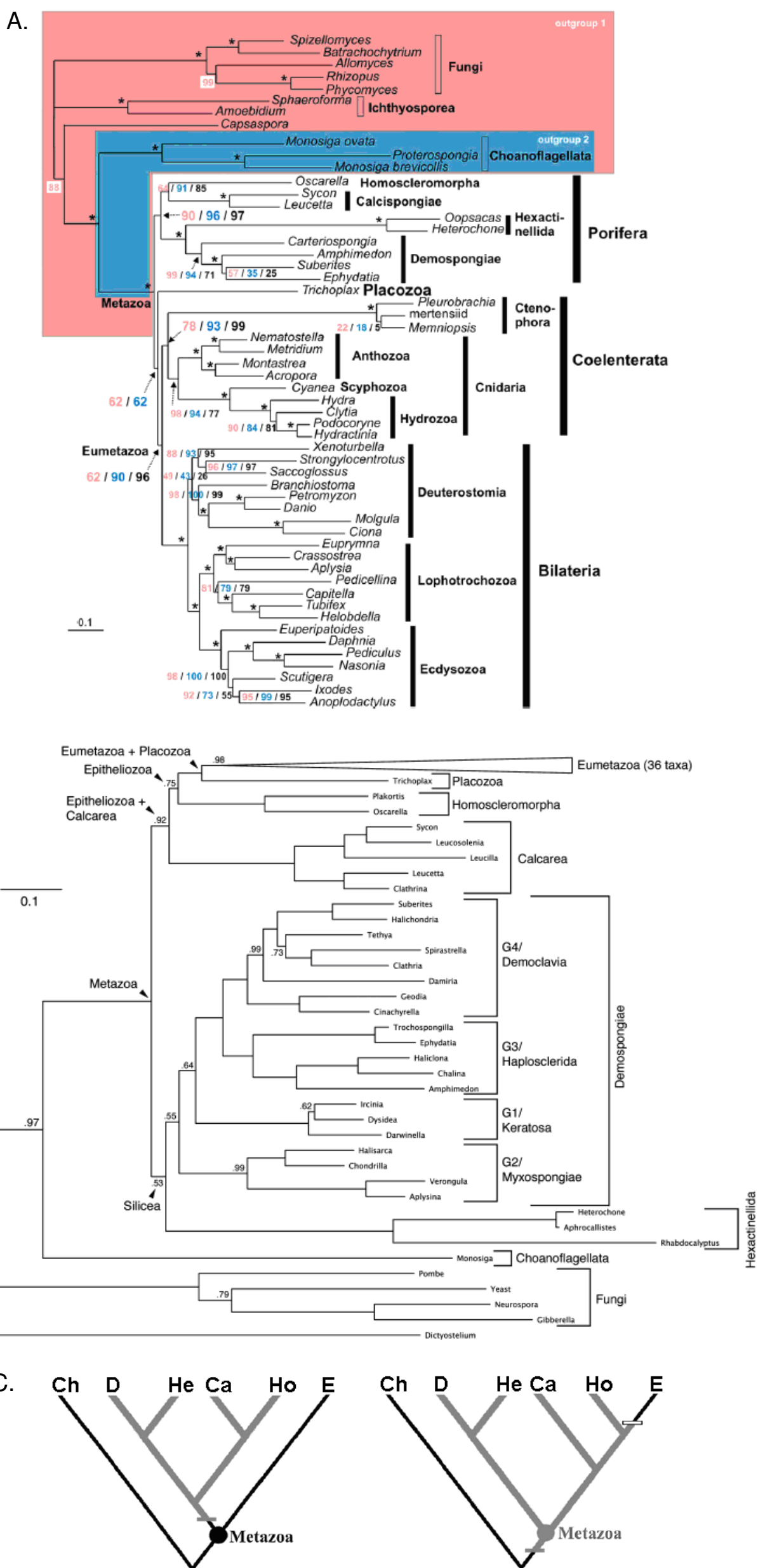


Figura I.1. Duas hipóteses filogenéticas recentes contrastantes para as relações de Porifera com os demais Metazoários. A. Monofilia de Porifera (redesenhado de PHILIPPE *et al.*, 2009). B. Parafilia de Porifera, onde Homoscleromorpha forma, com Eumetazoa um clado chamado Epitheliozoa (redesenhado de SPERLING *et al.*, 2009). C. Sinopse das relações filogenéticas expressas em A (esquerda) e B (direita), onde os ramos terminais abreviados são: Choanoflagellata (Ch); Demospongiae (D); Hexactinellida (He); Calcarea (Ca); Homoscleromorpha (Ho); e Eumetazoa (E). As linhas transversais indicam o ganho (cinza) e perda (branco) de características do plano corporal da esponja, como sistema aquífero, câmaras coanocitárias internalizadas e pinacoderme (adaptado de PHILIPPE *et al.*, 2009).

Homoscleromorpha ora se apresentam também como grupos-irmão ora, alternadamente, como grupos mais próximos dos demais animais (Figura I.1).

As esponjas se caracterizam por serem metazoários com arquitetura corporal exclusivamente celular, sem tecidos verdadeiros, embora haja indícios de apresentarem células precursoras do mesoderma (COUTINHO e MAIA, 2007), predominantemente assimétricos, embora alguns grupos possam apresentar superficialmente uma simetria radial; a maioria de suas células são totipotentes, sendo muito estudadas para fins de entendimento da diferenciação celular, sobretudo com finalidades médicas (MÜLLER *et al.*, 1998). São organismos exclusivamente aquáticos, tanto marinhos quanto dulcícolas, sésseis e suspensívoros, com exceção de um pequeno grupo de esponjas carnívoras (VACELET e BOURY-ESNAULT, 1995). Seus corpos se organizam de maneira a formar um sistema aquífero no qual a água circula por meio da utilização de células flageladas chamadas coanócitos – uma das principais evidências morfológicas para considerar Choanoflagellida grupo irmão de Metazoa (LACKEY, 1959; BORCHIELLINI *et al.*, 2001). A Figura I.2 ilustra e dá mais detalhes da organização corporal básica das esponjas.

Existem mais de oito mil espécies de esponjas, sendo a maioria restrita a zonas bentônicas marinhas. Podem ser encontradas em todas as profundidades, embora a maior diversidade se encontre em áreas não-poluídas e nas regiões recifais. Apresentam uma incrível variação na coloração, e em grande parte esta se encontra relacionada com a presença de simbiontes. Há alguns anos as esponjas vêm despertando atenção dos pesquisadores por produzirem metabólitos secundários com importantes atividades farmacológicas (para uma revisão de metabólitos de organismos marinhos ver referências no Capítulo 4).

O Filo Porifera se subdivide atualmente em quatro Classes já supracitadas. Estas são definidas basicamente pela natureza de seu esqueleto interno, i.e., espículas, matriz de proteínas e arranjo dos elementos do esqueleto. As esponjas calcáreas (Calcarea) possuem espículas inteiramente constituídas de carbonato de cálcio, as esponjas de vidro (Hexactinellida) possuem espículas silicosas com seis raios (hexactinal), as demosponjas (Demospongiae) possuem esqueleto composto por espículas silicosas (não-hexactinal) que pode ser suplementado ou substituído por uma matriz protéica, feita de uma proteína colágena chamada espongina e as homoscleromorfas (Homoscleromorpha) apresentam lâmina basal sublinhando a pinacoderme e coanoderme no epitélio adulto e larval.

Dentro dessa diversidade, se destaca um grupo de demosponjas que representam mais da metade das espécies descritas. Estas esponjas, identificadas molecularmente como

pertencentes a um clado monofilético identificada como G4 ((BORCHIELLINI *et al.*, 2004; LAVROV *et al.*, 2008), incluem grupos taxonômicos diversos como, Poecilosclerida, Hadromerida, Halichondrida, Spongilina e Tetractinellida, o qual, recentemente, foi denominado Heteroscleromozoa (CÁRDENAS *et al.*, 2012). De todos estes, Poecilosclerida, que por si só corresponde a cerca de 30% da diversidade específica de Porifera, é o menos representado nas revisões moleculares recentes, com poucas sequências disponíveis em bancos de dados públicos na internet. Os resultados mais notáveis advindos destes poucos estudos, indica um alto grau de polifilia entre seus táxons supra-genéricos. Por exemplo, Raspailiidae Hentschel, 1923, a qual não pertence a Poecilosclerida, sendo mais proximamente relacionada à algumas espécies de Axinellida (ERPENBECK *et al.*, 2007b;

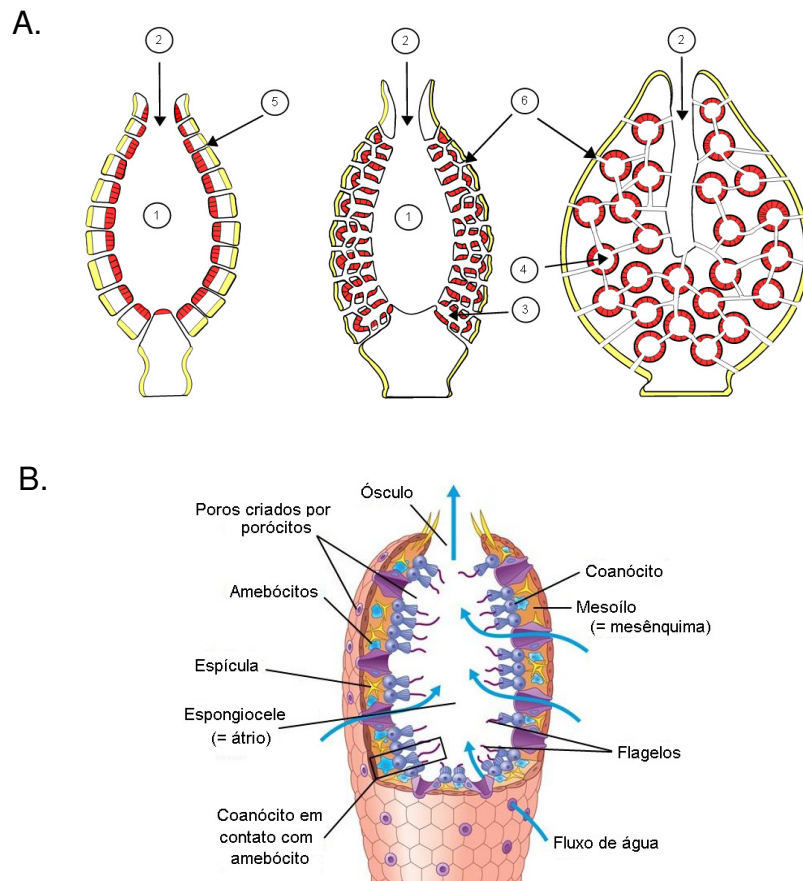


Figura I.2 Plano corporal básico de uma esponja. A. Formas comparadas dos tipos de sistema aquífero: asconóide (esquerda), leuconóide (centro) e siconóide (direita). As estruturas indicadas são: pinacoderme (amarelo), coanoderme (vermelho), espongiocele ou átrio (1), óculo (2), canal vibrátil ou radial (3), câmara coanocitária ou vibrátil (4), poro inalante (5), canal inalante (6). B. Plano corporal detalhado, com tipos celulares e estruturas indicadas. (modificado de RUPERT *et al.*, 2004).



MORROW *et al.*, 2012). Similarmente, algumas espécies de Desmacellidae Ridley e Dendy, 1886, consideradas como Mycalina sem quelas, não se encontram relacionadas com outras espécies de Poecilosclerida por dados moleculares (MITCHELL *et al.*, 2011; MORROW *et al.*, 2012).

### **O Gênero *Mycale* Gray, 1867**

O gênero *Mycale* Gray, 1867 (Porifera, Poecilosclerida, Mycalina) abrange espécies de esponjas marinhas que ocorrem desde o entre-marés até zonas abissais profundas com formas incrustantes, maciças, ou ramificadas. Apresentam esculturações subectossomais, como sulcos e cristas, algumas vezes podendo ser vistos na superfície, dentro das quais podem ser encontrados os óstios. Suas espículas megascleras são subtilóstilos derivados, mycalostilos – megascleras semelhantes a estilos, mas com uma leve constrição formando um pescoço numa das extremidades – que podem, ocasionalmente, derivar em óxeas ou estrôngilos inclusos em fibras de espongina ou sem espongina visível e dispostos no esqueleto num arranjo plumoso, plumoreticulado ou confuso. Um esqueleto ectossomal tangencial característico pode ainda estar presente. As microscleras incluem iso- e anisoquelas palmadas (podendo formar rosetas), sigmas (que podem ser serradas), toxas (podendo ser espinadas), micracantóxeas e ráfides (VAN SOEST e HAJDU, 2002; para descrição das estruturas morfológicas ver BOURY-ESNAULT e RÜTZLER, 1997) (Figura I.3).

Este gênero, desde sua criação, tem passado por inúmeras revisões e modificações, e é hoje um dos maiores em número de espécies dentro do Filo Porífera, abrangendo, até agora, 249 espécies – cerca de 10% das espécies de Poecilosclerida – das quais 217 estão distribuídas em onze subgêneros e 32 sem alocação sub-genérica (VAN SOEST *et al.*, 20012; consulta em 04/12/2012). Muitas espécies hoje alocadas dentro de *Mycale* já estiveram combinadas com vários outros gêneros, que são atualmente considerados como gêneros sinônimos, como, por exemplo, *Esperia* Nardo, 1833, *Esperella* Vosmaer, 1885, *Raphiodesma* Bowerbank, 1868, e *Zygomycala* Topsent, 1930.

No último século, um grande esforço taxonômico foi feito a fim de organizar a diversidade de espécies associadas ao gênero *Mycale*. Revisões do gênero foram tentadas por Topsent (1924), de Laubenfels (1936), van Soest (1984), Bergquist e Fromont (1988), Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994), Hajdu (1995), Hajdu e Rützler (1998) e Hajdu (1999). Por fim, van Soest e Hajdu (2002) resumiram os avanços na taxonomia de *Mycale* na sua revisão publicada no Systema Porifera (HOOPER e VAN SOEST, 2002), o qual é, ainda hoje, a

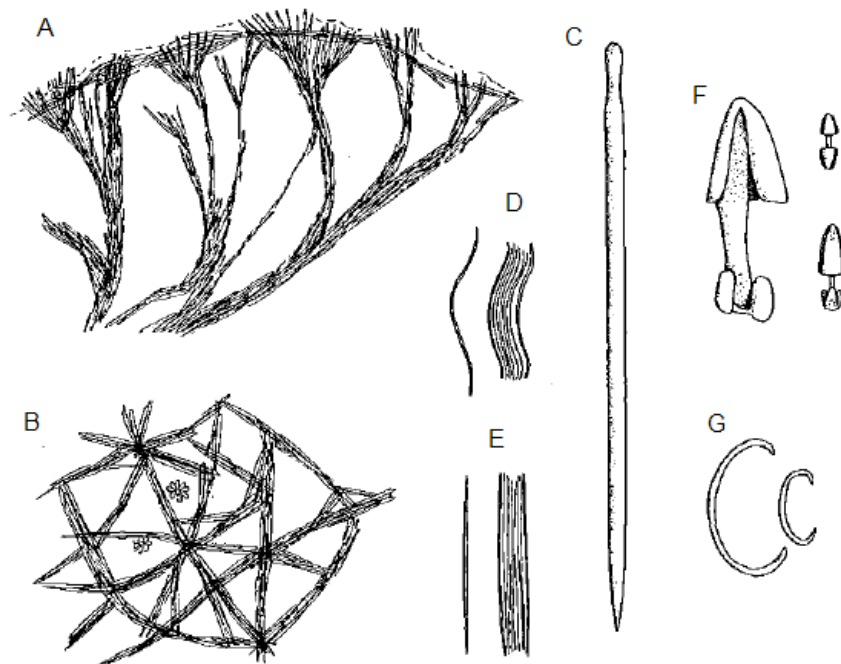


Figura I.3. Ilustrações esquemáticas dos principais elementos morfológicos em *Mycale* Gray, 1867. A. Esqueleto coanossomal. B. Esqueleto ectossomal. C. Mycalostilo. D. Toxas. E. Ráfides. F. Quelas. G. Sigmas. Extraído de van Soest, 1984. ver Capítulo 2 para mais detalhes.

referência sistemática do gênero e orientação taxonômica para outros sistemas de identificação, como o portal de taxonomia de esponjas na internet *The World Porifera Database* (VAN SOEST *et al.*, 2012).

### Os Subgêneros

Desde Gray (1867) é reconhecido que a diversidade dentro de *Mycale* apresenta táxons relativamente homogêneos que poderiam ser agrupados por características próprias. Em seu trabalho, o gênero *Mycale* foi desmembrado em cinco diferente gêneros (*Mycale*, *Aegogropila*, *Grapelia*, *Carmia*, *Naviculina* e *Corybas*), os quais terminaram por apresentar um conjunto similar de elementos espiculares, sendo diferenciados apenas por um número reduzido de características. A confusão entre os gêneros morfológicamente próximos descritos por Gray (1867) foi expressa por Hallman (1914), no qual ele propõe a divisão de um grupo maior, *Mycale*, em subgêneros (*Aegogropila*, *Paresperella*, *Grapelia*, *Arenochalina* e *Mycale*).

Essa proposta de divisão do gênero *Mycale* em subgêneros foi seguida por Topsent (1924), que estendeu os subgêneros descritos por Hallman (1914), reconhecendo *Mycale* Gray, 1867, *Aegogropila* Gray, 1867, *Carmia* Gray, 1867 e *Anomomycale* Topsent, 1924. Contudo ele restringiu sua proposta apenas às espécies distribuídas na Europa Ocidental, desconsiderando, assim, gêneros como *Paresperella*, *Arenochalina* e *Rhaphidotheca*. Dendy (1922) sugeriu que a presença ou ausência de algumas categorias de microscleras poderia servir como características diagnósticas para subdividir o gênero *Mycale*. De Laubenfels (1936) alocou todas as espécies de *Mycale* com toxas em um gênero separado, *Carmia*, todas as espécies com sigmas (mas sem toxas) em *Mycale*, e aquelas com ausência de sigmas e toxas em *Mycalécarmia* de Laubenfels, 1936. O estado taxonômico do gênero *Mycale*, subdividido em inúmeros subgêneros, foi revivido por van Soest (1984), que elucidou por meio esquemático as diferenças na arquitetura esquelética dos subgêneros. Neste trabalho, van Soest (1984) demonstra que a classificação pragmática de de Laubenfels (1936) é falaciosa, e argumenta que, possivelmente, as características de espículas (tipos, tamanhos e categorias) não deveriam ser usadas para alocações subgenéricas, embora reconheça que sejam úteis na caracterização de espécies. Ele também adicionou *Acamasina* e *Arenochalina* à lista de subgêneros, mas assinalou *Zygomycale* à lista de sinônimos de *Aegogropila*.

Bergquist e Fromont (1988) foram além, e propuseram que os subgêneros de Topsent fossem elevados à categoria de gêneros. Hajdu (1995; 1999) reviveu alguns (sub)gêneros adicionais, como *Grapelia* e *Naviculina*. Contudo, Hajdu (1995; 1999) e Carballo e Hajdu (1998) apontaram que várias características de subgêneros se sobrepõem com outros subgêneros. Por exemplo, tanto *Paresperella* quanto *Zygomycale* apresentam uma estrutura comum tipicamente encontrada em *Aegogropila* e por sua vez *Grapelia*, *Anomomycale* e *Oxymycale* possuem uma estrutura semelhante à *Mycale stricto sensu* (s.s.).

Dessa forma, muitos destes táxons aparentam ser parafiléticos ou sobrepostos, por serem baseados em diferentes características do esqueleto e espículas. Van Soest e Hajdu (2002) postularam que as espécies que apresentam um único tipo de megasclera fossem assinaladas à Mycalidae, e que todos estes táxons comporiam subgêneros de *Mycale*, ao invés de gêneros próprios, evitando, em sua opinião, alguns problemas de parafilia. Estes autores apontam que o sistema de classificação de subgêneros de *Mycale* não é ideal e é provisório, e que ainda apresenta alguns problemas que deveriam ser revistos, mas que seria um sistema conveniente para organizar a diversidade de grandes grupos de táxons. E que no momento que as hipóteses filogenéticas destes táxons se tornarem mais robustas, seria, então, preferível

rever a atual classificação de *Mycale*, e quiçá erigir novos gêneros ou elevar os atuais subgêneros a gêneros em Mycalidae (VAN SOEST e HAJDU, 2002) (ver Tabela I.1 para a evolução da classificação de *Mycale* ao longo dos anos).

O que se pode ver, nos primeiros anos que se seguem às revisões publicadas de *Mycale*, é uma tendência alternada entre alocar a diversidade do grupo em diferentes gêneros ou subgêneros de um mesmo gênero (Figura I.4). Esta divergência no ranqueamento da diversidade de *Mycale* se estabiliza na revisão proposta por van Soest (1984), na qual parte desta se encontra em gêneros diferentes e outra em subgêneros de *Mycale*. Contudo, a partir de 1994, se observa uma prevalência na sistematização de *Mycale* em subgêneros, onde, até o presente momento, a atual diversidade em *Mycale* se encontra dividida em onze subgêneros, de acordo com a classificação proposta por van Soest e Hajdu (2002) no Systema Porifera (VAN SOEST e HOOPER, 2002). Os atuais subgêneros de *Mycale* válidos são listados em seguida, com suas definições (para detalhes da morfologia de *Mycale* ver Capítulo 2).

#### *Mycale (Aegogropila) Gray, 1867*

*Mycale* com superfície visivelmente reticulada a olho nu. Esqueleto coanossomal plumoso ou plumoreticulado constituído de tratos multispiculares de megascleras de uma única categoria. Esqueleto ectossomal constituído de uma reticulação tangencial densa de megascleras isoladas ou em tratos. Megascleras como subtilóstilos (mycalostilos). Microscleras são anisocelas palmadas em uma a quatro categorias, cujas maiores formam rosetas, sigmas, ráfides, toxas e eventualmente micracantóxeas.

#### *Mycale (Anomomycale) Topsent, 1924*

*Mycale* com anomoquelas (anisocelas palmadas com um eixo ligeiramente curvado em vista frontal, e ala frontal do pé consideravelmente expandida, aproximando-se ou mesmo superando as dimensões da ala frontal da cabeça, que geralmente é maior, contorcido, às vezes com a borda superior serrilhada).

#### *Mycale (Arenochalina) Lendenfeld, 1887*

*Mycale* com esqueleto coanossomal constituído por uma reticulação robusta de fibras de espongina, majoritariamente quadrangular, com materiais extrínsecos e/ou algas filamentosas e poucas megascleras próprias no cerne das fibras. Esqueleto ectossomal ausente. Coanossomal megascleras e microscleras esparsas. Microscleras anisocelas com

apenas uma categoria, muitas vezes ausentes ou raras, e sigmas, ocasionalmente ausentes e raras.

*Mycale (Carmia) Gray, 1867*

*Mycale* com esqueleto coanossomal plumoso ou plumoreticulado. Esqueleto ectossomal ausente, ou somente megascleras esparsas situando-se tangencialmente, assim como microscleras esparsas. Megascleras são subtilóstilos (mycalostilos) com uma única categoria. Microscleras são anisoquelas palmadas em uma ou mais categorias, cujas maiores podem formar rosetas, assim como um variável complemento de sigmas, ráfides, toxas e micracantóxeas.

*Mycale (Grapelia) Gray, 1867*

*Mycale* com esqueleto ectossomal tangencial confuso, e três categorias de anisoquelas, com uma ou mais destas apresentando ala unguiferada ou ala reduzida a uma série de espinhos.

*Mycale (Mycale) Gray, 1867*

*Mycale* com esqueleto ectossomal tangencial confuso (muitos com sulcos em poro, e/ou três categorias de anisoquelas, e/ou anisoquelas-III basalmente esporadas, e/ou ráfides em duas categorias).

*Mycale (Naviculina) Gray, 1867*

*Mycale* com esqueleto ectossomal tangencial reticulado, e naviculiquelas (anisoquelas com fusão completa ou não das alas frontais, foice marcadamente expandida ao longo do eixo, ala lateral da cabeça projetando-se para trás e para cima).

*Mycale (Oxymycale) Hentschel, 1929*

*Mycale* com exclusivamente óxeas como megascleras.

*Mycale (Paresperella) Dendy, 1905*

*Mycale* com esqueleto coanossomal plumoso ou plumoreticulado, constituído de tratos multispiculares de megascleras. Esqueleto ectossomal muitas vezes formado por uma reticulação tangencial de megascleras. Megascleras são subtilóstilos (mycalostilos) muitas

vezes com uma única categoria. Microscleras são anisoquelas palmadas em uma ou mais categorias, cujas maiores podem formar rosetas, sigmas serreadas, e ocasionalmente toxas.

*Mycale (Raphidotheca) Kent, 1870*

*Mycale* com esqueleto ectossomal atravessado com exotilos em forma de clava. Próximo a estes estão os mycalostilos, anisoquelas, sigmas e ráfides.

*Mycale (Zygomycale) Topsent, 1931*

*Mycale* com esqueleto coanossomal plumoso ou plumoreticulado, constituído de tratos multispiculares de megascleras de uma única categoria. Esqueleto ectossomal constituído de uma reticulação tangencial densa de megascleras isoladas ou em tratos. Megascleras são subtilóstilos (mycalostilos). Microscleras são anisoquelas em uma a mais categorias, pequenas isoquelas palmadas, sigmas, ráfides e toxas, as últimas muitas vezes organizadas em feixes (dragmas).

Este subgênero é baseado na posse de pequenas isoquelas palmadas, em adição as habituais anisoquelas. A maioria dos autores recentes consideram este caráter como plesiomórfico, e em vista do fato de outras características compartilhadas com *Aegogropila*, estes autores preferem sinonimizar este subgênero com o anterior. Por outro lado, há pelo menos duas espécies descritas válidas com pequenas isoquelas, e assim, é conveniente distinguir estas das demais espécies de *Aegogropila*.

Espécies de *Mycale* sem alocação subgnérica

Ainda existem cerca de 30 espécies de *Mycale* sem alocação subgenérica (VAN SOEST *et al.*, 2012). Estas espécies não apresentam características típicas dos subgêneros descritos acima, e sua diversidade morfológica é deveras complexa para designação de novos subgêneros. Estas espécies se encontram designadas apenas no gênero *Mycale*.

Tabela I.1. Classificação dos táxons associados à *Mycale* Gray, 1867 ao longo do tempo em relação às revisões taxonômicas realizadas. Os táxons são seguidos por autor e ano conforme sua publicação original, e seu nível taxonômico em cada revisão é indicado pelas letras G, para gênero, e S, para sub-gênero. Os números sobrescritos indicam a sinonímia com o táxon aceito pelos autores. Os hífen (-) indicam os táxons não aceitos ou não incluídos na revisão. Os anos fazem referência às revisões publicados por: Gray, 1867; Hallman, 1914; Dendy, 1922; Topsent, 1924; de Laubenfels, 1936; van Soest, 1984; Bergquist e Fromont, 1988; Hajdu e Desqueyroux-Faundez, 1994; Hajdu e Rutzler, 1998; van Soest e Hajdu, 2002.

| Táxon  | Ano da revisão |      |      |                |                |                |      |      |                |                |
|--|----------------|------|------|----------------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|
|  | 1867           | 1914 | 1922 | 1924           | 1936           | 1984           | 1988 | 1994 | 1998           | 2002           |
| <i>Acamas</i> Duchassaing e Michelotti, 1864 | -              | -    | -    | -              | 3              | -              | -    | -    | -              | -              |
| <i>Acamasina</i> de Laubenfels, 1936         | -              | -    | -    | -              | G <sup>3</sup> | S              | -    | -    | -              | -              |
| <i>Aegogropila</i> Gray, 1867                | G              | S    | G    | S <sup>1</sup> | 1              | S <sup>1</sup> | G    | S    | S              | S              |
| <i>Anomomycale</i> Topsent, 1924             | -              | -    | -    | S              | G              | G              | -    | -    | 1              | S              |
| <i>Arenochalina</i> Lendenfeld, 1887         | -              | S    | -    | -              | G              | -              | -    | S    | S              | S <sup>2</sup> |
| <i>Carmia</i> Gray, 1867                     | G              | -    | -    | S              | G <sup>1</sup> | S              | G    | S    | S              | S              |
| <i>Esperella</i> Vosmaer, 1887               | -              | -    | G    | -              | 2              | -              | -    | -    | -              | -              |
| <i>Esperia</i> Nardo, 1833                   | G              | -    | -    | 1              | 2              | -              | -    | -    | -              | -              |
| <i>Gomphostegia</i> Topsent, 1896            | -              | -    | -    | -              | -              | -              | -    | -    | -              | 4              |
| <i>Grapelia</i> Gray, 1867                   | G              | S    | -    | -              | -              | -              | -    | S    | S              | S <sup>3</sup> |
| <i>Kersemna</i> Pulitzer-Finali, 1982        | -              | -    | -    | -              | -              | -              | -    | -    | -              | 2              |
| <i>Mycale</i> Gray, 1867                     | G              | S    | G    | S              | G <sup>2</sup> | S              | G    | S    | S <sup>1</sup> | S <sup>1</sup> |
| <i>Mycalecarmia</i> de Laubenfels, 1936      | -              | -    | -    | -              | G              | -              | -    | -    | -              | 1              |
| <i>Naviculina</i> Gray, 1867                 | G              | -    | -    | -              | -              | -              | -    | -    | -              | S              |
| <i>Oxycarmia</i> de Laubenfels, 1954         | -              | -    | -    | -              | -              | -              | -    | -    | -              | -              |
| <i>Oxymycale</i> Hentschel, 1929             | -              | -    | -    | -              | G              | G              | -    | -    | -              | S              |
| <i>Paresperella</i> Dendy, 1905              | -              | S    | G    | -              | G              | G              | G    | S    | S              | S              |
| <i>Parisociella</i> Burton, 1952             | -              | -    | -    | -              | -              | -              | -    | -    | -              | 2              |
| <i>Protoesperia</i> Czerniavsky, 1880        | -              | -    | -    | -              | -              | -              | -    | -    | -              | ?              |
| <i>Pseudoesperia</i> Carter, 1886            | -              | -    | -    | -              | G              | -              | -    | -    | -              | 3              |
| <i>Raphioderma</i> Bowerbank, 1869           | -              | -    | -    | -              | -              | -              | -    | -    | -              | 1              |
| <i>Raphiodesma</i> Bowerbank, 1874           | -              | -    | -    | -              | 2              | -              | -    | -    | -              | 1              |
| <i>Rhaphidotheca</i> Kent, 1870              | -              | -    | -    | -              | G              | -              | -    | -    | -              | S <sup>4</sup> |
| <i>Sceptrospongia</i> Dendy, 1926            | -              | -    | -    | -              | G              | -              | -    | -    | -              | 4              |
| <i>Zygomycale</i> Topsent, 1931              | -              | -    | -    | -              | G              | 1              | -    | -    | -              | S              |

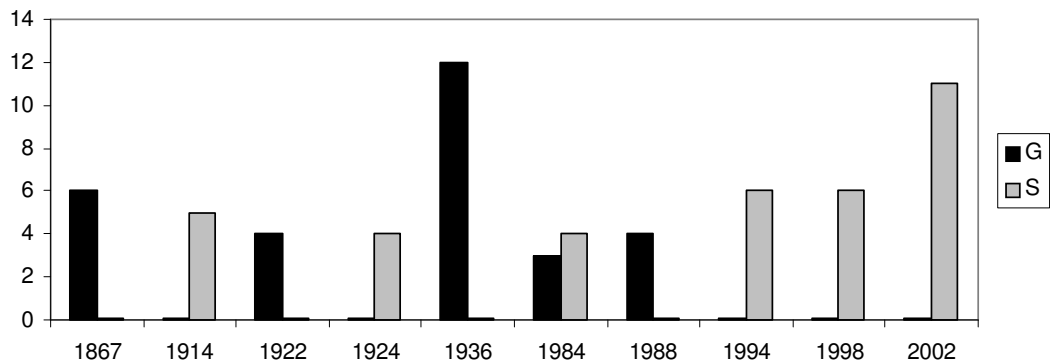


Figura I.4. Variação do número e nível taxômico dos táxons associados à *Mycale* Gray, 1867 ao longo do tempo em relação às revisões taxonômicas realizadas. Os gêneros (G, preto) e sub-gêneros (S, cinza) são indicados. Os anos fazem referência às revisões publicadas (ver Tabela I.1).

## Objetivos

O objetivo desta tese foi abordar a diversidade de *Mycale* sob um ponto de vista multidisciplinar. Isto significa o uso de diversas técnicas e abordagens de pesquisa, o que implica em uma abordagem hierárquica diferenciada para cada questão ou metodologia. A idéia geral, é introduzir uma integração em todos os níveis de organização biológica, de moléculas à biosfera, a fim de compreender a evolução e diversificação do grupo.

O ponto de partida se dá, no Capítulo 1, no estabelecimento, por meio de dados moleculares, de uma hipótese filogenética para *Mycale*, a qual se faz necessária frente às constantes descobertas no que diz respeito às relações evolutivas de Porifera em contraste com a sistemática tradicional estabelecida. No Capítulo 2, é realizada uma análise aprofundada a respeito das características morfológicas do gênero, dada a hipótese filogenética estabelecida no capítulo anterior, indo da morfometria comparativa até a reconstrução das características ancestrais, permitindo avaliar, com maior grau de independência, a homologia destas. A seguir, no Capítulo 3, é realizado um foco na variabilidade populacional, tanto genética quanto morfológica, de uma única espécie, *M. (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927, o que permitirá incorporar a variabilidade intraespecífica como fator na compreensão da diversidade interespecífica, que se apresenta, pelo próprio processo evolutivo, ao longo de um contínuo da população para a espécie. No Capítulo 4, as reconstruções filogenéticas moleculares de *Mycale* são utilizadas para o estabelecimento de hipóteses biogeográficas, que são contrastadas com as sugeridas na literatura. E, por fim, no Capítulo 5, é avaliado



comparativamente o perfil metabolômico de *Mycale* a partir das espécies *M. (Aegogropila) americana* van Soest, 1984, *M. (Carmia) microsigmatosa* e *M. (Zygomycala) angulosa* (Duchassaing e Michelotti, 1864) por meio de Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o qual é contrastado com suas relações evolutivas, permitindo, desta maneira, estabelecer um nível bioquímico de diversidade para o grupo.

## 1. DA FILOGENIA MOLECULAR

### 1.1. Introdução

#### 1.1.1. A relevância de aspectos moleculares na sistemática de Porifera

As considerações feitas anteriormente, embora muito consistentes, levaram em conta apenas dados morfológicos, sobretudo tipo, formato e tamanho das espículas. Este tipo de informação é largamente utilizado na taxonomia de Porifera como meio de delimitação da variabilidade morfológica (HOOPER e VAN SOEST, 2002; ver Capítulo 3). Contudo, esta ênfase pode ser criticada por seu grande potencial de incorrer em erro durante a inferência de homologias primárias, o que decorre da significativa plasticidade de tais caracteres merísticos (*e.g.*, FROMONT e BERGQUIST, 1990; BELL *et al.*, 2002; MEROZ-FINE *et al.*, 2005).

Um grande potencial de erro a partir deste conjunto de dados advém de uma classificação *a priori* dos tipos de espículas, utilizando somente critérios estéticos para sua delimitação (BOURY-ESNAULT e RÜTZLER, 1997), que, na realidade, tendem a consistir em agrupamentos arbitrários e subjetivos de formas em torno de um plano básico (*e.g.*, FROMONT e BERGQUIST, 1990). Ainda devemos levar em conta que pouco sabemos a respeito dos processos espiculogenéticos (mas ver URIZ, 2006), os quais são fundamentais para determinar a morfologia das espículas uma vez que as regras básicas de formação das mesmas – como a organização de eixos orgânicos e o acréscimo mineral em torno deste – atuam diretamente na gênese de um formato específico de espícula (AIZENBERG *et al.*, 1996). Portanto, na ausência de um critério ontogenético de homologia, a categorização dessas entidades em tipos se dá unicamente por similaridade, o que, em alguns casos, pode vir a ser muito difícil. A distinção entre categorias morfológicas baseadas apenas no formato de estruturas é amplamente discutida na literatura, e uma posição defendida por muitos autores é que a determinação de homologia a partir de uma característica quantitativa é logicamente impossível (PIMENTEL e RIGGINS, 1987; Bookstein, 1994). Sendo assim, ao utilizar tais

características quantitativas em uma análise filogenética, pode-se incluir um número substancial de ruído, podendo-se levar a inferências errôneas nas relações evolutivas entre os táxons. Em Porifera, onde o número de caracteres morfológicos disponíveis para análise é pequeno o potencial de erro proveniente da inclusão destas características é significativo. Tal problema é agravado pelo fato da homologia primária dos caracteres mais utilizados (*i.e.*, morfologia das espículas) ser questionável principalmente devido à plasticidade. Uma vez que as principais informações morfológicas facilmente obtíveis das esponjas levantam questões acerca da homoplasia de seus estados, uma reconstrução filogenética objetivando especificamente verificar prerrogativas de homologia deste mesmo conjunto de dados, se apresenta tautológica. Além disso, a inferência de uma série de transformação destes tipos espiculares é se mostra inalcançável (mas, ver HAJDU e VAN SOEST, 1996).

Uma alternativa consistiria em utilizar dados independentes para testar hipóteses de homologia e caracterização da diversidade morfológica encontrada em esponjas. Novamente, uma vez que esponjas carecem de dados morfológicos que sustentem uma filogenia robusta, uma alternativa possível – que não requer uma profunda revisão das características morfológicas do grupo – se apresenta na utilização de marcadores moleculares que sejam capazes de responder questões sobre as relações evolutivas destes táxons. Hipóteses filogenéticas e de homologias geradas a partir de dados morfológicos, podem ser testadas através de reconstruções filogenéticas obtidas com dados moleculares (*e.g.*, CHOMBARD *et al.*, 1998; ERPENBECK *et al.*, 2006), e desta forma evitar, e talvez, verificar problemas de circularidade e dependência dos dados.

Em esponjas, as abordagens moleculares vêm causando um significativo impacto na sistemática e trazido novas perspectivas acerca da evolução e biologia do grupo (*e.g.*, MÜLLER *et al.*, 2001; NICHOLS, 2005; LAVROV *et al.*, 2008; CÁRDENAS *et al.*, 2012). Diversos trabalhos têm mostrado que, por meio de uma perspectiva molecular, os dados morfológicos podem apresentar novos significados ou mesmo ressuscitar velhas interpretações (*e.g.*, CHOMBARD *et al.*, 1998, ALVAREZ *et al.*, 2000; MANUEL *et al.*, 2003; ERPENBECK *et al.*, 2006; ERWIN e THACKER, 2007; DOHRMAN *et al.*, 2008; PHILIPPE *et al.*, 2009; CÁRDENAS *et al.*, 2010; GAVAZE *et al.*, 2010; CÁRDENAS *et al.*, 2011). E, a despeito do contraste pragmatizado entre a taxonomia tradicional e a sistemática molecular, os resultados moleculares e morfológicos podem ser congruentes (BOURY-ESNAULT, 2006; ERPENBECK e WÖRHEIDE, 2007; CÁRDENAS *et al.*, 2012), desde que haja espaço para novas idéias.

### 1.1.2. Relações filogenéticas de *Mycale* Gray, 1867 com base em dados morfológicos

Como visto anteriormente, a classificação das espécies de *Mycale* tem passado por constantes mudanças ao longo dos anos conforme o paradigma dos tempos – ou dos autores – muda. Os primeiros trabalhos que debateram relações evolutivas para *Mycale*, como Topsent (1924) e de Laubenfels (1936), operaram sobretudo por meio de uma perspectiva baseada na taxonomia tradicional (*sensu* WILEY, 1981), e, mais recentemente, van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1988) na sistemática sintética (= sistemática evolutiva; MAYR e ASHLOCK, 1991). Em tais trabalhos, as relações de parentesco entre os táxons são, sobretudo, sugestões, uma vez que não há metodologia formal de comparação. Para tal se utiliza da similaridade total entre as espécies e/ou eleição de características mais importantes ou especiais, sendo comum, relatos como:

The genus *Paresperella* Dendy has frequently been regarded as congeneric with *Mycale* from which it differs chiefly in that it not only has very large sigmas but these with serrated ends. Instead of being most closely related to *Mycale*, however, I would suggest relationship to *Rhaphidotheca* and *Pozziella*, because some of the specimens of *Paresperella* show an incipient tendency to the exotylole modification of the megascleres which is carried to a greater extent in *Pozziella*. This latter genus also has one serration on the end of each of its macrosigmas. The tendency of the megascleres to be exotylole is carried to a still greater extent in *Rhaphidotheca*, which furthermore has microscleres exceedingly like those of *Paresperella*, except for the lack of the larger sigmas. (de Laubenfels, 1936, p. 121).

Enquanto que trabalhos como os acima dominaram as discussões a respeito da evolução de *Mycale*, até o final da década de 1980, somente uma alternativa com métodos mais explícitos foi proposta. As relações evolutivas propostas por Doumenc e Lévi (1987), com base nos princípios da sistemática numérica (= fenética, SNEATH e SOKAL, 1973; mas ver críticas em WILEY, 1981) apresentaram pouco impacto na literatura, o que pode ser explicado, principalmente, pela não conformidade dos resultados apresentados com os trabalhos vigentes (HAJDU e DESQUEYROUX-FAUNDEZ, 1994).

A partir dos anos 1980 se torna comum a discussão sobre o monofiletismo e parafiletismo dos táxons associados a *Mycale*, e a homologia das características usadas na sistemática do grupo. Contudo, estas proposições carecem de testes formais, os quais só viriam a aparecer a partir da década de 1990, com hipóteses evolutivas baseadas nos princípios filogenéticos (HENNIG, 1966; WILEY, 1981). O trabalho pioneiro neste sentido é o de Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994), no qual hipóteses acerca das relações evolutivas entre subgêneros de *Mycale* foram apresentadas por meio de um cladograma construído com

base na análise de parcimônia de 15 caracteres morfológicos [Figura 1.1, cuja notação parentética é: (((((((Myc, (Gra1, Gra2)), ((Aeg, Par), Car), Are), Esp2), Esp1), Ham), Des)]. Nesta, *Mycale* s.s. (*Myc*) e *Grapelia* (*Gra*) – o qual foi dividido em dois grupos, *Gra1* e *Gra2*, por um polimorfismo nos estados de um caráter – apresentam uma relação de grupos-irmãos, assim como *Aegogropila* (*Aeg*) e *Paresperella* (*Par*), sendo *Carmia* (*Car*) um grupo basal em relação aos dois últimos. O clado *Myc* (*Gra1* *Gra2*) se relaciona com o clado *Car* (*Aeg* *Par*), e *Arenochalina* (*Are*) seria o grupo mais primitivo dentro de *Mycale*.

Uma nova reconstrução filogenética, realizada por Hajdu (1999), divergiu em vários pontos da filogenia de Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994). Esta nova filogenia utilizou 22 caracteres morfológicos, e teve uma maior abrangência de táxons, incluindo os subgêneros *Naviculina* (*Nav*), *Oxymycale* (*Oxy*), *Zygomycala* (*Zyg*), *Rhaphidoteca* (*Rha*), *Anomomycale* (*Ano*) e um grupo de espécies definido como Grupo-immittis (*imm*), que corresponde a espécies morfológicamente semelhantes à *Mycale immittis* (Schmidt, 1870) (Figura 1.2). O autor dividiu os subgêneros *Carmia* e *Aegogropila* em dois táxons terminais cada, a fim de representar os potenciais estados ambíguos de caracteres. Nesta é possível observar dois grandes clados em *Mycale*, um deles contendo os táxons ((*Aeg1* *Car1*) *Car2*) (*Nav* *Zyg*) *Par* *Aeg2*) *Oxy*, e outro com os táxons *Myc* (*Ano* (*Gra* (*imm* *Rha*), com *Arenochalina* (*Are*) ainda

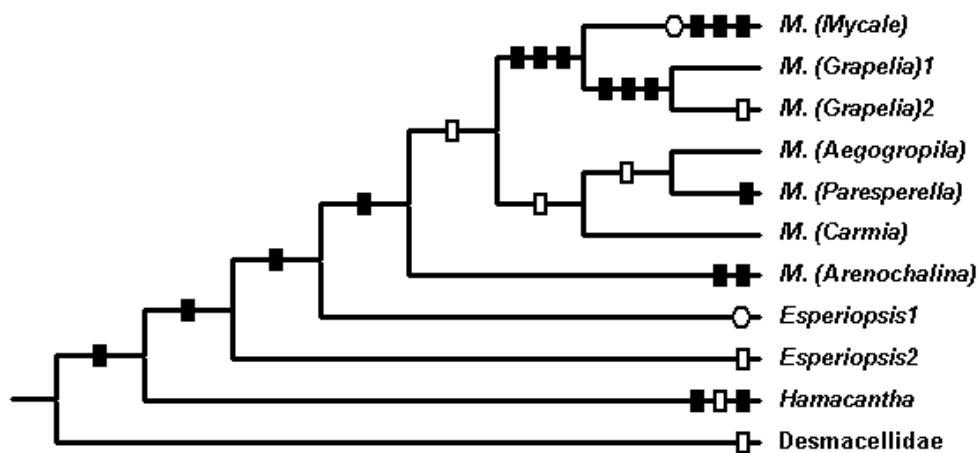


Figura 1.1. Filogenia para o gênero *Mycale* Gray, 1867 obtida por Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994). quadrado cheio = sinapomorfias, quadrado vazio = paralelismos, círculos vazios = reversões. *Esperiopsis1*, *Esperiopsis2*, *Hamacantha* e *Desmacellidae* como grupos externos Redesenhado de Hajdu e Desqueyroux-Faúndez, 1994.

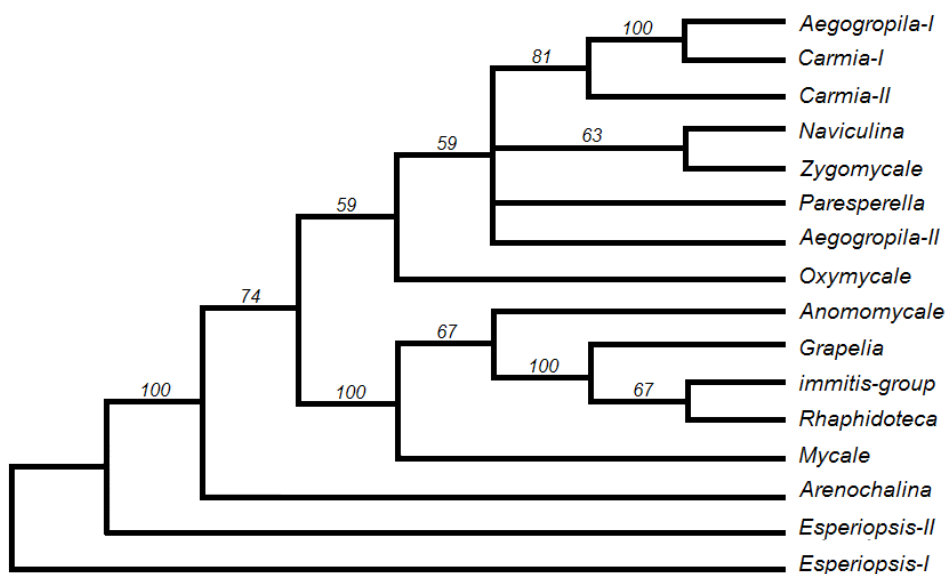


Figura 1.2. Árvore consenso de maioria para as relações filogenéticas entre os subgêneros de *Mycale* obtida por Hajdu (1999). Os valores de suporte dos ramos são indicados. *Esperiopsis-I* e *Esperiopsis-II* como grupos externos. Redesenhado de Hajdu (1999).

como grupo basal em *Mycale*. Esta nova filogenia se assemelha à anterior apenas no que consta a posição basal de *Arenochalina* em relação aos demais subgêneros de *Mycale*, e que os dois grandes clados distintos, obtidos por Hajdu (1999), podiam ser identificados na filogenia de Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994), embora não tão claramente, e com menos integrantes.

### 1.1.3. Relações filogenéticas com base em dados moleculares

Um grande número de trabalhos recentes utilizando métodos moleculares, sobretudo análises de seqüências, têm demonstrado a utilidade desses métodos na verificação de questões sistemáticas (para uma revisão do tema ver ERPENBECK e WÖRHEIDE, 2007). Seja no descobrimento de espécies crípticas, *i.e.*, espécies distintas que não poderiam ser diferenciadas devido à falta de resolução morfológica (e.g., BLANQUER e URIZ, 2007), ou na demonstração de para- ou polifilia de grandes grupos, que, de outra forma, eram considerados monofiléticos tendo como base apenas a morfologia (e.g., NICHOLS, 2005).

Levando em conta a quantidade de espécies descritas para o gênero *Mycale* – considerado especioso para esponjas – e a história taxonômica problemática do grupo, com 222 novas combinações ou sinonímias (VAN SOEST *et al.*, 2012) – a possibilidade de avaliar

as relações evolutivas entre as espécies do gênero é, além de promissora, importante na finalidade de testar as hipóteses sistemáticas vigentes. Todavia, na literatura, são poucos os trabalhos que focaram diretamente as relações filogenéticas de *Mycale*, de Mycalidae ou mesmo Mycalina. De fato, Poecilosclerida apesar de sua diversidade, tem sido até o momento o grupo de esponjas com o menor número de publicações contendo dados moleculares (ver Anexo I). Destes poucos trabalhos, a grande maioria objetivou relações entre grandes grupos de Demospongiae, e fizeram uso de sequências obtidas de uma mesma espécie de *Mycale* como representante do grupo (e.g., BORCHIELINI *et al.*, 2001; BORCHIELINI *et al.*, 2004; NICHOLS, 2005; KOBER e NICHOLS, 2007; MORROW *et al.*, 2012; Figura 1.3). Muitos destes trabalhos utilizaram a mesma sequência do gene 28S do RNA ribossomal (RNAr) nuclear postuladamente de *Mycale fibrexilis* (Wilson 1894), originalmente obtida por Medina e colaboradores (2001). Entretanto, uma questão relevante é que esta identificação taxonômica está aparentemente errada, ou, pelo menos, trata-se de uma espécie muito divergente em relação ao restante das espécies do gênero (LOH *et al.*, 2012). Dessa forma, em qualquer uma das situações, muitos postulados a respeito das relações inferidas a partir desta espécie estariam equivocados e, sendo assim, não refletiriam o posicionamento filogenético do gênero em relação às demais poeciloscleridas. Uma exceção são os resultados de Morrow e colaboradores (2012), cujas conclusões se baseiam em uma espécie diferente, *M. (Aeg.) rotalis* (Bowerbank, 1874). De todo modo, as relações envolvendo Mycalidae se mostram contraditórias na literatura, sendo que, geralmente, tendem a apresentar uma maior proximidade filogenética com Tedaniidae (Myxillina) e/ou Microcionidade (Microcionina) do que com outras Mycalina, como *Coelocarteria* e *Diacarnus* (Figura 1.3.D; NICHOLS, 2005) ou *Amphilectus* e *Desmacella* (Figura 1.3.E; MORROW *et al.*, 2012), determinando assim um estado de polifilia para a subordem.

O único artigo publicado que apresenta considerações a respeito das relações entre espécies de *Mycale* com dados moleculares (LOH *et al.*, 2012), consiste, na verdade, de um trabalho de variabilidade intra-específica de *Mycale (Mycale) laevis* (Carter, 1882). Muito embora este seja o trabalho de sistemática molecular com a maior amostragem para o gênero já feita até então (10 spp.), esta é notavelmente insuficiente ao considerarmos a diversidade de *Mycale* – somente 4 % das espécies válidas –, ficando aquém das expectativas para uma

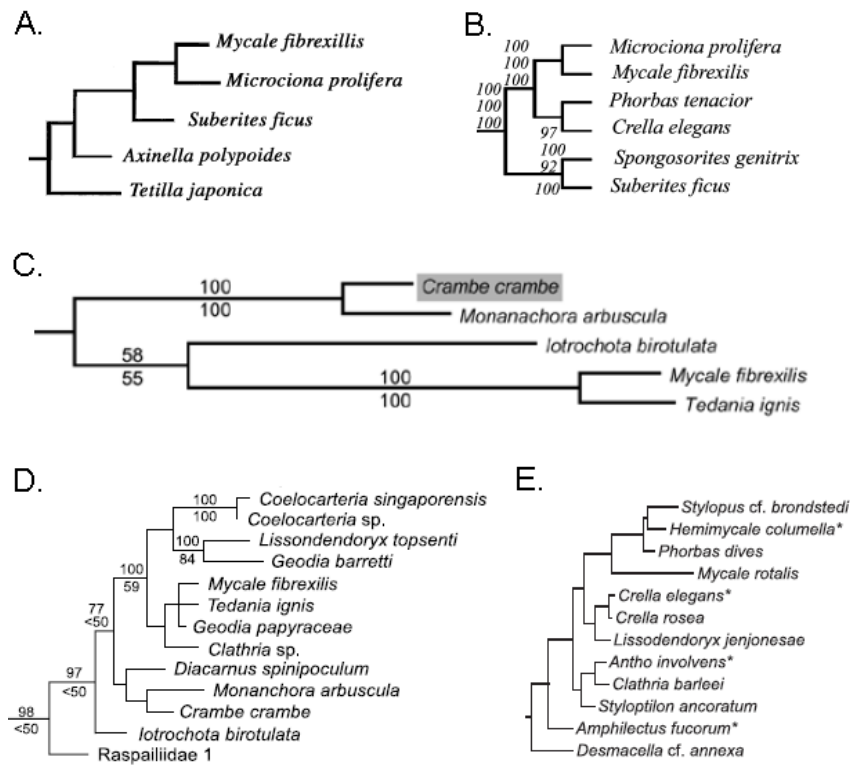


Figura 1.3. Relações evolutivas entre *Mycale* Gray, 1867 e outras Poecilosclerida inferidas a partir do gene 28S do RNA ribossomal (RNAr). Topologias extraídas de (A) Borchielini *et al.* (2001), (B) Borchielini *et al.* (2004), (C) Kober e Nichols (2007), (D) Nichols (2005), e (E) Morrow *et al.* (2012).

revisão molecular do gênero. De todo modo, os resultados encontrados sugerem uma alta\* variabilidade genética intra-específica em *M. (M.) laevis*. Ainda, com exceção de *M. fibrexilis*, as sequências de *Mycale* recuperaram um clado monofilético, embora alguns subgêneros, como *Aegogropila*, tenham se apresentado polifiléticos nas reconstruções obtidas por estes autores (Figura 1.4).

\* Os resultados encontrados por LOH e colaboradores (2012) sugerem uma alta variabilidade genética intra-específica em *M. (M.) laevis*, muito embora a variabilidade dos marcadores parece ter sido superestimada por artefatos produzidos por erro ou ausência de edição das sequências após sequenciamento automático, o que pode ser evidenciado a partir do alinhamento das mesmas, onde polimorfismos de mutações únicas e *indels* aparecem em regiões extremamente conservadas em grupos evolutivamente distantes (NdA)



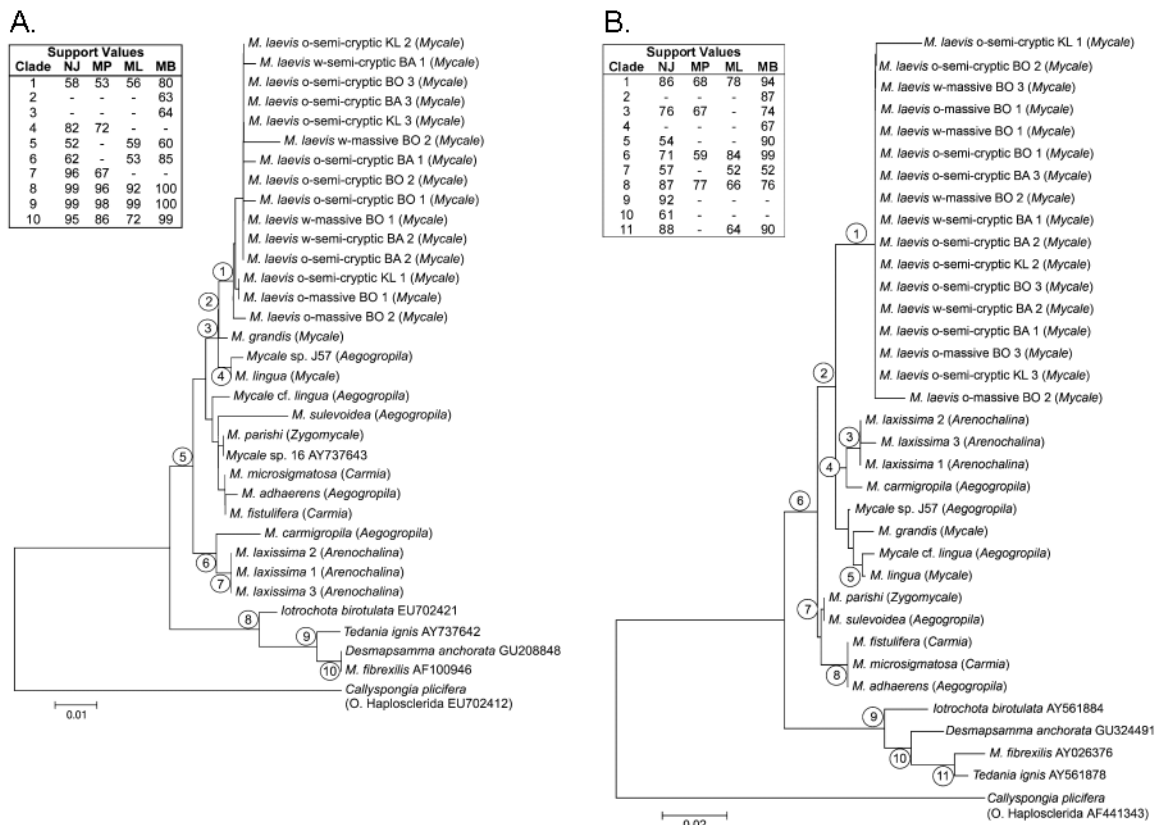


Figura 1.4. Filogramas de *Mycale* Gray, 1867 reconstruídos por Loh e colaboradores (2012) a partir de dados moleculares. As reconstruções foram realizadas a partir de fragmentos dos genes 18S (A) e 28S (B), com valores de suporte indicados na caixa de texto à esquerda de cada topologia. Extraído de Loh e colaboradores (2012).

#### 1.1.4. Objetivos

Este capítulo possui como objetivo principal:

- Propor hipóteses filogenéticas para espécies do gênero *Mycale* Gray, 1867 por meio de dados moleculares.

Este possui ainda os seguintes objetivos específicos:

- Determinar o posicionamento filogenético de *Mycale* a partir de suas relações supra-genéricas em Poecilosclerida;
- Avaliar a validade da classificação de *Mycale* em subgêneros;
- Avaliar as taxas evolutivas das espécies e determinar limites entre potenciais espécies crípticas por meio da variabilidade molecular encontrada.

## 1.2. Materiais e Métodos

### 1.2.1. Material examinado

Este trabalho contou com a utilização de amostras provenientes de diversas fontes, dificilmente descritas por uma única metodologia de coleta. Foram utilizadas amostras coletadas diretamente por nosso grupo de trabalho, as quais ainda necessitam de tombamento em coleções; amostras previamente depositadas em museus, como o Museu Nacional do Rio de Janeiro (MN/UFRJ), o Museu Zoológico de Amsterdã (ZMA, *Zoological Museum of Amsterdam*), e o Museu Bernice Pauahi Bishop do Havaí (BPBM, *Bernice Pauahi Bishop Museum*), doações de outros pesquisadores e laboratórios, como as realizadas pela Dra. Barbara Calcinaï (Itália), e outras mais (Apêndice A). A fim de se obter uma inferência evolutiva abrangente do gênero *Mycale* foram amostradas o maior número possível de espécies disponíveis, sem qualquer restrição prévia. Infelizmente, devido ao alto número de espécies descritas para o gênero, e um relativo grau de endemismo ou raridade de muitas destas, não foi possível obter amostras da grande maioria das espécies válidas para o gênero, inclusive com a total ausência de representantes de alguns subgêneros. No total, 39 espécies de *Mycale* foram utilizadas, sendo que a partir de uma parcela destas não foi possível de se obter sequências para análise. Ainda, dos onze subgêneros encontrados, somente dois, *Rhaphidoteca* e *Grapelia*, não foram possíveis de ser analisados. Com o intuito de inferir a posição sistemática de *Mycale* em relação às demais Poecilosclerida, foram obtidas também amostras de espécies de *Mycalina* não pertencentes à *Mycale*, e de espécies pertencentes às subordens *Myxillina*, *Microcionina*.

### 1.2.2. Extração e quantificação do DNA

As amostras foram extraídas conforme protocolo de adsorção por partículas de sílica modificado por de Paula (2009). Este protocolo foi utilizado por resultar em soluções de DNA com maior grau de pureza do que os métodos alternativos não-comerciais (LOBO-HAJDU *et al.*, 2004) e com concentrações compatíveis com amplificações bem sucedidas, dado a má preservação e, conseqüente, alta degradação de DNA em certas amostras, sobretudo as depositadas em museus. O protocolo de extração se encontra descrito em detalhes no Apêndice B, e brevemente, consiste em: triagem das amostras a fim de remover epibiontes; lise das células em tampão de lise (GuHCl 4 M, Tris-HCl 10 mM, pH 6,4, EDTA 20 mM, e TritonX-100 0,65 %); extração por solvente orgânico (CHCl<sub>3</sub> 100 %); adsorção de ácidos

nucléicos em partículas de sílica (0,06 - 0,2 nm à 0,2 g/ml), lavagem do DNA adsorvido com etanol (100 %); desligamento do DNA em tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0).

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 nucleicos 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. 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 ug/ul. Na maior parte dos casos, a eletroforese não foi utilizada devido a concentração das amostras estar abaixo do limiar de detecção do método. Nos casos onde o resultado final da extração foi quantitativa e qualitativamente baixo, as amostra foram re-extraídas a fim de se obter melhores resultados.

### 1.2.3. Marcadores moleculares e amplificação de DNA

A escolha dos marcadores moleculares dependeu sobretudo da capacidade de amplificação das amostras trabalhadas. Foram testados diversos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de genes e regiões gênicas diferentes a fim de buscar marcadores que possibilitassem a execução deste trabalho (i.e., com divergência evolutiva aplicável às questões invocadas e alto sucesso de amplificação). As regiões testadas foram escolhidas da literatura inicialmente devido a sua ampla utilização ou variabilidade descrita para esponjas. Os testes também exploraram regiões gênicas mais raramente utilizadas em esponjas e novos *primers* desenvolvidos neste trabalho.

Os *primers* testados, assim como suas respectivas regiões gênicas, e os resultados dos testes de padronização para cada um destes podem ser encontrados no Apêndice C. Devido ao baixo índice de amplificação da maioria destes, ou ao alto índice de amplificação de organismos contaminantes associados às esponjas, somente os marcadores que apresentaram melhor desempenho foram utilizados exaustivamente neste trabalho, e se encontram descritos em seguida.

As ampliações *in vitro* das regiões gênicas escolhidas foram realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). A técnica consiste de três passos sob termociclagem: (1) desnaturação das fitas duplas de DNA, (2) pareamento dos oligonucleotídeos específicos na fita molde, e (3) extensão da região subsequente pela DNA polimerase. Devido ao grande número de reações, *primers* e reagentes testados e utilizados, as reações de PCR, assim como as condições de termociclagem, foram realizadas com diferentes protocolos, e se encontram descritos em detalhes também no Apêndice B. De maneira geral, as reações foram realizadas com volume total de 30 µl, dadas as seguintes concentrações dos reagentes: 20-200 ng de DNA fita molde, tampão de amplificação da polimerase (concentração recomendada pelo fabricante), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 0,13 mM de cada nucleotídeo (dNTP), 0,13µM de cada primer (senso e anti-senso), 1 U de DNA polimerase. Em alguns casos as amostras foram re-amplificadas, onde os produtos de PCR serviram como fita molde para novas ampliações.

Três 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); e um fragmento do gene da subunidade I da Citocromo c oxidase (cox1), com os *primers* COIPl020F (REVEILLAUD *et al.*, 2011) e HCO2198 (FOLMER *et al.*, 1994).

#### 1.2.4. Sequenciamento, edição e alinhamento das sequências

Cerca de 20 µl, contendo cerca de 10 - 50 ng/µl, de produto de PCR não-purificado foi enviado para Macrogen Inc., Coréia, prestadora de serviços de biotecnologia, por meio de envio postal pela Federal Express (FedEx), seguindo de todas as normas nacionais de envio de material biológico para o exterior. A *homepage* da Macrogen Inc. (<http://www.macrogen.com>) descreve a sua metodologia de sequenciamento automático simples da seguinte forma: condições de ciclagem conduzidas em BigDye™ terminator, produtos de reação purificados usando precipitação por etanol, e sequenciamento utilizando sequenciador automático 3730xl da Applied Biosystems.

Após o retorno dos resultados, cada par de sequências de cada amostra, senso e antisenso, foi editado com o programa DNASTAR® SeqMan Pro v7.1. Após a edição das sequências, foi realizada uma busca no portal NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) por meio do algoritmo BLAST, a fim de averiguar possíveis ampliações de contaminantes, como

organismos simbióticos. Por meio da checagem visual dos alinhamentos (ver abaixo), as sequências, quando necessário, foram re-editadas, a fim de remover ruídos claramente promovidos pelo método de sequenciamento. Bancos de dados públicos de sequências de DNA foram consultados para a obtenção de sequências que pudessem complementar as análises ampliando a representatividade dos grupos em foco, e outras demosponjas para fins comparativos. As sequências obtidas destas amostras estão listadas no Apêndice D.

Para as análises subsequentes, dois diferentes níveis de abrangência taxonômica foram definidos: 1) com o intuito de testar a monofilia do gênero *Mycale* e esclarecer as relações entre o gênero e as demais Mycalina; e 2) a fim de determinar as relações entre os subgêneros de *Mycale*. No primeiro foram consideradas pelo menos uma sequência representativa das espécies de *Mycale* amostradas e também as sequências de espécies pertencentes a Mycalina e demais representantes das subordens de Poecilosclerida, além de outros táxons de demosponjas. No segundo, foram consideradas apenas as sequências das espécies de *Mycale* que se mostraram monofiléticas após as análises supra-genéricas, além da adição de sequências de esponjas não pertencentes a *Mycale*, utilizadas como grupo externo, como determinado também pelas análises anteriores. Esta separação se deu por dois motivos. Primeiro por praticidade, para uma melhor visualização das topologias devido ao grande número de sequências obtidas com os marcadores 16S e 28S. Segundo, porque, devido a alta divergência entre sequências não codificantes poder levar a potenciais inserções e deleções (*indels*), a análise de sequências entre organismos postuladamente próximos implicaria na perda de informação caso fossem consideradas sequências mais divergentes no alinhamento. Isto se daria uma vez que essas posições contendo *indels* seriam deletadas para as análises, e ainda contribuiriam para aumentar a ambiguidade inerente ao processo de alinhamento destas regiões dada a ausência de modelos mais acurados que pesem a abertura e extensão de intervalos. Por não apresentar grande número de sequências, e por ser uma região codificante, onde o alinhamento das sequências pode ser conferido com o alinhamento dos aminoácidos traduzidos destas, o marcador *cox1* foi analisado com a totalidade das sequências obtidas, não sendo separado em níveis taxonômicos distintos.

As sequências, em formato FASTA de cada marcador para cada nível taxonômico, foram alinhadas pelo método de alinhamento múltiplo implementado no programa MAFFT (KATO et al., 2005). Este programa foi escolhido em detrimento dos demais por: i) implementar alinhamento iterativo; e ii) ter obtido melhor resultado que os demais em testes simulados (Wilm et al., 2006). Foram utilizados dois diferentes algoritmos de busca local (L-

INSS-i e E-INS-i) com os parâmetros-padrão do programa para pesagem de abertura e extensão de intervalos, resultando em dois alinhamentos distintos. Estes foram comparados por meio do programa SOAP v1.2 (LÖYTYNOJA e MILINKOVITCH, 2001), e as regiões divergentes entre os dois alinhamentos, assim como as posições contendo intervalos, foram descartadas. Este procedimento se deu a fim de diminuir a ambiguidade no alinhamento promovida pelo acúmulo de *indels* entre sequências divergentes, o que poderia levar a potenciais erros de atribuição de homologias. O alinhamento do marcador *cox1* foi feito de maneira similar, exceto que neste as sequências foram posteriormente traduzidas de acordo com o código genético modificado do DNA mitocondrial das esponjas (LAVROV *et al.*, 2005) e re-alinhadas.

Cinco alinhamentos foram realizados:

- O primeiro (16S-supra), com base no marcador 16S, para fins de análise supra-genérica de *Mycalina*, conteve 78 sequências de nucleotídeos, sendo 35 de *Mycale*, 3 de Desmacellidae, 2 de Esperlopsidae, 1 de Isodictyidae, 1 de Merliidae, 4 de Podospongiidae, 4 de Microcionina, 4 de Myxillina, 4 de Hadromerida, 3 de Spongillina, 1 de Agelasida, 1 de Astrophorida, 2 de Spirophorida, 3 de Halichondrida, 3 pertencentes ao grupo de demosponjas G3, 3 ao grupo G2, e 4 ao grupo G1;
- O segundo (16S-sub), também com base em 16S, mas para análise sub-genérica de *Mycale*, conteve 91 sequências, sendo 20 sequências de *M. (Aegogropila)*, 6 de *M. (Arenochalina)*, 14 de *M. (Carmia)*, 20 de *M. (Mycale)*, 8 de *M. (Naviculina)*, 1 de *M. (Oxymycale)*, 1 de *M. (Paresperella)*, 20 de *M. (Zygomycale)*, e 1 de *Podospongia sp.*;
- O terceiro (28S-supra), com base no marcador 28S, análise supra-genérica, conteve 125 sequências, sendo 35 de *Mycale*, 1 de *Phlyctaenopora*, 1 de Cladorhizidae, 5 de Desmacellidae, 2 de Esperlopsidae, 2 de Guitarridae, 1 de Hamacanthidae, 2 de Isodictyidae, 1 de Merliidae, 3 de Podospongiidae, 9 de Microcionina, 13 de Myxillina, 14 de Hadromerida, 2 de Spongillina, 2 de Agelasida, 3 de Astrophorida, 8 de Halichondrida, 7 pertencentes ao grupo de demosponjas G3, e 4 aos grupos G2 e G1;
- O quarto (28S-sub), também baseado em 28S, para análise subgenérica, conteve 69 sequências, sendo 17 de *M. (Aegogropila)*, 5 de *M. (Arenochalina)*, 16 de *M.*

(*Carmia*), 20 de *M. (Mycale)*, 2 de *M. (Naviculina)*, 1 de *M. (Oxymycale)*, 2 de *M. (Paresperella)*, 5 de *M. (Zygomycale)*, e 1 de *Cladorhiza flosabyssi*;

- O quinto e último alinhamento foi construído com base no marcador *cox1*, e compreendeu 69 sequências, sendo 17 de *Mycale*, 7 de Desmacellidae, 3 de Podospongiidae, 13 de Microcionina, 7 de Myxillina, 2 de Hadromerida, 1 de Spongillina, 1 de Agelasida, 1 de Astrophorida, 1 de Spirophorida, 2 de Halichondrida, 3 do grupo de demosponjas G3, 3 do grupo G2, e 4 do grupo G1;

As sequências obtidas de 16S e 28S complementares para cada espécime foram combinadas, após alinhamento individual (ver abaixo), em um novo alinhamento único, somente para fins filogenéticos. Alguns organismos utilizados para fins comparativos, por ausência de sequências disponíveis de um ou outro marcador, foram analisados como táxons compostos, onde um táxon supra-específico foi combinado com o diretamente mais próximo cujas sequências estavam disponíveis (gênero > família > ...). As sequências que foram combinadas desta forma estão indicadas nos Apêndices A e C. As análises filogenéticas utilizando o dados combinados de 16S e 28S consideraram diferentes modelos evolutivos para cada marcador (os melhores estimados, ver abaixo).

#### 1.2.5. Modelos e saturação de substituição

Para cada um dos alinhamentos foi estimado o modelo mais provável de substituição de nucleotídeos determinado por meio do Critério de Informação Bayesiana (BIC, *Bayesian information criterion*), utilizando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). A heterogeneidade das taxas evolutivas foram modeladas usando uma distribuição Gamma (+G) discreta com cinco categorias e assumindo que uma fração dos sítios eram evolutivamente invariáveis (+I). Para estimar os valores de Máxima Verossimilhança (ML, *Maximum Likelihood*), uma topologia de árvore foi automaticamente computada usando o algoritmo de Agrupamento de Vizinhos (NJ, *Neighbor Joining*) com o modelo TN93. A saturação de substituição de nucleotídeos foi estimada por meio da correlação entre a distância genética, e as taxas de transições (s) e transversões (v) entre pares de sequências, utilizando o programa DAMBE v5.2.9 (XIA e XIE, 2001). As distâncias genéticas foram estimadas por meio do modelo determinado como descrito acima, ou o mais próximo deste quando indisponível. Os gráficos de dispersão foram construídos utilizando o programa Microsoft® Excel® 2003, e as curvas de ajuste foram estimadas por mínimos quadrados usando um modelo binomial. Uma vez que o marcador *cox1* é uma região codificante de proteínas, este teve seu modelo de

substituição e estimativa de saturação determinados tanto pela totalidade das posições como independentemente para cada uma das três posições do código genético (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup>).

Adicionalmente, para fins comparativos, foi gerada uma matriz de distância genética entre pares de sequências, utilizando o modelo de substituição como determinado acima, ou o mais próximo deste quando indisponível, para cada um dos alinhamentos usando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). A partir das matrizes de distância genética foram construídos gráficos usando a ferramenta *Matrix rainbow plot* do módulo PopTools v 3.2 (HOOD, 2010) implementado no programa Microsoft® Excel® 2003. As sequências nas matrizes foram ordenadas de acordo com a classificação atual das espécies representadas, onde *Mycale*, e seus subgêneros, iniciaram a ordenação, seguidas pelas demais Mycalina, Microcionina, Myxillina, G4 (Hadromerida, Halichondrida, Agelasida, Spirophorida, Astrophorida e Spongillina), G3, G2 (Cerongida e Chondrosida) e G1 (Dendroceratida e Dictyoceratida). A ordenação dentro de cada grupo seguiu a ordem alfabética.

#### 1.2.6. Reconstruções filogenéticas

Dois métodos de reconstrução filogenética distintos foram aplicados neste trabalho em cada um dos alinhamentos produzidos: o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (ML, *Maximum Likelihood*) e o método de Inferência Bayesiana (BI, *Bayesian Inference*). Nas análises supra-genéricas (que consideraram sequências de Mycalina e outras demosponjas, *i.e.*, 16S-supra, 28S-supra e cox1), foram utilizadas uma árvore de restrição (*constraint tree*), a qual restringe a busca de árvores a uma determinada topologia. Isto se deu a fim de reduzir potenciais relações evolutivas errôneas entre sequências divergentes, uma vez que os marcadores utilizados apresentam menor número de posições, e, potencialmente, menor sinal filogenético comparativamente aos conjuntos de dados mais abrangentes. A topologia de restrição foi empregada tanto por meio da construção manual de uma árvore-esqueleto (*backbone tree*) em formato NEWICK quanto por linha de comando. Essas topologias de restrições foram determinadas a partir de estudos mais abrangentes e com maiores conjuntos de dados, que focaram nas relações evolutivas entre táxons supra-específicos de demosponjas (LAVROV *et al.*, 2008; MORROW *et al.*, 2012), e sua notação parentética foi: (((Ectyoplasia, Iotrochota, Suberites, Tethya, Topsentia, Ptilocalis, Ephydatia, Agelas, (Cinachyrella, Geodia)), (Amphimedon, Callyspongia, Xestospongia)), ((Halisarca, Chondrilla, Aplysina), (Hippospongia, Ircinia, Igernella))); Nas análises sub-



genéricas os grupo-externo utilizados foram *Podospingia* sp. e *Cladorhiza flosabyssi*, respectivamente para os alinhamentos 16S-sub e 28S-sub.

As análises de ML foram realizadas usando o programa RAxML BlackBox (STAMATAKIS *et al.*, 2008) por meio de um servidor *online*. Este programa implementa somente modelos de substituição baseados em GTR (*Generalised time-reversible*; TAVARÉ, 1986), os quais são estimados automaticamente. Embora seja amplamente discutida a validade da utilização de outros modelos, uma vez que os demais nada mais são do que casos especiais do GTR, e haja uma certa convenção no uso de modelos específicos selecionados *a priori* por modelagem para análises de ML, este foi escolhido principalmente por ser um dos poucos programas que implementam reconstruções por ML com o uso de árvores-esqueleto. A modelagem da heterogeneidade das taxas evolutivas foi realizada usando uma distribuição Gamma (+G) discreta com quatro categorias. A busca da árvore com melhor valor de ML foi feita utilizando o algoritmo LSR (*Lazy Subtree Rearrangement*) após reamostragem a partir de 100 réplicas utilizando o algoritmo de *bootstrap* rápido (número padrão definido pelo servidor).

As análises de BI foram realizadas utilizando o programa MrBayes v3.2.1 (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003). Para tal, foi utilizado o modelo de substituição adequado para cada marcador, como determinado acima, e a heterogeneidade das taxas evolutivas foi modelada usando uma distribuição Gamma (+G) discreta com quatro categorias. As buscas de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC, *Markov Chain Monte Carlo*) foram realizadas com quatro cadeias ao longo de, pelo menos um milhão ( $10^6$ ) de gerações, ou até que as corridas se tornassem estacionárias – seja estimando por meio do desvio-padrão médio das frequências divididas (aproximadamente 0,01) ou pela flutuação aleatória dos valores de verossimilhança das cadeias frias. Os valores dos parâmetros foram amostrados a cada 100 gerações, sendo que 25% destes foram descartados. Quando o fator de redução de escala potencial (PSRF, *Potential Scale Reduction Factor*) obtido para cada parâmetro foi muito diferente de 1,0, a análise foi repetida com um tempo maior de gerações.

### 1.3. Resultados

#### 1.3.1. Extração, amplificação e sequenciamento

No total, mais de 300 amostras foram utilizadas neste trabalho, sendo que aproximadamente 90 destas foram extraídas por colaboradores. O rendimento médio das purificações de DNA foi de 70 ng/ $\mu$ l, com uma relação média de OD 260/280 = 1,76 e 260/230 = 1,13. As amostras foram submetidas à amplificação *in vitro* por PCR utilizando diferentes conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores. O sucesso de amplificação dos marcadores aproveitados nas análises subsequentes apresentou grande variação, tendo sido o marcador 28S o mais bem sucedido, com ca. 55% de sucesso de amplificação e somente 10% de probabilidade amplificação não-específica (Apêndice C).

#### 1.3.2. Modelos e saturação de substituição

Os alinhamentos finais, utilizados para análise, obtidos após congruência entre os dois métodos de busca local e remoção completa das posições contendo intervalos, apresentaram diferentes números de sítios, assim como diferentes números de sítios variáveis e conservados (Apêndice E). O alinhamento de 16S-supra, com 78 sequências, apresentou um número total de sítios de 454 pb, 222 pb dos quais se mostraram informativos e 57 pb eram mutações únicas. Por sua vez, o alinhamento de 16S-sub, com 91 sequências, gerou 462 pb, sendo 153 pb informativos e 24 pb constituindo-se em mutações únicas. O alinhamento de 28S-supra, baseou-se em 125 sequências, alcançando 336 pb, sendo 73 pb informativos e 17 pb mutações únicas. Já o 28S-sub, com 69 sequências, gerou 322 pb no total, com apenas 13 destes mostrando-se informativos e 47 sendo mutações únicas. Por último, o alinhamento de *cox1*, com 69 sequências, apresentou 559 pb, sendo 289 pb informativos e 24 pb mutações únicas. Ainda neste alinhamento, 187 pb pertenciam à 1ª posição do código genético, e 186 pb às 2ª e 3ª posições.

As estimativas dos modelos evolutivos de cada alinhamento podem ser encontradas no Apêndice E. Os melhores modelos escolhidos pelo Critério de Informação Bayesiana (BIC) de cada alinhamento podem ser encontrados na Tabela 1.1. O melhor modelo de substituição do alinhamento supra-genérico do marcador 16S foi o GTR+G, com valor de Gamma = 0,44. O melhor modelo do alinhamento subgenérico do mesmo marcador foi o T92+G, com Gamma = 0,32. Os melhores modelos de substituição encontrados para os alinhamentos com o marcador 28S foram, respectivamente para os conjuntos de dados supra- e subgenéricos,

K80+G+I, com Gamma = 0,34 e proporção de sítios invariáveis = 0,58, e K80+G, com Gamma = 0,11. Por sua vez, o alinhamento com o marcador *cox1* apresentou como melhor modelo o T92+G+I, com Gamma = 0,46 e I = 0,31. Contudo, quando as buscas pelo melhor modelo com *cox1* foram feitas considerando independentemente cada posição do código genético, estas resultaram em modelos distintos (Tabela 1.1). O melhor modelo encontrado considerando todas as posições do código genético (T92+G+I) se encontrou em posições variáveis nas estimativas de modelos restritas a uma determinada posição do códon, sendo o quarto (1ª posição do códon), décimo segundo (2ª posição do códon) e terceiro (3ª posição do códon) modelo em ordem de adequação por meio do BIC (Apêndice E). O melhor modelo da 1ª posição (K80+G) foi o sexto e nono modelo na ordem do BIC para as 2ª e 3ª posições, respectivamente. Já o modelo da 2ª posição (GTR+G) foi o quinto e oitavo modelo para as 1ª

Tabela 1.1. Resumo dos melhores modelos de substituição de nucleotídeos estimados a partir de cada alinhamento. Os alinhamentos modelados dos genes 16S do RNAr do genoma mitocondrial (16S), 28S do RNAr do genoma nuclear (28S) e subunidade 1 da Citocromo c oxidase do genoma mitocondrial (*cox1*), tanto considerando táxons supra-genéricos a *Mycete* (supra) quanto com uma amostragem abrangente dos subgêneros do mesmo (sub), ou considerando as posições do código genético independentemente (1ª, 2ª e 3ª) são mostrados. Os modelos foram escolhidos por meio do Critério de Informação Bayesiana (BIC, *Bayesian information criterion*). Os escores são mostrados, assim como os valores do Critério de Informação de Akaike corrigido (AICc, *Akaike Information Criterion, corrected*), os valores de Verossimilhança Máxima (lnL, dada em logaritmo neperiano), e os números de parâmetros (incluindo tamanho de ramos) em cada análise (#Par.). A heterogeneidade das taxas evolutivas, usando um modelo de distribuição Gamma (+G) com cinco categorias, e a proporção de sítios evolutivamente invariáveis (+I), quando aplicáveis ao modelo, são mostradas. Os valores assumidos ou estimados de transição/transversão (R) do melhor modelo são mostrados para cada alinhamento. As análises foram realizadas no programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). Ver texto e Apêndice E para mais detalhes.

| Alinhamento      | Modelo*  | #Par. | BIC      | AICc     | lnL       | (+I) | (+G) | R    |
|------------------|----------|-------|----------|----------|-----------|------|------|------|
| 16S (supra)      | GTR+G    | 162   | 14388,46 | 13028,22 | -6351,31  | n/a  | 0,44 | 2,24 |
| 16S (sub)        | T92+G    | 182   | 6778,20  | 5206,15  | -2420,28  | n/a  | 0,32 | 1,64 |
| 28S (supra)      | K80+G+I  | 250   | 7291,96  | 5133,61  | -2315,30  | 0,58 | 0,34 | 2,61 |
| 28S (sub)        | K80+G    | 137   | 3046,79  | 1951,32  | -837,80   | n/a  | 0,11 | 2,63 |
| <i>cox1</i>      | T92+G+I  | 139   | 22249,61 | 21063,79 | -10392,38 | 0,31 | 0,46 | 1,72 |
| <i>cox1</i> (1ª) | K80+G    | 137   | 5173,16  | 4156,41  | -1939,69  | n/a  | 0,32 | 1,57 |
| <i>cox1</i> (2ª) | GTR+G    | 144   | 2699,17  | 1631,44  | -670,04   | n/a  | 0,16 | 0,74 |
| <i>cox1</i> (3ª) | TN93+G+I | 142   | 15752,75 | 14699,81 | -7206,27  | 0,03 | 1,27 | 2,52 |

\* Abreviações dos modelos: GTR: modelo geral reversível no tempo (*General Time Reversible*); T92: Tamura 3-parâmetros; K80: Kimura 2-parâmetros; TN93: Tamura-Nei.

e 3ª posições. E o modelo da 3ª posição (TN93+G+I) foi o nono melhor modelo na ordem BIC tanto para a 1ª quanto para a 2ª posição do código genético.

As estimativas de saturação de substituição de nucleotídeos, por meio das correlações entre taxa de transição e transversão e distância genética, indicaram que haveria saturação a partir de um certo ponto, independentemente do marcador, com a única exceção sendo o alinhamento 16S-sub. Nos alinhamentos 16S-supra, 28S-supra e *cox1*, que consideraram sequências de organismos evolutivamente diversos, esta se mostrou bem mais evidente. Na estimativa de saturação do alinhamento 16S-supra (Figura 1.5.A), é possível observar que esta ocorreria entre sequências com distâncias genéticas a partir de 0,25, sendo evidente a partir de 0,40. O que não é surpreendente se considerarmos que a razão de transições por transversões (R) encontrada para o modelo GTR foi de 2,24, evidenciando uma maior probabilidade quase quatro vezes e meia maior de mutações do tipo transição (s) do que transversão (v). Contudo, ao restringir a estimativa somente às sequências de *Mycale*, no alinhamento 16S-sub (Figura 1.5.B), pode-se observar que não há uma tendência clara da ocorrência de saturação, possivelmente, uma vez que as distâncias entre as sequências se encontram abaixo dos limiares de saturação encontrados acima. Se considerarmos que o valor de R encontrado neste alinhamento foi igual a 1,64 para o melhor modelo, se teria uma probabilidade de transição três vezes e um terço maior do que de transversão.

Por sua vez, no alinhamento 28S-supra (Figura 1.6.A), se observa uma tendência de saturação a partir de distâncias genéticas de 0,10 para o modelo K80, a qual se torna evidente a partir de 0,13. Dado o R de 2,61 para este modelo, a probabilidade s maior do que cinco vezes a v evidencia que a ocorrência de saturação em sequências divergentes é praticamente inevitável. E, similar ao ocorrido com o alinhamento 16S-sub, as taxas de transição e transversão no alinhamento 28S-sub (Figura 1.6.B), revelam que, aparentemente, não há efeito de saturação entre organismos geneticamente próximos. Contudo, devido à alta uniformidade genética entre as sequências de *Mycale* para este marcador (ver Figura 1.11), pode-se observar que uma distribuição disjunta dos dados ao longo do gráfico. Neste, as comparações entre as sequências de *Mycale* se restringem a uma distância genética de 0,03, até a qual não há indícios de saturação. O efeito de saturação observado, a partir de 0,17, se restringe às comparações com o grupo-externo utilizado. Contudo, mesmo neste curto intervalo de distância, é possível ver uma alta taxa de transição em contraste com a de transversão, o que resulta em um dos maiores R encontrados, igual a 2,63, e uma probabilidade cinco vezes maior de s do que v.

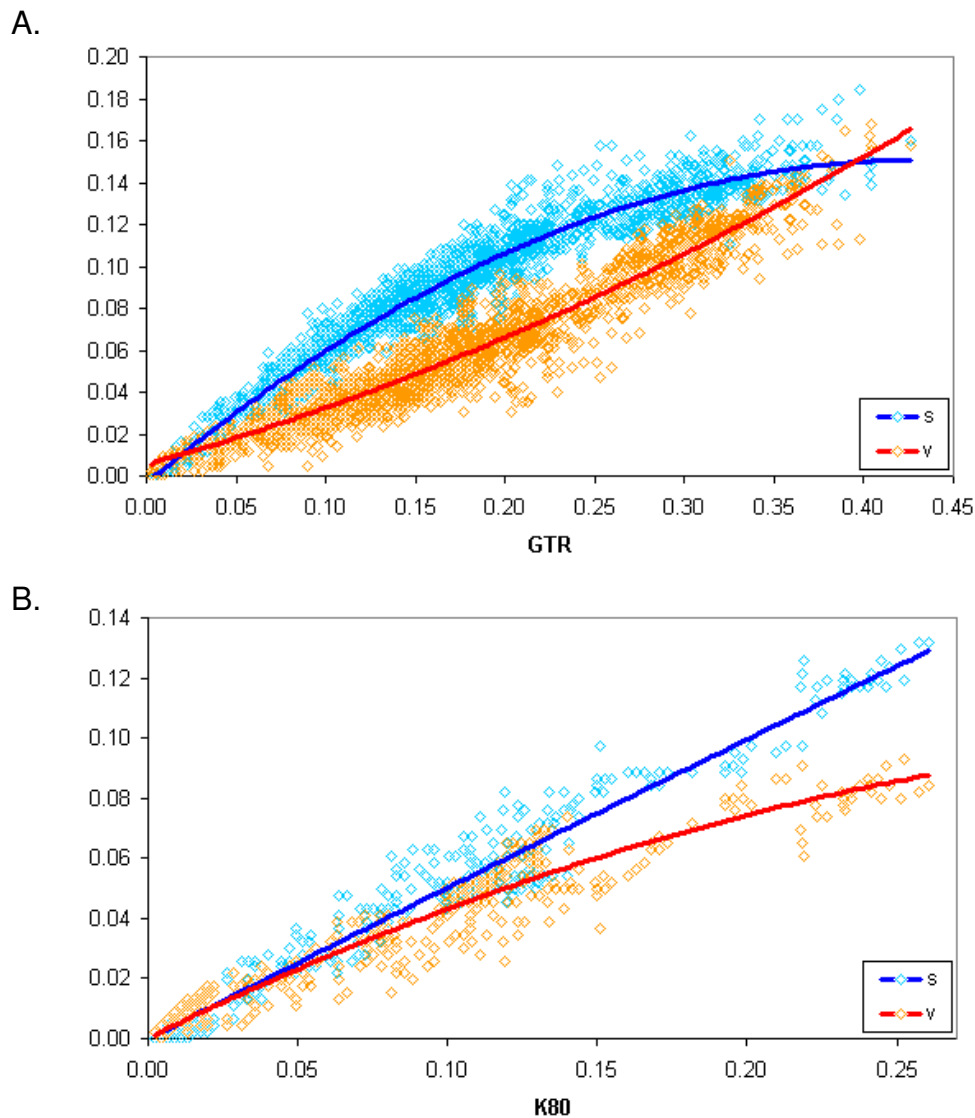


Figura 1.5. Gráfico de dispersão entre distância genética e transições e transversões de pares de sequências dos alinhamentos 16S-supra (A) e 16S-sub (B). As distâncias genéticas, calculadas com base no melhor modelo estimado, ou o mais próximo disponível, e as taxas de transição (s) e transversão (v) foram calculadas usando o programa DAMBE v 5.2.9 (XIA e XIE, 2001). A legenda indica as dispersão entre a distância genética e as transições (azul) e transversões (laranja). As curvas de ajuste foram estimadas por mínimos quadrados usando um modelo binomial. Ver texto para mais detalhes.

Por fim, o alinhamento *cox1* (Figura 1.7.A) apresentou uma saturação de substituição de nucleotídeos evidente a partir de distâncias de 0,07, e uma probabilidade de substituição do tipo s quase três vezes e meia maior do que v, com um  $R = 1,72$ . Contudo, por se tratar de uma região codificante de proteínas, é esperado que posições diferentes do código genético

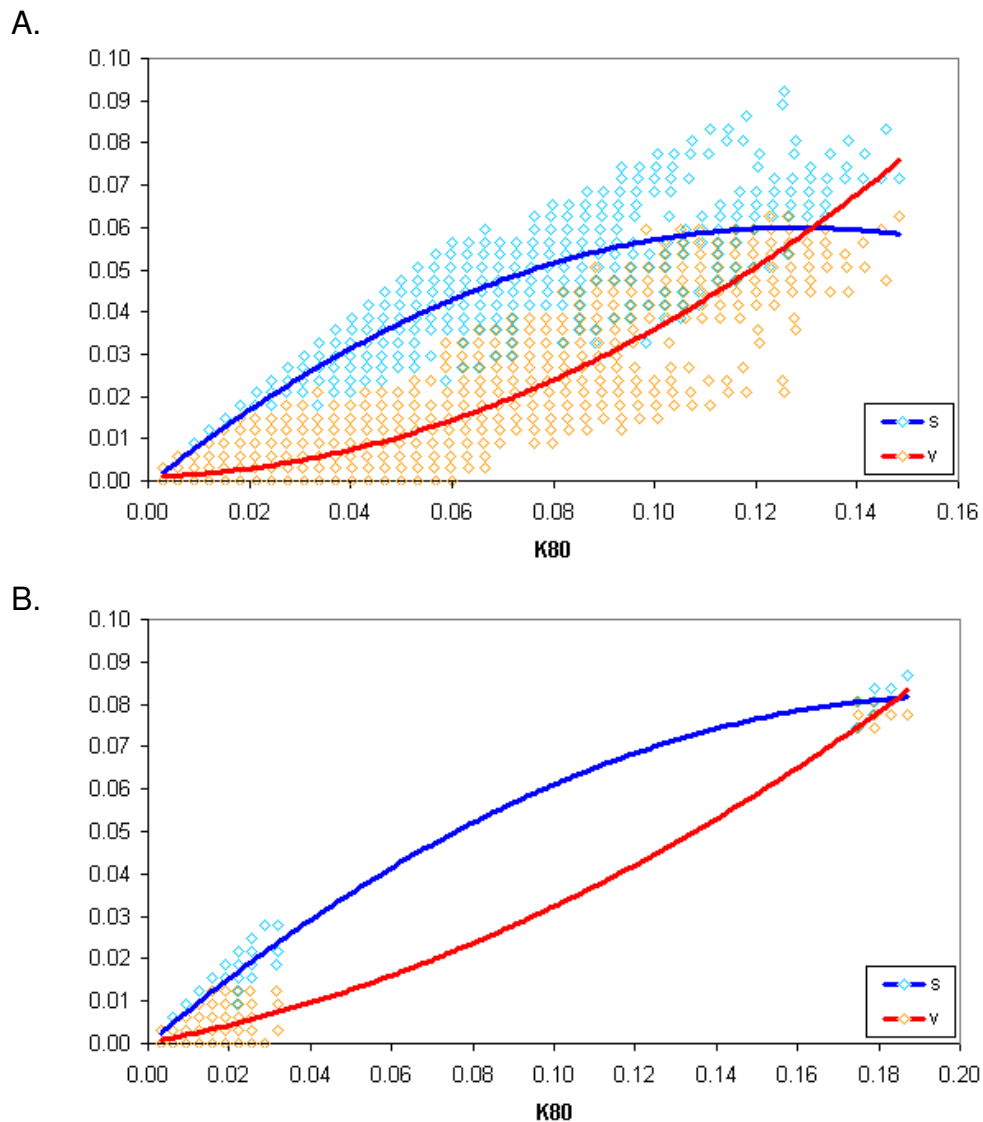


Figura 1.6. Gráfico de dispersão entre distância genética e transições e transversões de pares de sequências dos alinhamentos 28S-supra (A) e 28S-sub (B). As distâncias genéticas, calculadas com base no melhor modelo estimado, ou o mais próximo disponível, e as taxas de transição (s) e transversoão (v) foram calculadas usando o programa DAMBE v 5.2.9 (XIA e XIE, 2001). A legenda indica a dispersão entre a distância genética e as transições (azul) e transversões (laranja). As curvas de ajuste foram estimadas por mínimos quadrados usando um modelo binomial. Ver texto para mais detalhes.

apresentem taxas de substituição diferentes entre si, sobretudo devido à degeneração do código por conta da oscilação da terceira base. Desta forma, nas estimativas de saturação independentes para cada posição do códon (Figura 1.7.B), é possível observar que

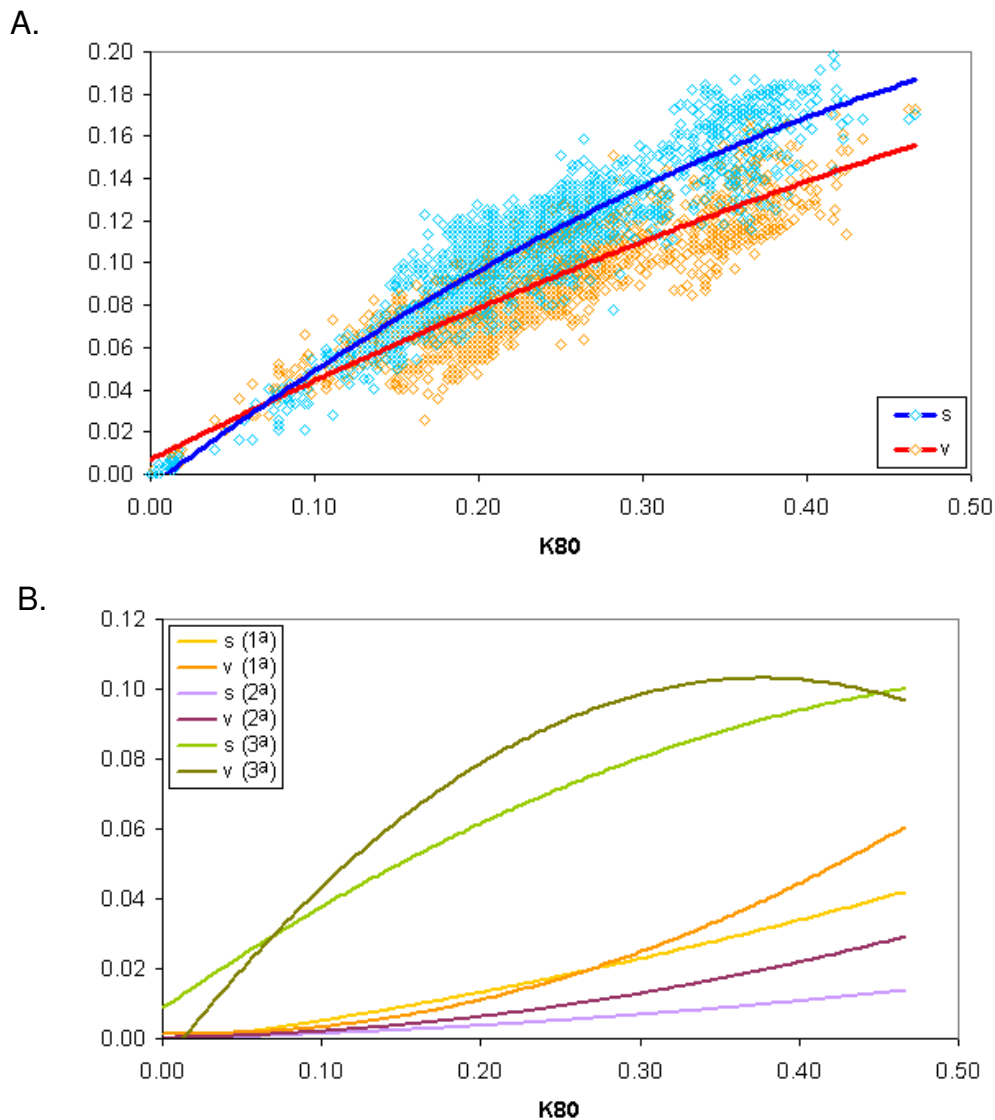


Figura 1.7. Gráfico de dispersão entre distância genética e transições e transversões de pares de sequências do alinhamento *cox1* considerando todas as posições (A) e independentemente para cada posição do código genético (B). As distâncias genéticas, calculadas com base no modelo mais próximo disponível do melhor modelo estimado para todas as posições, e as taxas de transição (s) e transversão (v) foram calculadas usando o programa DAMBE v 5.2.9 (XIA e XIE, 2001). A legenda do gráfico A indica as dispersão entre a distância genética e as transições (azul) e transversões (laranja). Devido à alta sobreposição de pontos no gráfico B, estes foram omitidos, sendo apresentadas somente as curvas de ajuste para as correlações em cada posição (1<sup>a</sup>, tons de laranja; 2<sup>a</sup> tons de roxo; 3<sup>a</sup> tons de verde). As curvas de ajuste foram estimadas por mínimos quadrados usando um modelo binomial. Ver texto para mais detalhes.

a tendência de saturação é bem diferente entre as três posições. Enquanto que na 1<sup>a</sup> posição não há nenhuma tendência à saturação, cujo R estimado foi de 0,72, implicando em uma probabilidade de s somente uma vez e meia da de v, na 2<sup>a</sup> posição, cujo R = 1,57, ou seja,

uma probabilidade de *s* um pouco maior do que três vezes do que *a* de *v*, esta se evidencia a partir de distâncias genéticas de 0,27. Contudo, a evidência de saturação de substituição na 3<sup>a</sup> posição do código genético se dá já em distâncias genéticas a partir de 0,06, apresentando uma probabilidade mais do que cinco vezes maior de *s* do que *v*, com um  $R = 2,52$  para o melhor modelo de substituição escolhido.

Com base nas matrizes de distância genética foi possível observar alguns padrões iniciais que, mais tarde, se comprovaram factíveis por meio das análises filogenéticas. Por exemplo, na matriz de distância do alinhamento 16S-supra (Figura 1.8), verifica-se que as sequências de *Mycale* apresentam uma relativa homogeneidade entre si, com baixos valores de distância (até 0,15), à exceção de duas sequências, uma pertencente à uma amostra de *M. (Aeg.) phillipensis* e outra à *M. (M.) laevis*, que apresentaram valores comparativamente mais elevados. Similarmente, na matriz de distância do alinhamento 16S-sub (Figura 1.9), se vê que a distância genética de *M. (M.) laevis* ultrapassa em muito a encontrada entre outras espécies do gênero. Outro exemplo inclui a alta divergência genética em famílias de Mycalina, principalmente aquelas pertencentes à Esperipsidae e Isodictyidae, que se destacam em distância, inclusive de todas as demais demosponjas analisadas. Na matriz de 16S-sub também é possível constatar a anomalia em que a distância observada entre membros de diferentes subgêneros, tais como *M. (Aegogropila) tunicata*, *M. (M.) phyllophila* e *M. (M.) vansoesti sensu* Calcinaï e colaboradores (2006), é maior relativamente a seus pares subgenéricos, que se comparadas a integrantes de outros subgêneros. Um grau de divergência relativamente alto também foi encontrado em alguns subgêneros como, por exemplo, *M. (Aegogropila)*, embora outros, como *M. (Zygomycale)*, tenham se mostrado mais homogêneos.

Por sua vez, na matriz de distância do alinhamento 28S-supra (Figura 1.10), é igualmente possível ver uma homogeneidade entre as sequências de *Mycale*, aparentemente maior até do que a encontrada em 16S. Neste caso, a exceção se dá pela sequência de *M. (Anomomycale) titubans*, divergindo em alto grau das demais *Mycale*, indo encontrar maior similaridade com membros de Esperipsidae e Myxillina. Similarmente, as sequências de *M. fibrexilis* também apresentam menor distância com outras Myxillina do que entre seus pares em *Mycale*. No mais, a divergência encontrada entre as sequências de Poecilosclerida, em geral, é pouco distinguível, talvez apenas por certas Mycalina apresentarem maior similaridade com sequências pertencentes à Hadromerida do que a outras Poecilosclerida.



Menos se pode dizer a partir da matriz de distância do alinhamento 28S-sub (Figura 1.11), na qual as distâncias genéticas pouco ultrapassam a faixa de 0,03.

Por fim, na matriz de distância do alinhamento *cox1* (Figura 1.12), as sequências de *M. (M.) laevis* e *M. (Zygomycete) angulosa* se destacam por apresentar um alto grau de divergência em comparação tanto com as demais *Mycale* quanto com todas as demosponjas analisadas. De maneira semelhante ao anteriormente descrito, *M. fibrexilis*, aqui, também apresenta maior similaridade com sequências de *Myxillina* do que com outras *Mycale*. É possível verificar também que as sequências de *Desmacellidae* apresentaram uma alta divergência das demais *Myxillina* (*Mycale* inclusive), apresentando maior similaridade de sequência com outras demosponjas. Também é possível observar uma alta heterogeneidade em *Poecilosclerida*, na qual sequências pertencentes às diferentes subordens ora se mostram similares aos seus pares, ora mais próximas a outras subordens.

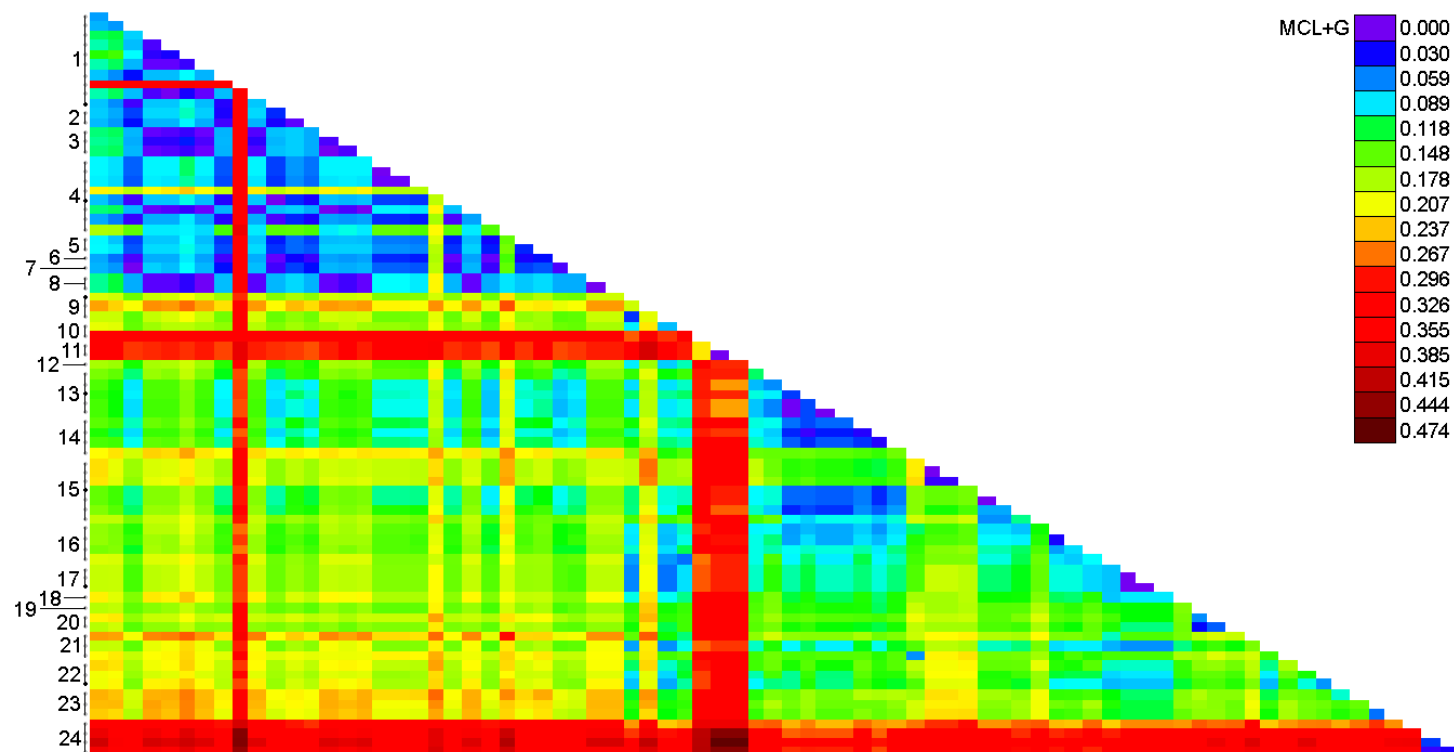


Figura 1.8. Matriz de distâncias genéticas pareadas entre sequências do alinhamento 16S-supra. As distâncias foram calculadas de acordo com o modelo de MCL (*Maximum Composite Likelihood*) com distribuição Gamma (+G) em quatro categorias usando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). O gradiente de cores da legenda indica a distância genética entre o par de sequências. Os números indicam os táxons das sequências: *Mycale* [1-8; subgêneros: *Aegogropila* (1), *Arenochalina* (2), *Carmia* (3), *Mycale* (4), *Naviculina* (5), *Oxymycale* (6), *Paresperella* (7), *Zygomycala* (8)], Mycalina [9-13; Desmacellidae (9), Esperlopsidae (10), Isodictyidae (11), Merliidae (12), Podospongiidae (13)], Microcionina [14], Myxillina [15], G4 [16-21; Hadromerida (16), Spongillina (17), Agelasida (18), Astrophorida (19), Spirophorida (20), Halichondrida (21)], G3 [22], G2 [23], G1 [24]. Ver texto para mais detalhes.

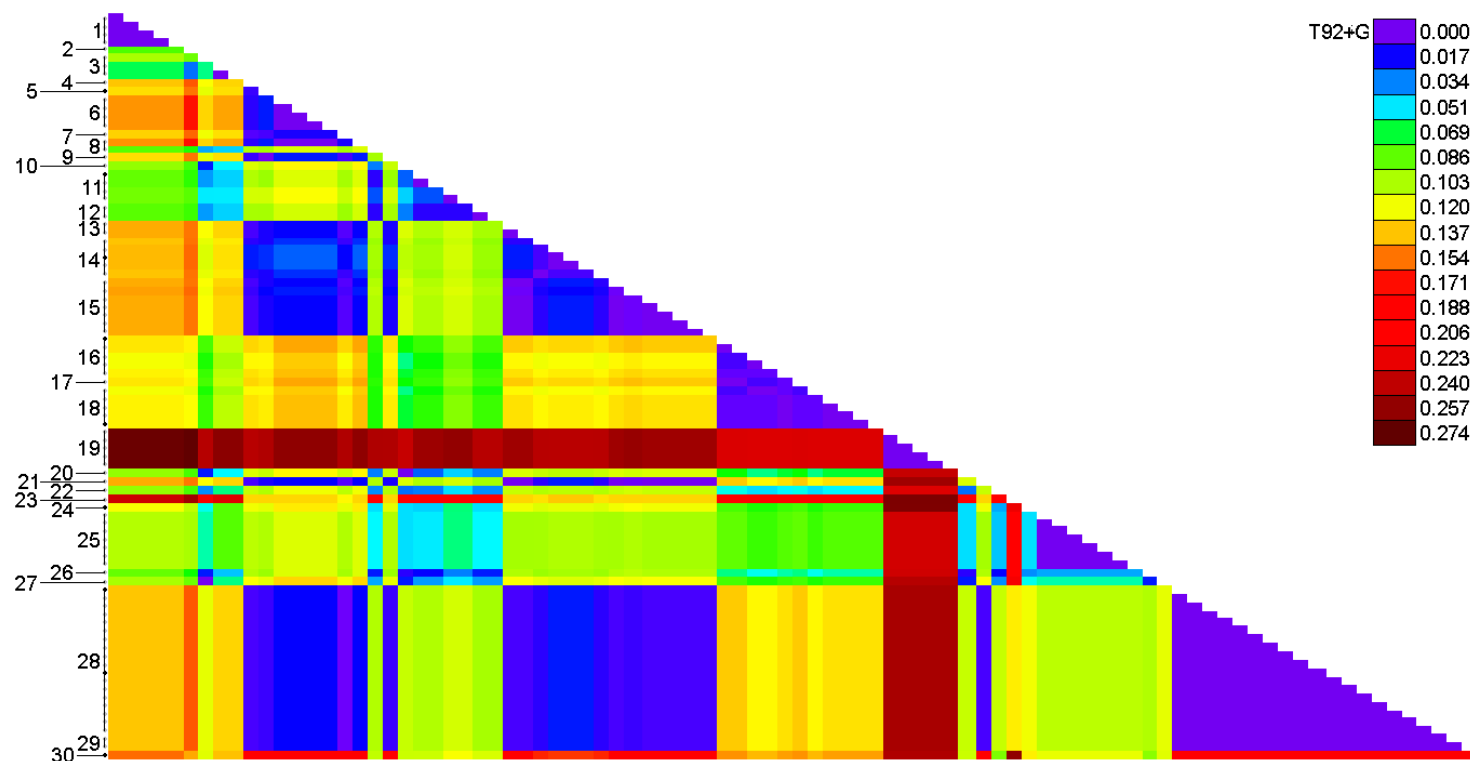


Figura 1.9. Matriz de distâncias genéticas pareadas entre sequências do alinhamento 16S-sub. As distâncias foram calculadas de acordo com o modelo de T92 (Tamura 3-parâmetros) com distribuição Gamma (+G) em quatro categorias usando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). O gradiente de cores da legenda indica a distância genética entre o par de sequências. Os números indicam os subgêneros de *Mycale*, seguidos pelo epíteto da espécie (1-29), e *Podospongia* sp. (30): (1-10) *Aegogropila* [(1) *americana*, (2) *carmigropila*, (3) *citrina*, (4) *contarenii*, (5) *crassissima*, (6) *escarlatei*, (7) *liliana*, (8) *magellanica*, (9) *syrinx*, (10) *tunicata*], (11-12) *Arenochalina* [(11) *laxissima*, (12) *mirabilis*], (13-15) *Carmia* [(13) *cecilia*, (14) *magnirhaphidifera*, (15) *microsigmatosa*], (16-23) *Mycale* [(16) *alagoana*, (17) *arenaria*, (18) cf. *alagoana*, (19) *laevis*, (20) *lingua*, (21) *phyllophila*, (22) *thielei*, (23) *vansoesti sensu* Calcinai et al.], (24-25) *Naviculina* [(24) *arcuiris*, (25) sp.], (26) *Oxymycale* [*acerata*]; (27) *Paresperella* [sp.], (28-29) *Zygomycale* [(28) *angulosa*, (29) *parishi*].

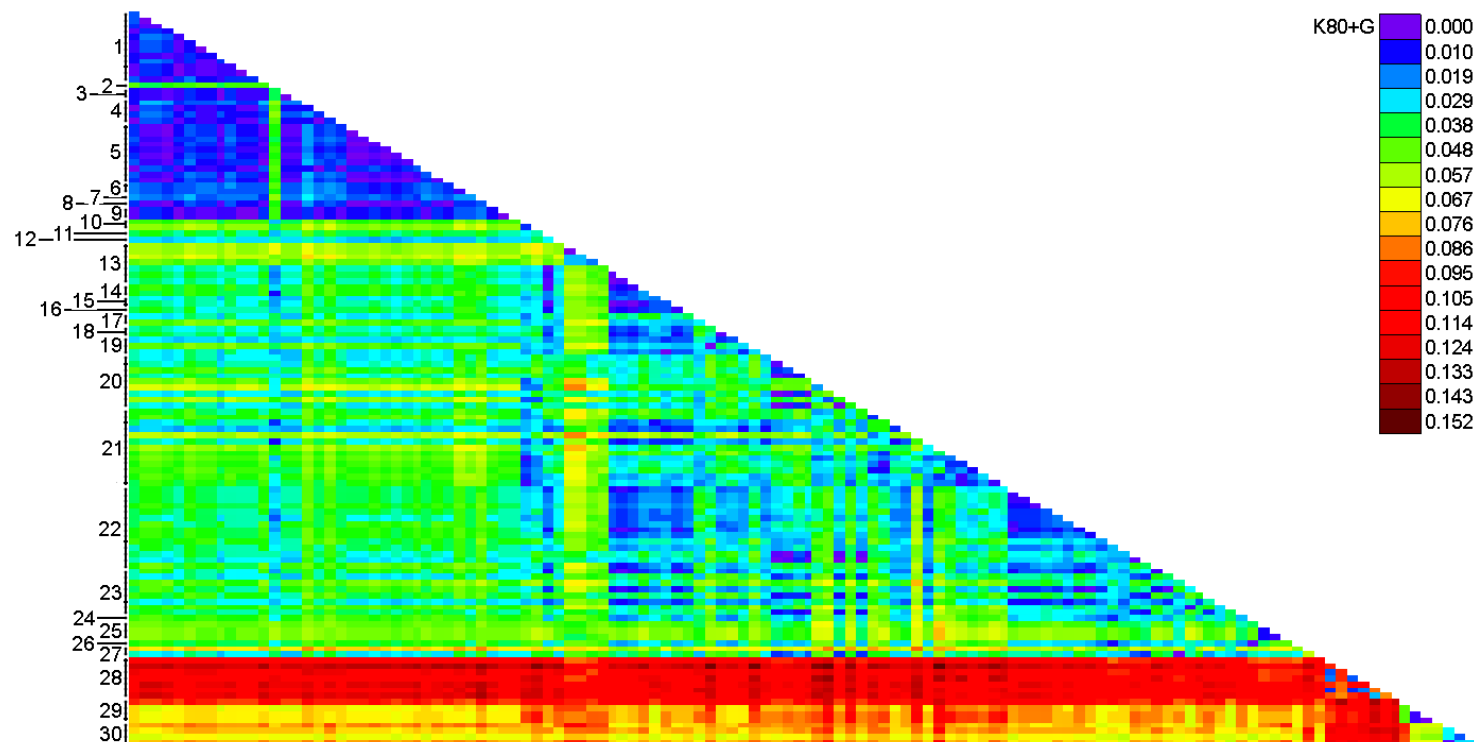


Figura 1.10. Matriz de distâncias genéticas pareadas entre sequências do alinhamento 28S-supra. As distâncias foram calculadas de acordo com o modelo de K80 (Kimura 2-parâmetros) com distribuição Gamma (+G) em quatro categorias usando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). O gradiente de cores da legenda indica a distância genética entre o par de sequências. Os números indicam os táxons das sequências: (1-9) *Mycale* [subgêneros: (1) *Aegogropila*, (2) *Anomomycale*, (3) *Arenochalina*, (4) *Carmia*, (5) *Mycale*, (6) *Naviculina*, (7) *Oxymycale*, (8) *Paresperella*, (9) *Zygomycala*], (10) *Mycale fibrexilis*, (11-19) Mycalina [(11) Mycalidae, (12) Cladorhizidae, (13) Desmacallidae, (14) Esperiopsidae, (15) Guitarridae, (16) Hamacanthidae, (17) Isodictyidae, (18) Merliidae, (19) Podospongiidae], (20) Microcionina, (21) Myxillina, (22-27) G4 [(22) Hadromerida, (23) Halichondrida, (24, 26) Agelasida, (25) Astrophorida, (27) Spongillina], (28) G3, (29) G2, (30) G1.

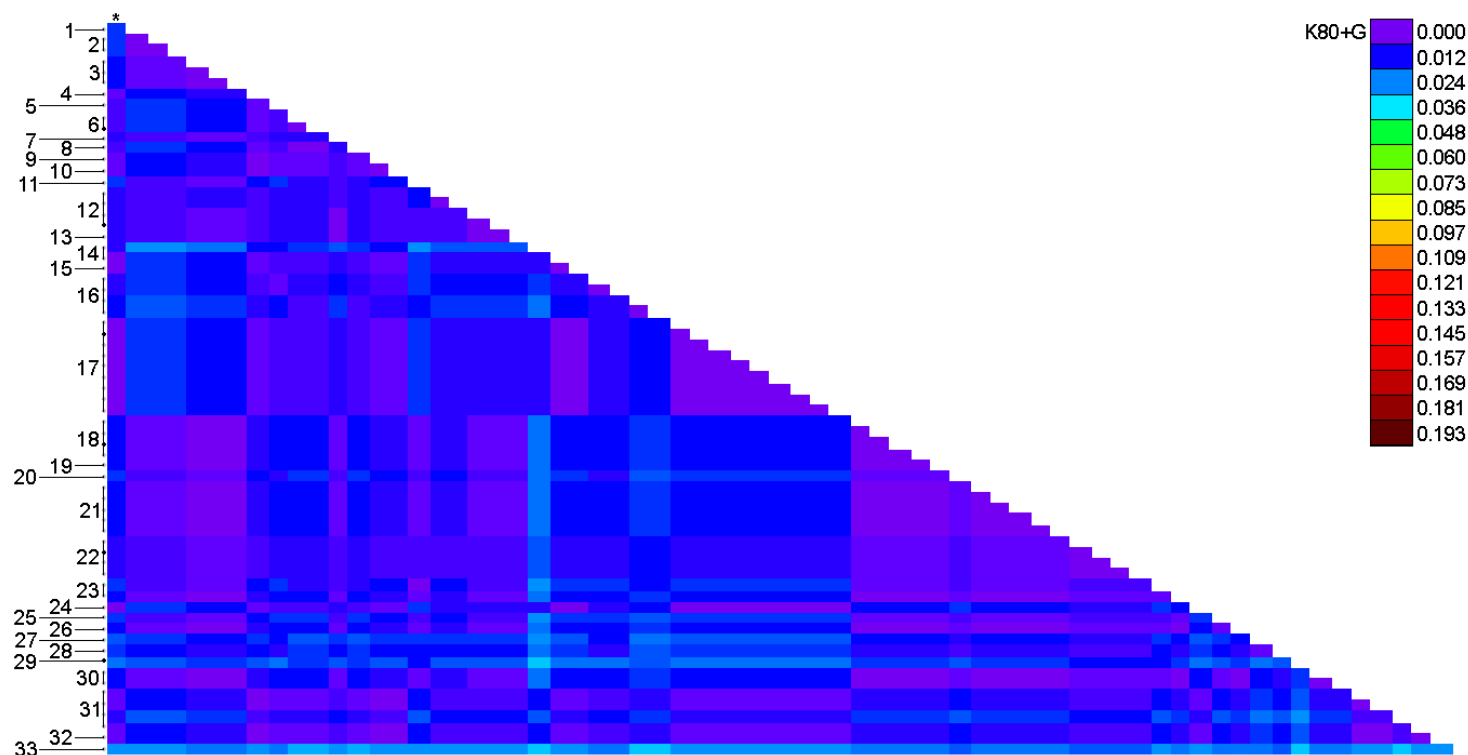


Figura 1.11. Matriz de distâncias genéticas pareadas entre seqüências do alinhamento 28S-sub. As distâncias foram calculadas de acordo com o modelo de K80 (Kimura 2-parâmetros) com distribuição Gamma (+G) em quatro categorias usando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). O gradiente de cores da legenda indica a distância genética entre o par de seqüências. Os números indicam os subgêneros de *Mycale*, seguidos pelo epíteto da espécie (1-32), e *Cladorhiza flosabyssi* [33]: (0-11) *Aegogropila* [(\*) *adhaerens*, (1) *americana*, (2) *carmigropila*, (3) *citrina*, (4) *contarenii*, (5) *escarlatei*, (6) *furcata*, (7) *magellanica*, (8) *rotalis*, (9) *sulevoidea*, (10) *syrinx*, (11) *tunicata*], (12-13) *Arenochalina* [(12) *laxissima*, (13) *mirabilis*], (14-17) *Carmia* [(14) *cecilia*, (15) *fistulifera*, (16) *magnirhaphidifera*, (17) *microsigmatosa*], (18-26) *Mycale* [(18) *alagoana*, (19) *arenaria*, (20) *grandis*, (21) *cf. alagoana*, (22) *laevis*, (23) *lingua*, (24) *phyllophila*, (25) *thielei*, (26) *tridens*], (27-28) *Naviculina* [(27) *arcuiris*, (28) *flagellifera*], (29) *Oxymycale acerata*; (30) *Paresperella* sp., (31-32) *Zygomycale* [(31) *angulosa*, (32) *parishi*].

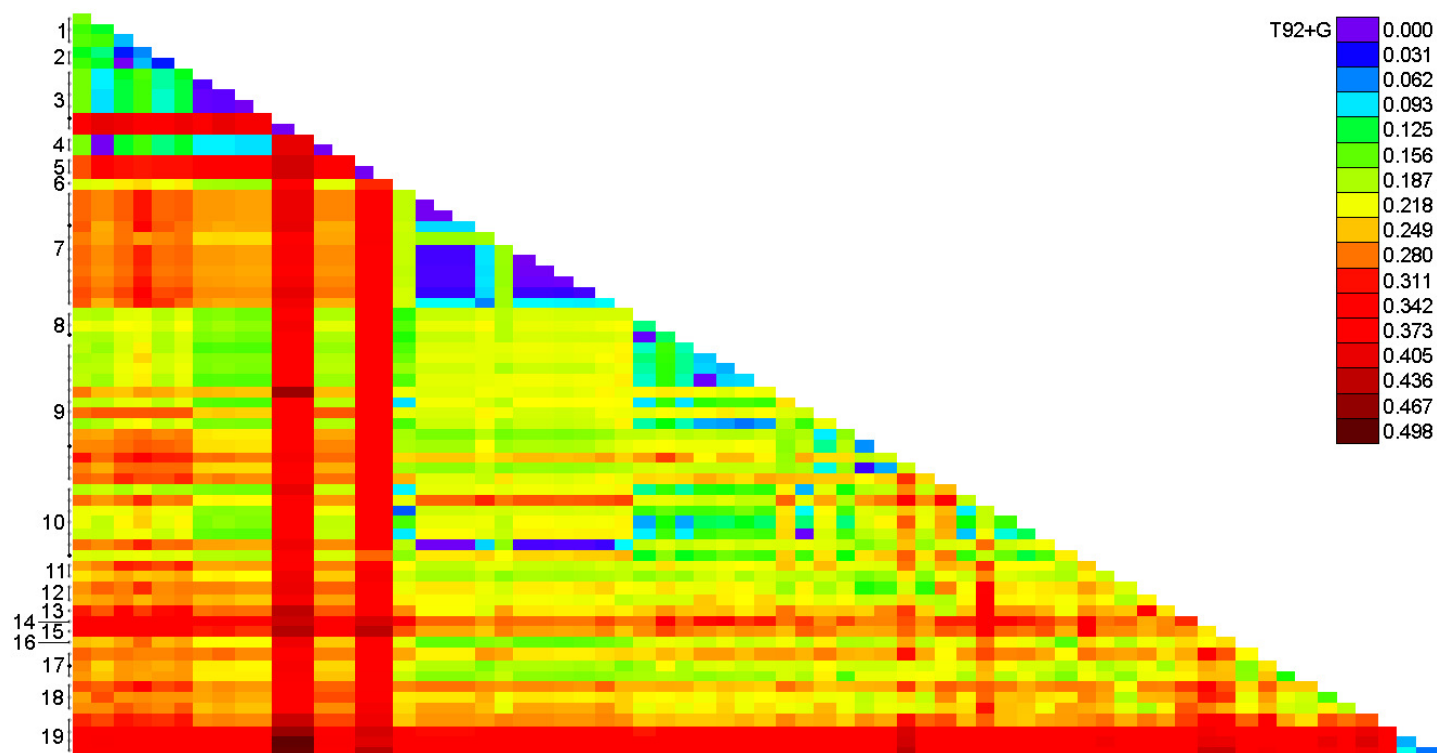


Figura 1.12. Matriz de distâncias genéticas pareadas entre seqüências do alinhamento *cox1*. As distâncias foram calculadas de acordo com o modelo de T92 (Tamura 3-parâmetros) com distribuição Gamma (+G) em quatro categorias usando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). O gradiente de cores da legenda indica a distância genética entre o par de seqüências. Os números indicam os táxons das seqüências: (1-6) *Mycale* [(1) *Aegogropila*, (2) *Arenochalina*, (3) *Mycale*, (4) *Paresperella*, (5) *Zygomycale*, (6) *Mycale fibrexilis*], (7-8) *Mycalina* [(7) Desmacellidae, (8) Podospongiidae], (9) Microcionina, (10) Myxillina, (11-16) G4 [(11) Hadromerida, (12) Halichondrida, (13) Agelasida, (14) Spirophorida, (15) Astrophorida, (16) Spongillina], (17) G3, (18) G2, (19) G1.

### 1.3.3. Reconstruções filogenéticas

#### 1.3.3.1. Reconstruções com o marcador 16S

As reconstruções filogenéticas supra-genéricas, realizadas com o marcador 16S por meio dos métodos de ML e BI (alinhamento 16S-supra; Figuras 1.13 e 1.14, respectivamente) recuperaram uma relação monofilética para a maioria das sequências de *Mycale* incluídas na análise (clado A), mas com baixos valores de suporte. A única exceção se deve à sequência de *M. (Aeg.) phillipensis*, que apresentou um ramo terminal extremamente longo, que nas análises, terminou por se relacionar mais proximamente a outras poeciloscleridas. É possível observar também que *Mycalina* se mostrou polifilética nas duas reconstruções, assim como a maioria das famílias. Dentre as relações de *Mycalina* com alto suporte, temos os podospongídeos *Negombata* e *Sigmosceptrella* como grupos-irmãos, da mesma forma que a relação de irmandade entre *Desmacella* aff. *annexa* (Desmacellidae) e *Merlia* (Merliidae). Embora *Neofibularia* e *Biemna* (Desmacellidae) se mostrem como grupos-irmãos, estes não se relacionam com *Desmacella*, sendo mais distantes das demais Poecilosclerida. De maneira similar, *Isodictya* (Isodictyidae) e *Ulosa* (Esperiopsidae) também se revelam como grupos-irmãos, mas *Esperiopsis* (Esperiopsidae) se encontra distante destes. E embora *Podospongia* e *Diacarnus* (Podospongiidae) se encontrem entre as Poecilosclerida, estes não se relacionam entre si, e nem com os demais gêneros da família.

As relações evolutivas internas ao clado A obtidas nas reconstruções supra-genéricas foram as mesmas que as encontradas nas reconstruções filogenéticas subgenéricas (alinhamento 16S-sub; Figuras 1.15 e 1.16), com a grande maioria dos cladogramas apresentando altos valores de suporte. Nestas, é possível observar *M. (M.) laevis* como grupo-irmão das demais *Mycale*, o qual também apresenta um ramo bem mais longo do que encontrado em outros grupos. Dentre as relações recuperadas temos um grande clado (B) que agrupa sequências dos subgêneros *Aegogropila*, *Carmia*, *Mycale* e *Zygomycale*. Neste, *M. (C.) magnirhaphidifera* se divide em dois grupos (1 e 2) e forma um grupo-irmão com as demais sequências (clado J). É possível também observar que as sequências de *M. (Z.) angulosa* e *M. (Z.) parishi* formam um grupo monofilético (clado H), assim como as sequências de *M. (C.) microsigmatosa*, *M. (C.) cecilia* e *M. (M.) phyllophila* (clado I). Dentre as sequências encontradas no clado J, temos *M. (M.) vansoesti sensu* Calcinai e colaboradores (2006), *M. (Aeg.) lilianae*, *M. (Aeg.) crassissima* e *M. (Aeg.) syrinx*, relacionadas entre si, *M. (Aeg.) contarenii*, uma sequência de *M. (Aeg.) magellanica* (1) e *M.*

(*Aeg.*) *escarlatai*, as três também relacionadas, sendo as duas últimas mais próximas entre si do que com a primeira. Foi recuperado também um clado (C) agrupando as sequências das espécies de *Arenochalina*, *M. (Are.) laxissima* e *M. (Are.) mirabilis*, e uma sequência de *M. (Aeg.) magellanica* (2), sendo que as sequências de *laxissima* se dividiram em dois grupos, um de indivíduos do Caribe e outros do Brasil, mais relacionado com *mirabilis*. Outro clado encontrado (D) agrupa três espécies de *Aegogropila*: *M. (Aeg.) americana*, *M. (Aeg.) carmigropila* e *M. (Aeg.) citrina*, os dois últimos mais próximos entre si. Outros clados menores agruparam as sequências de *M. (Paresperella)* sp. e *M. (Mycale) lingua* (clado E), *M. (Naviculina) arcuiris* e *M. (N.)* sp. (clado F), e *M. (M.) alagoana* e *M. (M.) arenaria* (clado G). *Mycale (M.) thielei* e *M. (Oxymycale) acerata* não agrupam em nenhum clado em específico, e suas relações com as demais *Mycale* se mostram conflitantes entre as análises de ML e BI, assim como os ramos mais internos das duas topologias.



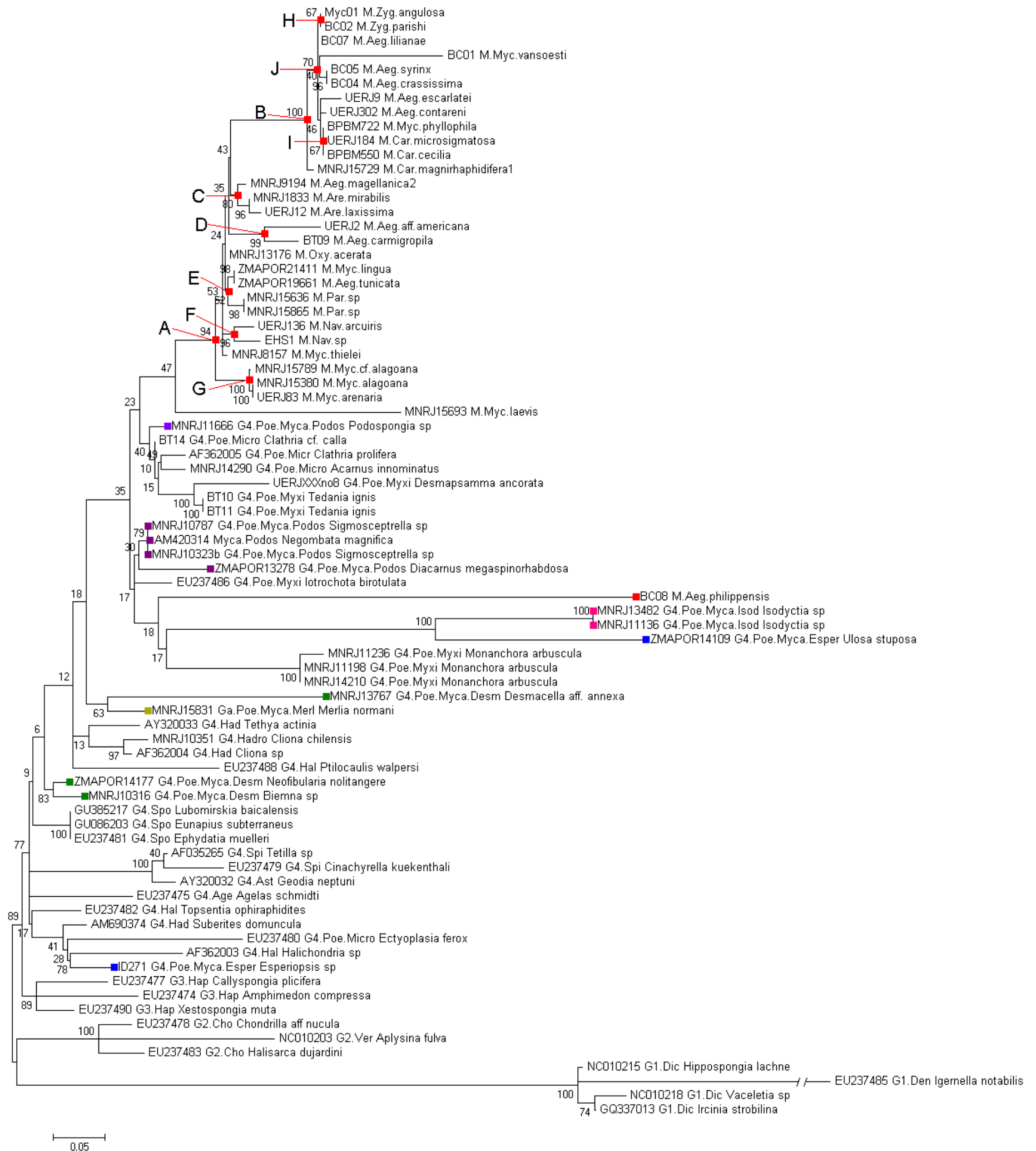


Figura 1.13. Reconstrução filogenética supra-genérica de *Mycale* Gray, 1867, utilizando o marcador 16S (16S-supra) pelo método de Máxima Verossimilhança (ML). Os valores de suporte são indicados acima dos ramos. As sequências estão listadas por seus números de tombo, seguidos da classificação sistemática do táxon, abreviada, e espécie. Os clados de *Mycale* citados no texto estão indicados por letras. As cores identificam as famílias de Mycalina: Mycalidae (vermelho), Isodyctiidae (rosa), Podospongiidae (roxo), Desmacellidae (verde), Merliidae (amarelo), Esperiopsidae (azul). Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.

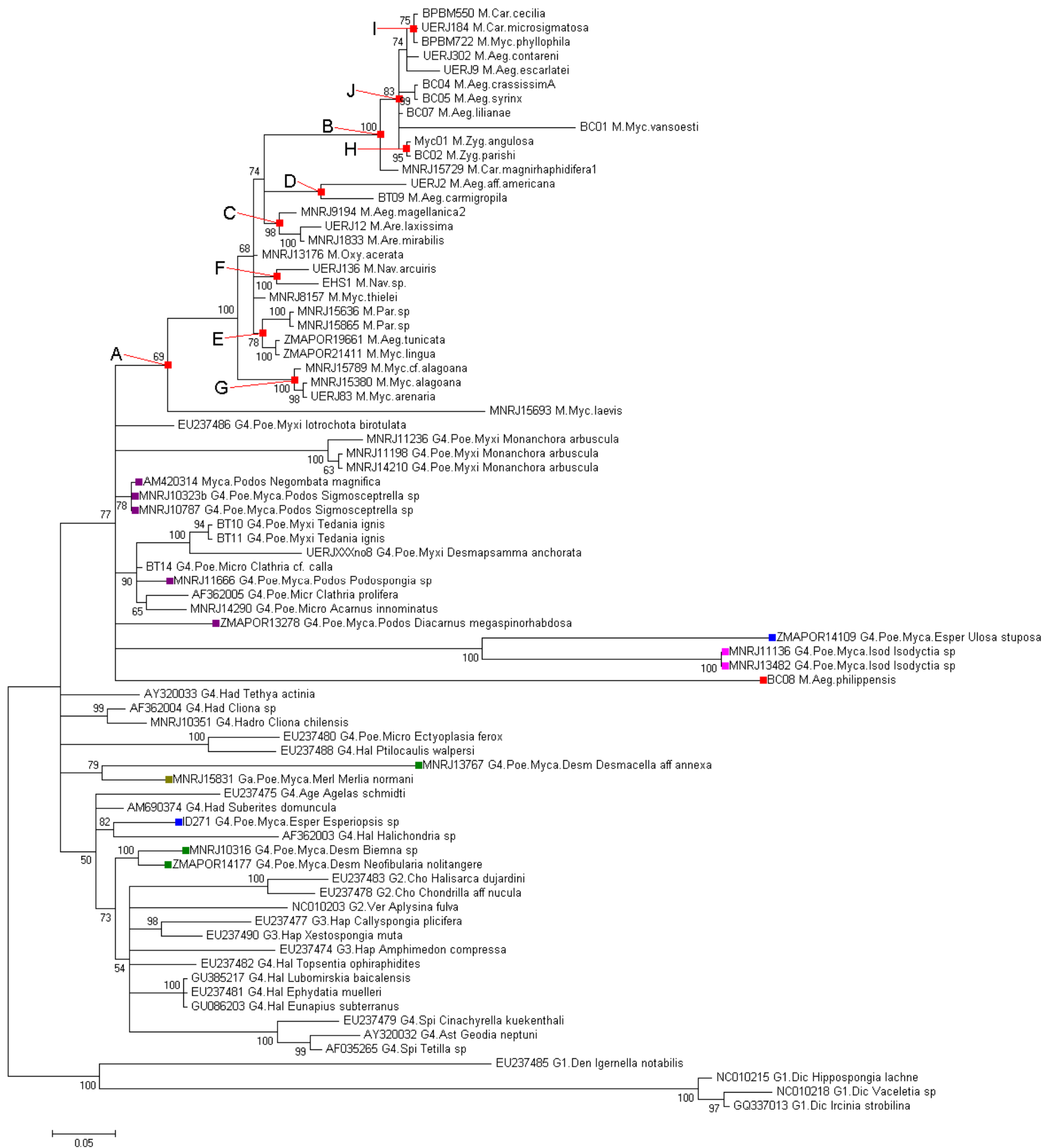


Figura 1.14. Reconstrução filogenética supra-genérica de *Mycale* Gray, 1867, utilizando o marcador 16S (16S-supra) pelo método de Inferência Bayesiana (BI). Os valores de suporte são indicados acima dos ramos. As sequências são listadas por seus números de tombo, seguidos da classificação sistemática do táxon, abreviada, e espécie. Os clados de *Mycale* de interesse são indicados por letras. As cores identificam as famílias de Mycalina: Mycalidae (vermelho), Isodyctiidae (rosa), Podospongiidae (roxo), Desmacellidae (verde), Merliidae (amarelo), Esperopsidae (azul). Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.

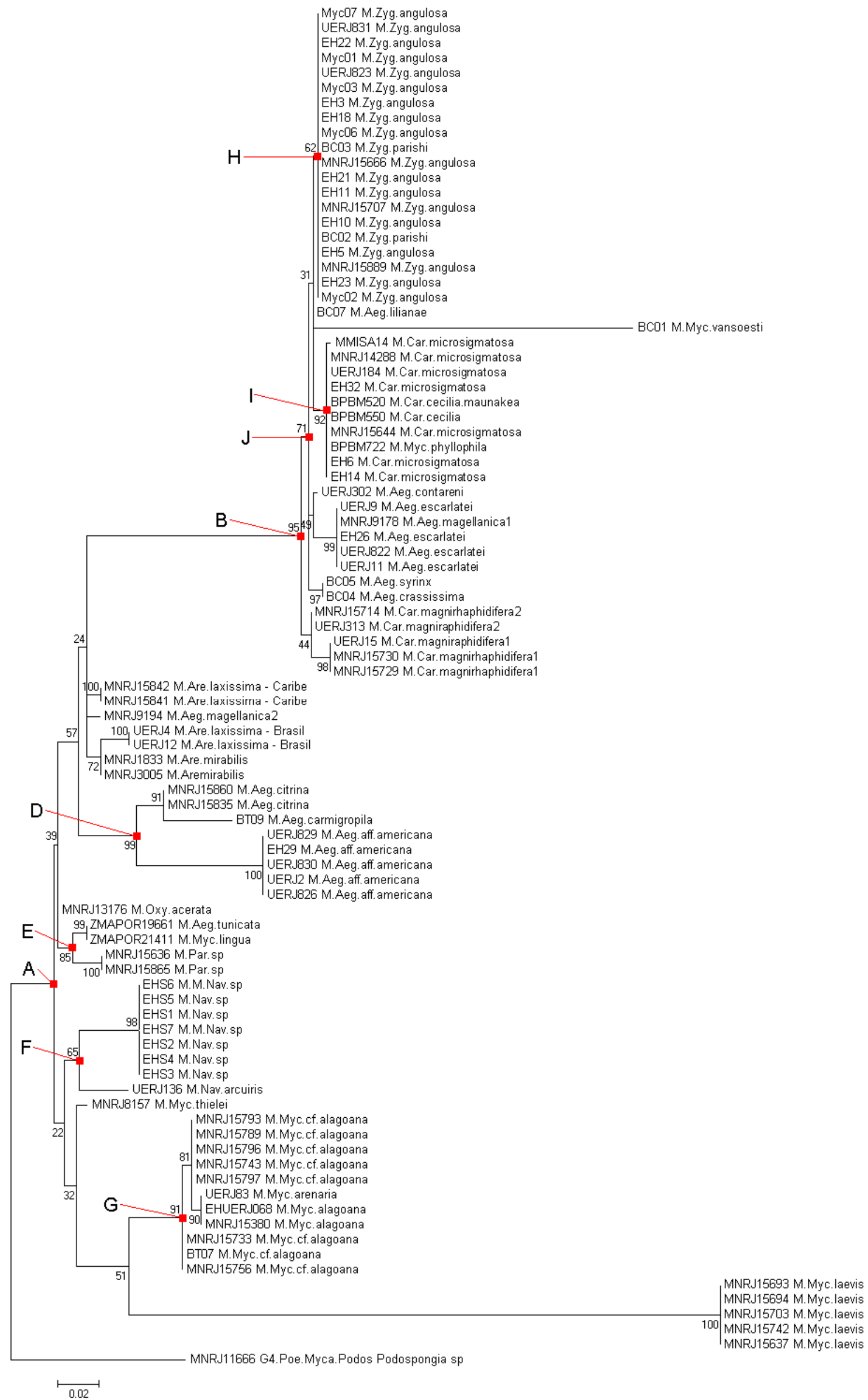


Figura 1.15. Reconstrução filogenética subgenérica de *Mycale* Gray, 1867, utilizando o marcador 16S (16S-sub) pelo método de Máxima Verossimilhança (ML). Os valores de suporte são indicados acima dos ramos. As sequências são listadas por seus números de tombo seguidos da espécie. Os clados de interesse são indicados por letras. Os subgêneros estão abreviados pelas três primeiras letras do nome. Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.

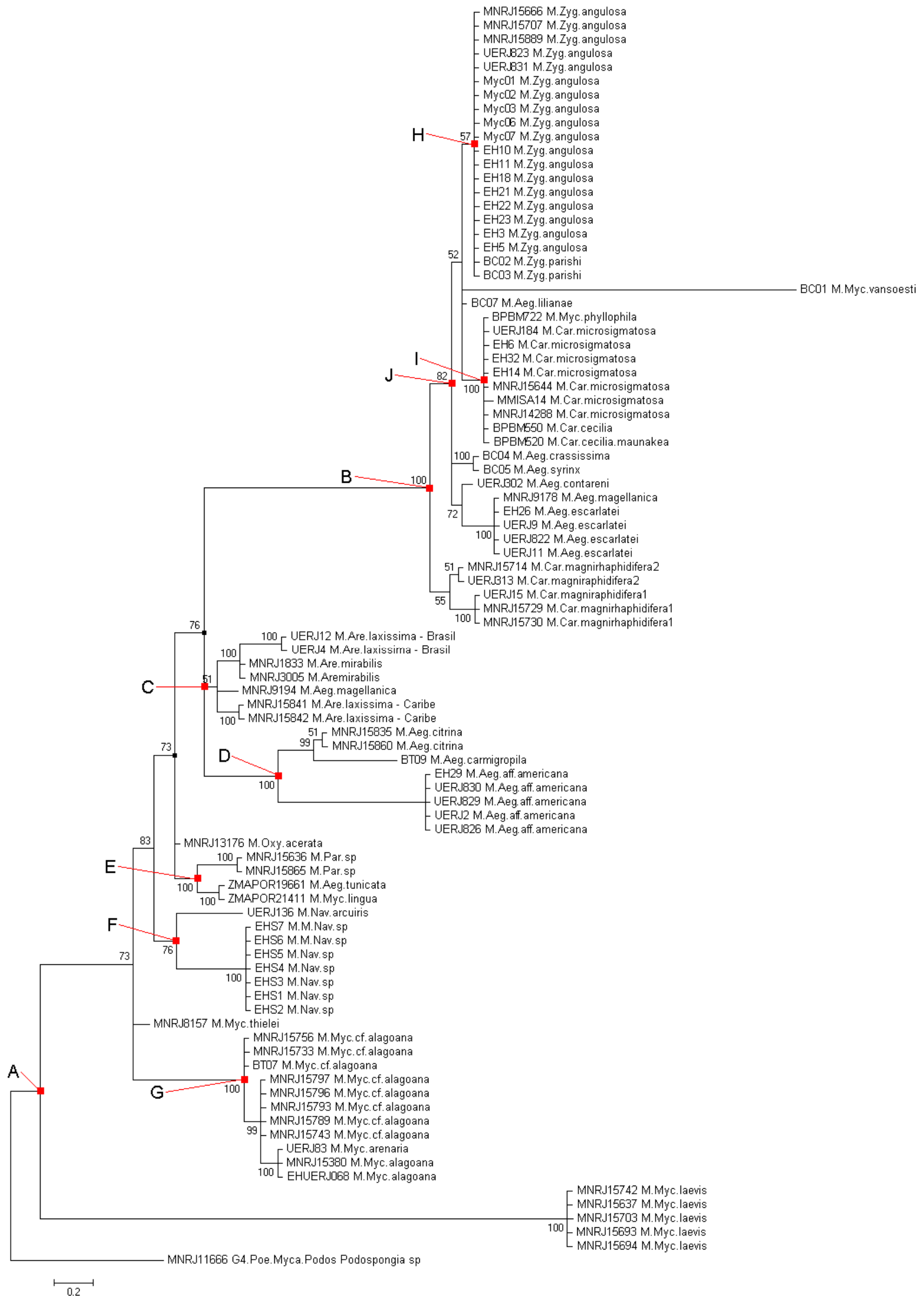


Figura 1.16. Reconstrução filogenética subgenérica de *Mycale* Gray, 1867, utilizando o marcador 16S (16S-sub) pelo método de Inferência Bayesiana (BI). Os valores de suporte são indicados acima dos ramos. As seqüências são listadas por seus números de tombo seguido da espécie. Os cladros de interesse são indicados por letras. Os subgêneros estão abreviados pelas três primeiras letras do nome. Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.

### 1.3.3.2. Reconstruções com o marcador 28S

Da mesma forma que anteriormente, a maioria das sequências de *Mycale* foram recuperadas em um clado monofilético nas reconstruções filogenéticas supra-genéricas realizadas com o marcador 28S (alinhamento 28S-supra; Figuras 1.17 e 1.18). As sequências de *M. (Aeg.) phillipensis*, *M. (Anomomycale) titubans* e *M. fibrexilis* – não analisadas com 16S – são as únicas que não se agrupam com as demais de *Mycale* em um grupo monofilético, sendo que estas se encontram relacionadas a outras poeciloscleridas. Devido ao alto número de politomias e baixos valores de suporte para a maioria dos clados envolvendo sequências de Mycalina, pouco se pode afirmar sobre as relações obtidas com este marcador, à exceção de algumas como a relação de grupo-irmão entre *Isodyctia* e *Podospongia*, entre *Guitarra* (Guitarridae) e *Sigmosceptrella*, e entre *Phlyctaenopora* (Mycalidae) e *Esperiopsis*.

O mesmo se pode dizer em relação às reconstruções filogenéticas subgenéricas realizadas com este marcador (alinhamento 28S-sub; Figuras 1.19 e 1.20), que também apresentam um alto número de politomias e baixos valores de suporte. As poucas relações significativas nestas análises são encontradas entre algumas sequências de uma mesma espécie e em poucos clados em concordância com as análises de 16S, como o clado B, que aqui inclui *M. (Aegogropila) furcata*, *M. (Aeg.) rotalis* e *M. (Aeg.) sulevoidea* ao já apresentado, o clado F, que inclui *M. (Naviculina) flagellifera*, e o clado I, que inclui *M. (C.) fistulifera* e *M. (Aegogropila) adhaerens*.

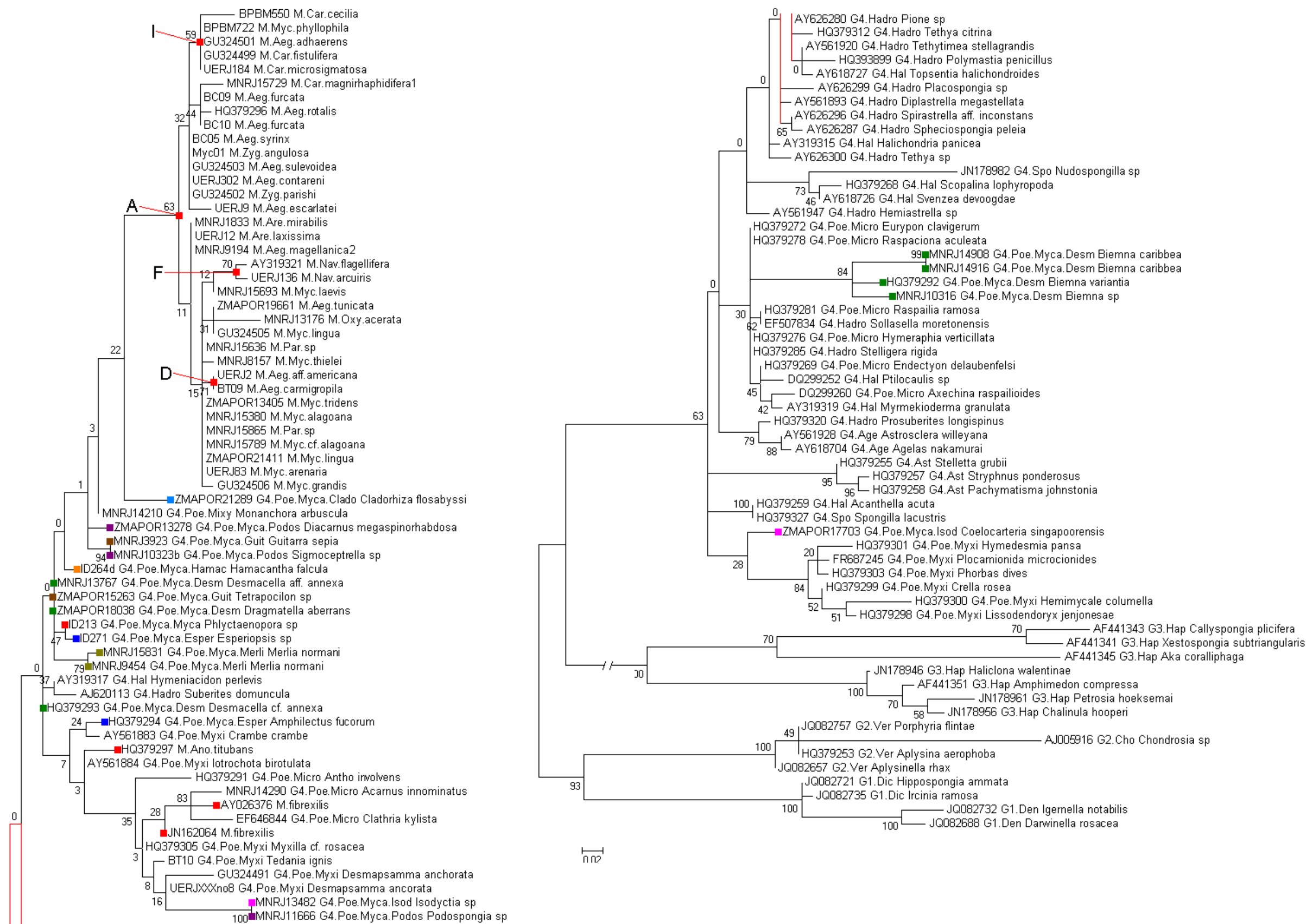


Figura 1.17. Reconstrução filogenética supra-genérica de *Mycale* Gray, 1867, utilizando o marcador 28S (28S-supra) pelo método de Máxima Verossimilhança (ML). Os valores de suporte são indicados acima dos ramos. As sequências são listadas por seus números de tombo, seguidos da classificação sistemática do táxon, abreviada, e espécie. Os clados de *Mycale* de interesse são indicados por letras. As cores identificam as famílias de Mycalina: Mycalidae (vermelho), Isodyctiidae (rosa), Podospungiidae (roxo), Desmacellidae (verde), Merliidae (amarelo), Esperipsidae (azul), Hamachantidae (laranja), Guitarridae (marrom). Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.



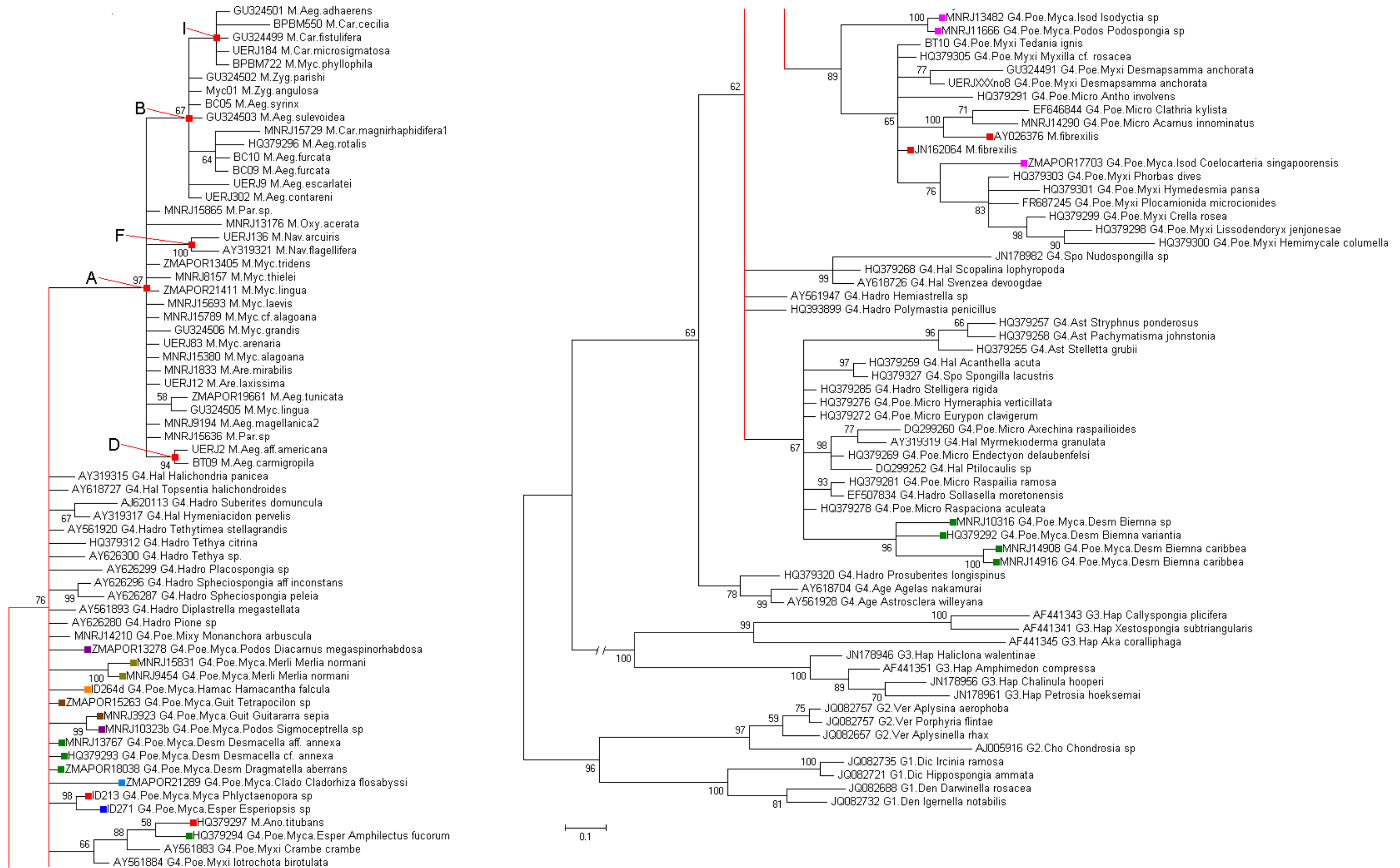


Figura 1.18. Reconstrução filogenética supra-genérica de *Mycale* Gray, 1867, utilizando o marcador 28S (28S-supra) pelo método de Inferência Bayesiana (BI). Os valores de suporte são indicados acima dos ramos. As sequências são listadas por seus números de tombo, seguidos da classificação sistemática do táxon, abreviada, e espécie. Os clados de *Mycale* de interesse são indicados por letras. As cores identificam as famílias de Mycalina: Mycalidae (vermelho), Isodactylidae (rosa), Podospingiidae (roxo), Desmacellidae (verde), Merliidae (amarelo), Esperipsidae (azul), Hamachantidae (laranja), Guitariidae (marrom). Ver texto e Apêndice A para mais

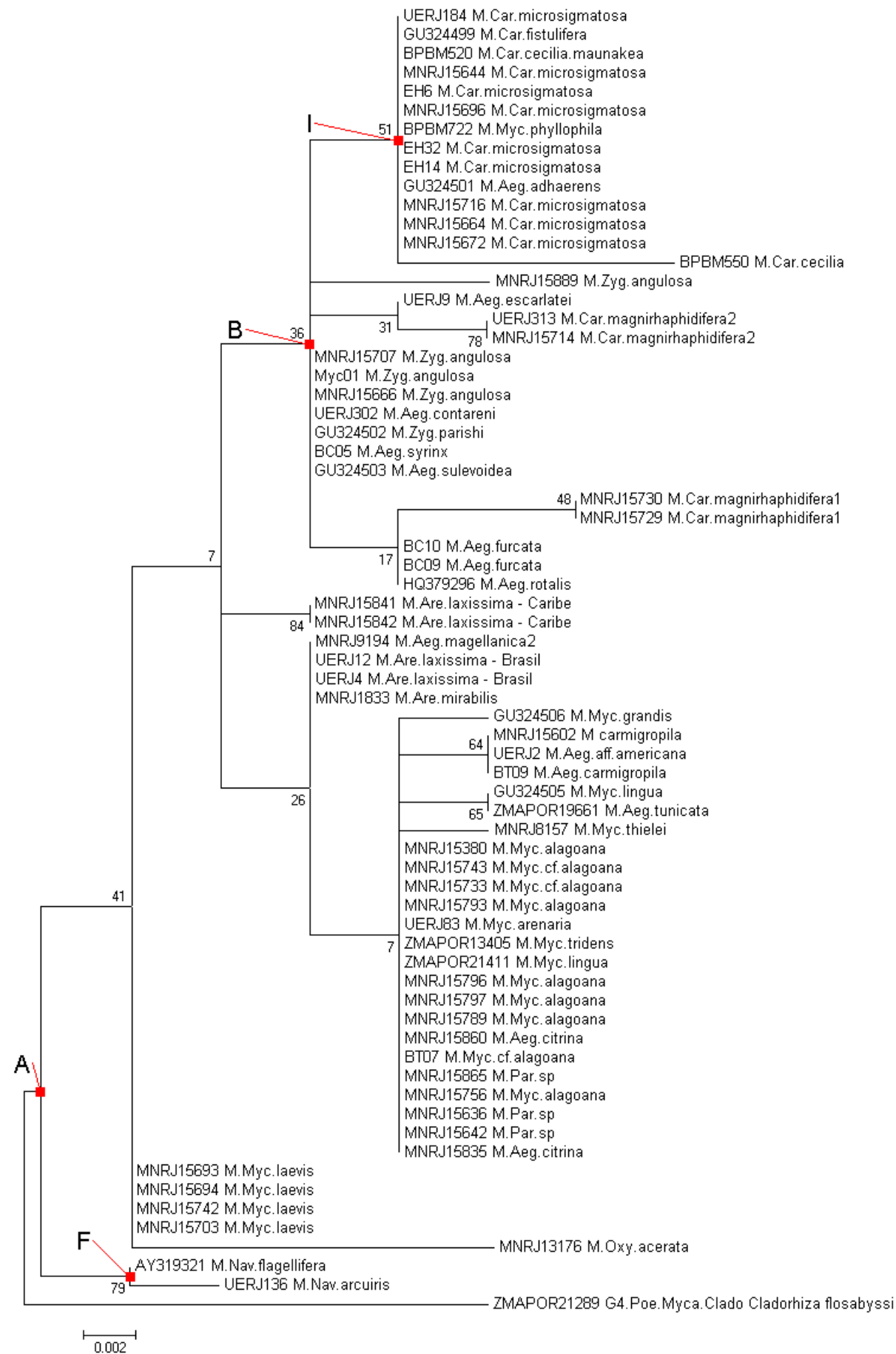


Figura 1.19. Reconstrução filogenética subgenérica de *Mycale* Gray, 1867, utilizando o marcador 28S (28S-sub) pelo método de Máxima Verossimilhança (ML). Os valores de suporte são indicados acima dos ramos. As sequências são listadas por seus números de tombo seguidos da espécie. Os clados de interesse são indicados por letras. Os subgêneros estão abreviados pelas três primeiras letras do nome. Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.





Figura 1.20. Reconstrução filogenética subgenérica de *Mycale* Gray, 1867, utilizando o marcador 28S (28S-sub) pelo método de Inferência Bayesiana (BI). Os valores de suporte são indicados acima dos ramos. As sequências estão listadas por seus números de tombo seguidos da espécie. Os clados de interesse são indicados por letras. Os subgêneros estão abreviados pelas três primeiras letras do nome. Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.

### 1.3.3.3. Reconstruções com o marcador *cox1*

Ao contrário do encontrado com os marcadores anteriores, com *cox1* é possível observar que uma menor proporção das sequências de *Mycale* foram recuperadas em um clado monofilético (clado A) (Figuras 1.21 e 1.22). Três espécies se encontram divergentes das demais, mais proximamente relacionadas a sequências de Myxillina: *M. (M.) laevis*, *M. (Z.) angulosa* e *M. fibrexilis*, sendo que, as duas primeiras, apresentaram ramos terminais extremamente longos. Apesar do limitado número de sequências, algumas relações, com alto suporte dentro do clado monofilético de *Mycale*, podem ser observadas, como a recuperação do supracitado clado G, e uma relação de proximidade entre as sequências de *M. (Aeg.) americana*, *M. (Are.) laxissima* e *M. (Are.) mirabilis*. Pouco se pode dizer das relações supra-genérica de *Mycale* com as demais Mycalina, sobretudo devido aos baixos valores de suporte dos ramos mais internos da topologia. Alguns clados bem suportados recuperam uma relação de irmandade entre os podospongiídeos *Sigmosceptrela* e *Negombata*, mas relativamente distantes de *Podospongia*. Outro clado bem suportado é aquele que agrupa os desmacelídeos *Biemna*, *Neofibularia* e *Sigmaxinella*, os quais se mostram bem distantes de *Desmacella*, muito embora *Biemna* aparente não ser monofilético.



Figura 1.21. Reconstrução filogenética de *Mycale* Gray, 1867, utilizando o marcador *cox1* pelo método de Máxima Verossimilhança (ML). Os valores de suporte estão indicados acima dos ramos. As sequências estão listadas por seus números de tombo, seguidos da classificação sistemática do táxon, abreviada, e espécie. Os clados de *Mycale* de interesse estão indicados por letras. As cores identificam as famílias de Mycalina: Mycalidae (vermelho), Podospongiidae (roxo), Desmaccellidae (verde). Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.

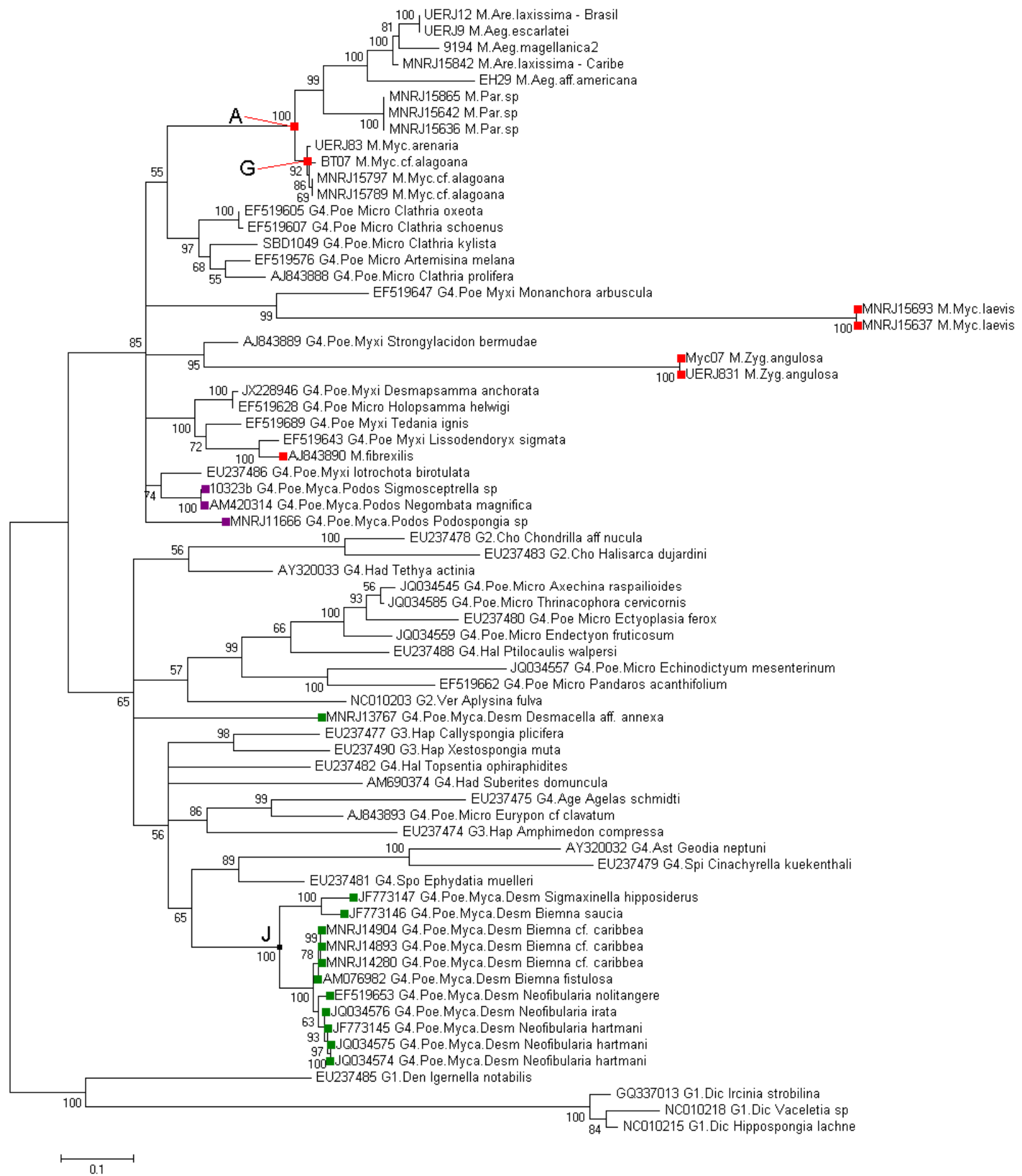


Figura 1.22. Reconstrução filogenética de *Mycale* Gray, 1867, utilizando o marcador *cox1* pelo método de Inferência Bayesiana (BI). Os valores de suporte estão indicados acima dos ramos. As sequências estão listadas por seus números de tombo, seguidos da classificação sistemática do táxon, abreviada, e espécie. Os clados de *Mycale* de interesse estão indicados por letras. As cores identificam as famílias de Mycalina: Mycalidae (vermelho), Podospongiidae (roxo), Desmacellidae (verde). Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.

#### 1.3.3.4. Reconstruções com os dados combinados de 16S e 28S

Por fim, nas reconstruções obtidas com os dados combinados de 16S e 28S em um único alinhamento particionado (Figuras 1.23 e 1.24), podemos observar uma melhor resolução da topologia, onde, para a maioria dos clados, se encontra um suporte maior do que nas análises anteriores. Estas reconstruções recuperam um clado monofilético (A) compreendendo as sequências de *Mycale* utilizadas, com alto suporte. A maioria dos clados internos, já citados anteriormente, também foram recuperados nestas análises, como por exemplo, os clados B, C, D, E, G, H, I e J. A relação de *Mycale* com as demais poeciloscleridas não foi resolvida, mas é possível observar uma relação de irmandade, com alto suporte, entre *Podospongia* e *Isodictya*, mesmo a última apresentando um longo ramo terminal, e relativamente distantes de *Sigmosceptrella* e de *Diacarnus*. Da mesma forma, é recuperado um clado entre *Desmacella* e *Merlia* – também sendo observado um longo ramo terminal na primeira – que se encontram distantes de *Biemna*. Uma outra relação encontrada com alto suporte foi a proximidade de *Esperiopsis* com a hadromerida *Suberites*.

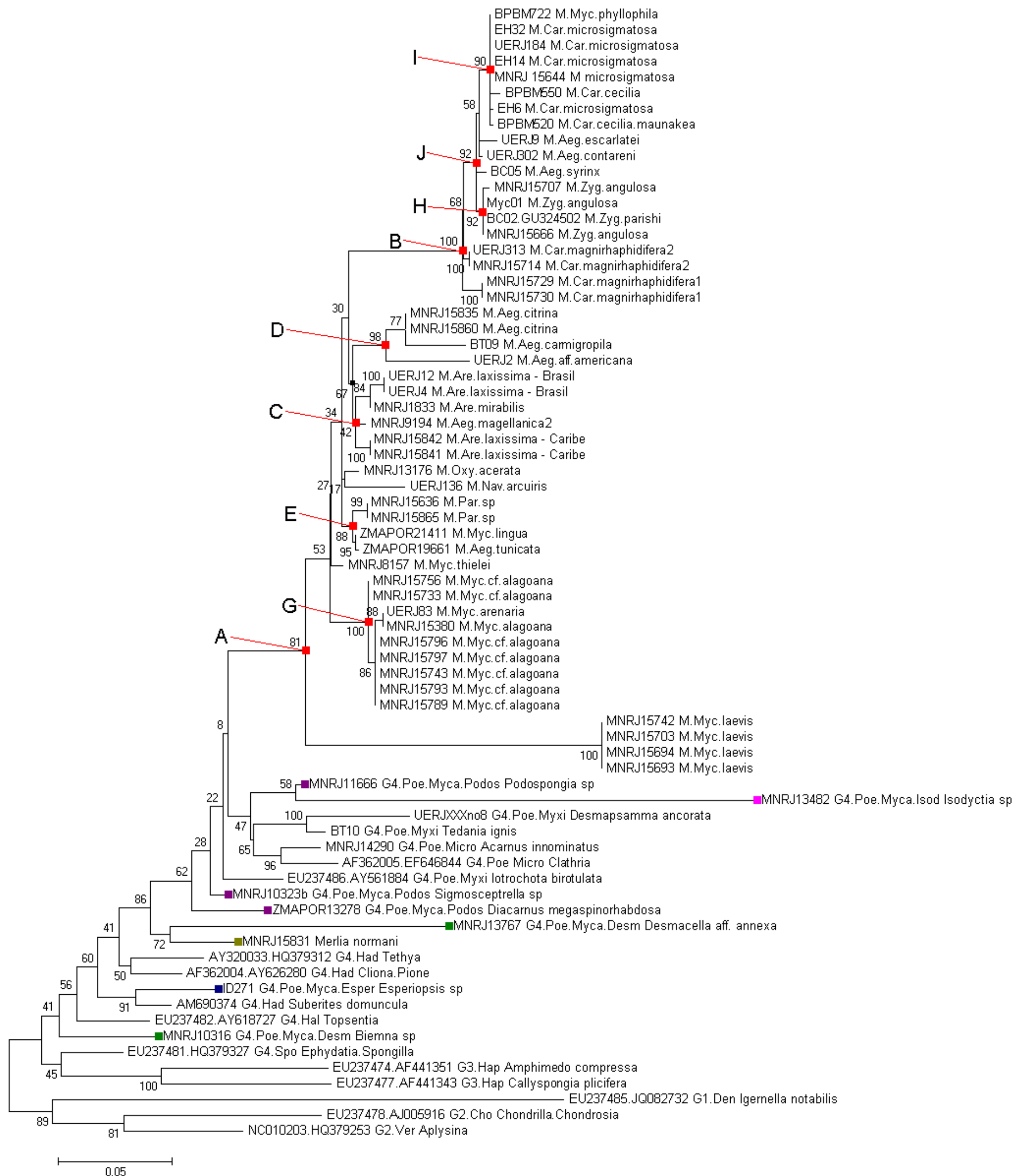


Figura 1.23. Reconstrução filogenética de *Mycale* Gray, 1867, utilizando dados combinados de 16S e 28S pelo método de Máxima Verossimilhança (ML). Os valores de suporte estão indicados acima dos ramos. As sequências estão listadas por seus números de tombo, seguidos da classificação sistemática do táxon, abreviada, e espécie. Os clados de *Mycale* de interesse estão indicados por letras. As cores identificam as famílias de Mycalina: Mycalidae (vermelho), Podospongiidae (roxo), Desmacellidae (verde), Merliidae (amarelo), Esperiopsidae (azul). Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.

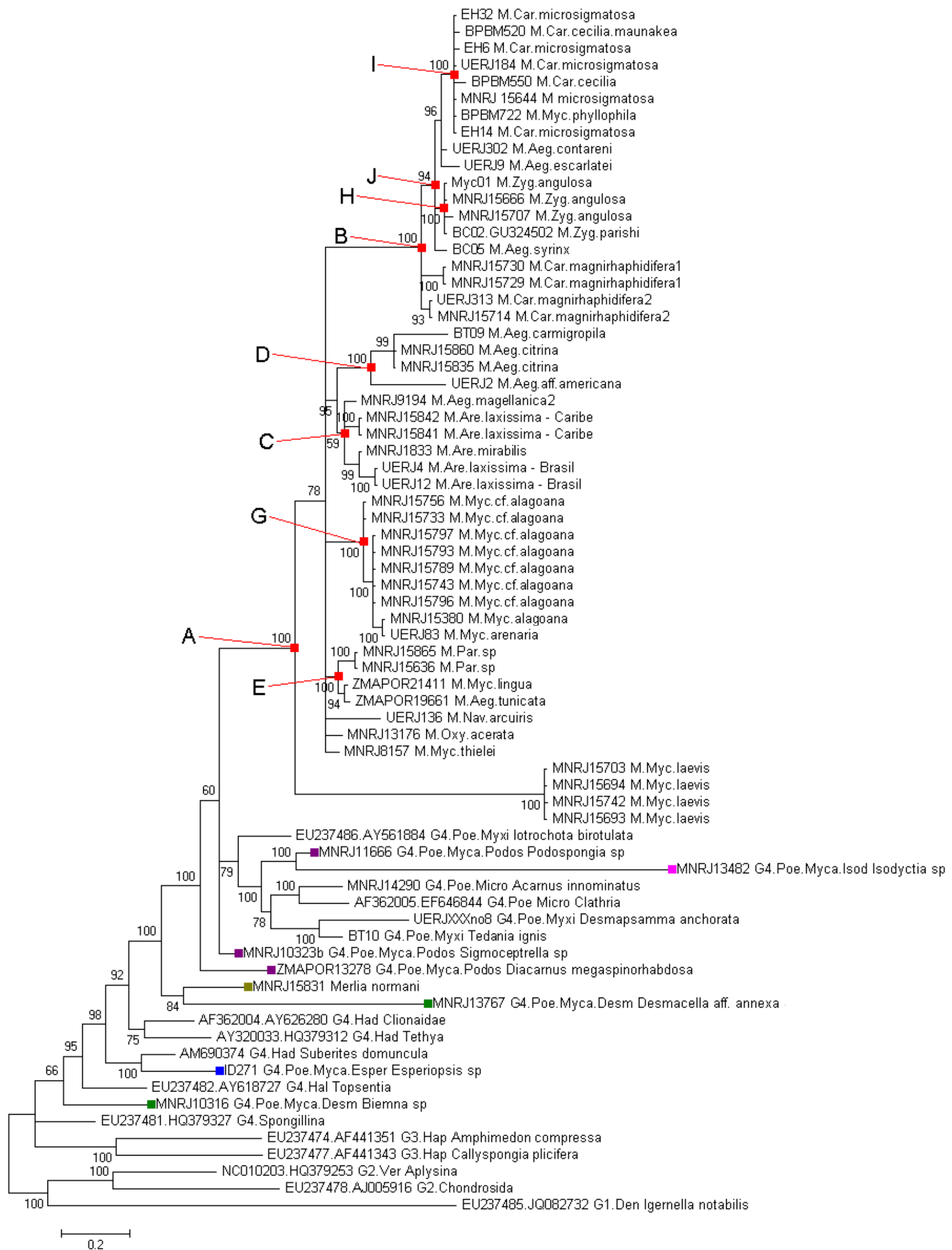


Figura 1.24. Reconstrução filogenética de *Mycale* Gray, 1867, utilizando dados combinados de 16S e 28S pelo método de Inferência Bayesiana (BI). Os valores de suporte estão indicados acima dos ramos. As sequências estão listadas por seus números de tombo, seguidos da classificação sistemática do táxon, abreviada, e espécie. Os clados de *Mycale* de interesse estão indicados por letras. As cores identificam as famílias de Mycalina: Mycalidae (vermelho), Podospongiidae (roxo), Desmacellidae (verde), Merliidae (amarelo), Esperiopsidae (azul). Ver texto e Apêndice A para mais detalhes.

## 1.4. Discussão

### 1.4.1. Adequação dos marcadores moleculares

As inferências filogenéticas realizadas a partir do alinhamento 16S-supra, tanto por meio do método de ML (Figura 1.12) quanto pela BI (Figura 1.13), resultaram em topologias que, em geral, apresentaram baixo suporte ou mesmo politomias nas relações mais profundas, *i.e.*, entre organismos evolutivamente distantes, com ramos internos relativamente curtos e ramos terminais extremamente longos em muitos casos. Isto, conjugado às estimativas de saturação (ver acima), sugere que este marcador não é ideal para a inferência de relações inter-familiares em Poecilosclerida. Por outro lado, o sinal filogenético apresentado pelo marcador 16S se mostrou relativamente mais adequado para a recuperação das relações evolutivas entre sequências de *Mycale* (alinhamento 16S-sup), seja por meio de ML (Figura 1.14) ou BI (Figura 1.15). As topologias resultantes revelam ramos internos mais longos do que os terminais, sugerindo um menor número de homoplasias. E a presença de alguns poucos ramos extremamente longos, espécie-específicos sugere uma particularidade evolutiva destes grupos, a qual é evidenciada por uma maior taxa evolutiva do marcador (ver abaixo).

O gene 16S, até agora, foi pouco explorado para fins filogenéticos em esponjas, sendo difícil avaliar sua adequabilidade, sobretudo comparar os resultados encontrados para este grupo com outros. Os poucos trabalhos neste sentido apresentam diferentes conclusões a respeito da utilidade do 16S como marcador molecular. Heim e colaboradores (2007) argumentam que este marcador é demasiado conservado para distinguir espécies de *Aplysina* (Verongida) em comparação a outros, como ITS e *cox1*. Contrariamente, López-Legentil e colaboradores (2010) encontraram uma variabilidade muito maior em 16S do que *cox1* em *Callyspongia* (Haplosclerida). Já Dohrmann e colaboradores (2008) mostraram que os alinhamentos de 16S apresentaram menor resolução do que 18S e dados combinados, e sugeriram que um menor alinhamento e erros de amostragem seriam explicações plausíveis para estas diferenças.

Por sua vez, a adequação do marcador 28S para a inferência evolutiva se mostrou ambígua entre os diferentes grupos de demosponjas (Figuras 1.16 e 1.17). Enquanto que as relações obtidas para os grupos G1, G2 e G3 se mostram relativamente bem suportadas nas análises, as relações entre as sequências de G4 apresentam um suporte insignificante para relações a partir do nível de família, sugerindo uma evolução diferenciada do marcador entre estas demosponjas (G4). A ambiguidade no sinal filogenético no marcador 28S, sobretudo dentre as Poecilosclerida (que de certo modo era previsível, dada sua saturação e baixo



número de sítios informativos), resultou numa (quase) total falta de resolução nas relações evolutivas entre sequências de G4. Similarmente, a reconstrução realizada somente para as sequências de *Mycale*, por meio do alinhamento 28S-sub, resultou em uma grande proporção de politomias dos ramos internos e baixos valores de suporte, tanto por meio do método de ML quanto por BI (Figuras 1.18 e 1.19, respectivamente).

O marcador 28S é talvez o mais utilizado para a inferência de relações evolutivas em Porifera, gerando uma grande base de discussão a respeito de sua utilidade. Contudo, devido ao seu tamanho (em pares de base), é comum o uso de somente um ou poucos seguimentos cujas variabilidades são notavelmente distintas entre grupos (ver Anexo I). A região utilizada neste trabalho compreende cerca de 400 pb entre as regiões divergentes D3 e D5 (D3-D5). Segundo Borchielini e colaboradores (2000) esta região seria mais apropriada para a recuperação de relações entre famílias e ordens, uma vez que seria mais conservada e apresenta menor ambiguidade no alinhamento do que regiões mais variáveis, como D1-D2. Contudo, essa região não se mostrou adequada a recuperar uma filogenia bem resolvida de Poecilosclerida, tendo sido particularmente pouco informativa para *Mycale*. Mas devido à inconsistência na amplificação de outras regiões mais variáveis (ver Apêndice D), são poucas as alternativas de marcadores moleculares para uma reconstrução molecular de *Mycale*.

Já o marcador *cox1* se mostrou bastante problemático para a resolução das relações evolutivas em *Mycale* (Figuras 1.18 e 1.19). Principalmente devido aos longos ramos que algumas espécies apresentaram, como *M. angulosa* e *M. laevis*, denotando uma alta heterogeneidade em sua taxa evolutiva entre as espécies. Comparativamente, este marcador também apresentou o menor número de sequências amplificadas, mesmo com o uso de diversas condições de amplificação e *primers*. As topologias com ramos internos curtos e terminais longos e a alta taxa de substituição levando à saturação, sobretudo na 3ª posição do códon, faz com que, talvez, este marcador seja inapropriado para inferir relações para além de família. O uso deste marcador se torna mais complicado ao considerarmos nosso desconhecimento acerca da evolução do genoma mitocondrial da maioria dos grupos de esponjas, o qual apresenta várias derivações específicas do grupo, que vão desde genes extras, modificações e uso preferencial de código genético, e mesmo derivação em vários cromossomos lineares (e.g., LAVROV *et al.*, 2008; LAVROV *et al.*, 2013). Contudo, Lavrov e colaboradores (2008), ao comparar o desempenho individual dos genes mitocondriais em relação aos dados combinados destes, encontraram que o marcador *cox1* foi um dos que menos divergiram, sendo citocromo b (*cyb*) o mais conservado, sugerindo que este poderia,

até certo ponto, servir como marcador filogenético em situações onde casos particulares na evolução deste gene não ocorram.

Por fim, as reconstruções com os dados combinados de 16S e 28S se mostraram bastante robustas (Figuras 1.20 e 1.21), mesmo com certas espécies apresentando taxas evolutivas distintas para um ou outro marcador separadamente. A maior parte dos ramos internos apresentaram altos valores, e poucas politomias foram recuperadas. Contudo, ainda é incerto se esta melhora no desempenho se deve simplesmente a um aumento do tamanho do alinhamento e, por conseguinte, um menor efeito da reamostragem, levando a um maior suporte, ou a aumento no número de posições informativas, balanceando a ambiguidade (homoplasias) entre os dois marcadores. As abordagens multi-loci têm mostrado que a história genealógica de um único marcador quase sempre não reflete a história completa dos organismos estudados (BROWER *et al.*, 1996; NICHOLS, 2001). Essa abordagem geralmente produz resultados mais robustos e confiáveis, sendo, desta forma, preferível em relação a uma abordagem reducionista (*e.g.*, ERPENBECK *et al.*, 2006; DOHRMANN *et al.*, 2008). Desta forma, devido à dificuldade em se obter bons marcadores moleculares para o grupo – seja devido à inconsistência nas amplificações, contaminações, ambiguidade ou falta de sinal filogenético, ou mesmo taxas evolutivas divergentes (ver abaixo) – uma solução possível, ainda a ser testada, poderia advir do uso de um número maior de regiões curtas (~400 pb). Isto facilitaria a amplificação de amostras mal conservadas (como amostras de museus) – uma vez que o DNA degradado limita o tamanho do fragmento gerado por PCR, e ao mesmo tempo permitiria o rastreamento de diversas regiões evolutivas distintas.

#### 1.4.2. Taxas evolutivas e espécies crípticas

Como ressaltado anteriormente, as espécies *M. (M.) vansoesti sensu* Calcinai e colaboradores (2006), *M. (M.) laevis*, *M.(Z.) angulosa* e *M.(Aeg.) phillipensis* apresentaram um comprimento de ramo muito maior do que o encontrado para a maioria das demais espécies de *Mycale*, particularmente em relação aos marcadores moleculares de origem mitocondrial (16S e/ou *cox1*). O posicionamento filogenético de *M. (M.) vansoesti sensu* Calcinai e colaboradores (2006) não parece ter sofrido grande influência deste tamanho de ramo aumentado. Todavia a amplificação de outros marcadores desta espécie não foi possível, e sem uma topologia comparativa com base em outros genes, esta influência de uma taxa evolutiva maior não pode ser propriamente avaliada. Por exemplo, como no caso de *M. (M.) laevis* e *M. (Z.) angulosa*, as quais estiveram presentes em todas as reconstruções. Nestas é

possível observar que a posição destas espécies variou de marcador para marcador, especialmente nas reconstruções com *cox1*. Enquanto que a posição filogenética de *M. (Z.) angulosa* se mostrou congruente nas topologias de 16S e 28S, nas topologias de *cox*, esta espécie foi recuperada numa relação externa às demais *Mycale*. Similarmente, nas reconstruções de *cox1*, *M. (M.) laevis* também foi recuperada externamente à *Mycale*, mas mesmo entre os marcadores 16S e 28S, sua posição filogenética se mostrou variável, podendo estar na base de *Mycale* ou relacionada à outras espécies do gênero, respectivamente. A situação de *M. (Aeg.) phillipensis* é ainda mais drástica, pois sua posição filogenética é completamente externa em relação à *Mycale*. Porém esta espécie também só pode ser amplificada com um marcador molecular, e na ausência de dados comparativos de outros genes, não é possível avaliar o quanto seu posicionamento nas árvores de 16S se deve a um artefato promovido pela alta taxa evolutiva deste marcador.

Essa diversidade nas taxas evolutivas entre marcadores e espécies diferentes resultou em uma falta de resolução filogenética para grande parte das espécies de *Mycale* devido à incongruência entre as reconstruções com cada marcador. Em alguns casos, como para *M. (Z.) angulosa*, esta divergência nas taxas evolutivas pôde ser melhor avaliada, e, neste exemplo, seu posicionamento em *cox1* foi interpretado claramente como um artefato. Surpreendentemente, o marcador nuclear 28S se mostrou extremamente conservado entre as espécies de *Mycale* (com menos do que 0.05% de sítios informativos), sugerindo que as taxas evolutivas dos outros marcadores podem ser um produto secundário de uma derivação particular da evolução do DNA mitocondrial (DNAMt) destas espécies. Resultados preliminares da tentativa de sequenciamento do DNAMt de espécies de *Mycale* (D. Lavrov Universidade Estadual de Iowa, EUA, em colaboração com o nosso grupo, pers. comm.) sugerem uma grande divergência nas sequências mitocondriais destas, onde protocolos estabelecidos acabam por produzir resultados inconsistentes equivalentes a problemas relatados para o sequenciamento de DNAMt de espécies com alto grau de derivação, como as esponjas calcáreas (LAVROV *et al.*, 2013). De todo modo, as divergentes taxas evolutivas encontradas em *Mycale* evidenciam que a obtenção de uma filogenia compreensiva deste grupo somente será possível a partir de uma abordagem multi-loci. Adicionalmente, estas divergências apontam em direção a particularidades na evolução molecular destas espécies que requerem atenção por si só, o que poderia revelar maiores informações a respeito de processos e eventos evolutivos das esponjas, ou mesmo dos metazoários.

Ainda, nas reconstruções filogenéticas obtidas, foram observadas divergências genéticas entre amostras postuladamente de uma mesma espécie que sugerem a existência de espécies crípticas. Três espécies se encontram nesta situação: *M. (C.) magnirhaphidifera*, *M. (Aeg.) magellanica* e *M. (Are.) laxissima*.

A primeira destas, *M. (C.) magnirhaphidifera*, se dividiu em dois clados distintos: o primeiro (*magnirhaphidifera*1) compreendendo amostras de Bocas del Toro (Panamá) e São Sebastião (Brasil), com ausência de microscleras do tipo sigmas, e o segundo (*magnirhaphidifera*2) de Bocas del Toro e Twin Cays (Belize), com abundância de sigmas. Hajdu e Rützler (1998) ressaltaram que, ao contrário das amostras de *M. (C.) magnirhaphidifera* de Curaçao descritas por van Soest (1984), as amostras de Belize apresentavam abundância de sigmas. Este caráter poderia servir como critério para a separação das populações de Belize (portadoras de sigmas) em uma espécie diferente, caso novos dados corroborassem essa opção. Carballo e Hajdu (2001) insistiram em que a presença de sigmas em *M. (C.) magnirhaphidifera* seria uma característica variável, observada entre espécimes e populações que concordam integralmente quanto ao hábito e morfologia das espículas. Os resultados moleculares tanto de 16S e 28S, apresentados neste trabalho, apontam em outra direção, e sugerem que a possibilidade levantada por Hajdu e Rützler (1998) de que *M. (C.) magnirhaphidifera* compreende ao menos duas espécies crípticas, seja a opção correta. Todavia, um aumento do número de amostras e populações desta espécie analisadas por meios moleculares seria imprescindível para uma melhor delimitação desta variabilidade, que poderá então determinar a pertinência de se propor um novo nome para o material provido de sigmas.

Outra espécie que também se mostrou polifilética nas análises moleculares foi *M. (Aeg.) magellanica*, para a qual as duas amostras analisadas foram recuperadas em posições distintas. Uma (*magellanica*1) foi agrupada com amostras de *M. (Aeg.) escalatei*, e outra (*magellanica*2) com espécies de *Arenochalina*. Contudo, não foi possível obter ampliações de 16S para uma das amostras, e sua posição é suportada apenas pelos dados de 28S. Esta espécie apresenta uma enorme variação morfológica (BURTON, 1934), sobretudo em relação às microscleras. As duas amostras analisadas divergem em relação à presença de ráfides e anisoquelas, sendo que a que foi agrupada com *M. (Aeg.) escalatei* possui ráfides mas as anisoquelas são raras, e a que agrupa em *Arenochalina* possui anisoquelas abundantes mas as ráfides são raras. Deste modo, sem uma revisão apropriada desta variabilidade – o que requererá um aumento do número de amostragem com maior distribuição geográfica – não é

surpreendente que estas amostras tenham se mostrado divergentes nas reconstruções moleculares. O que é surpreendente, é que esta divergência abrange uma separação em subgêneros distintos, implicando que qualquer revisão desta espécie necessita, primeiramente, resolver questões mais profundas na delimitação entre estes grupos.

Por fim, *M. (Are.) laxissima*, se mostrou dividida em dois grupos com uma alta coesão geográfica, onde um dos clados (*laxissima* Caribe) abriga amostras de Bocas del Toro (Panamá), e o outro (*laxissima* Brasil) compreende amostras de São Sebastião (Brasil). Ainda, os dois clados derivados aparecem em posições diferentes dentro do clado de *Arenochalina*, onde o clado com amostras do Brasil está mais relacionado com *M. (Are.) mirabilis* do que com o primeiro. Hajdu e colaboradores (2011) reportam que uma forma azul incrustante de *M. (Are.) laxissima*, similar à *M. (Are.) mirabilis*, tem se tornado mais evidente na costa da Bahia. Os autores reforçam ainda a idéia da necessidade de uma revisão desta espécie, um vez que as espécies do Brasil não apresentam uma forma tubular tipicamente encontrada nos espécimes do Caribe. À primeira vista, esta separação entre espécies do Caribe e Brasil sugere que o nome *Esperella nuda* (RIDELY e DENDY, 1886), atualmente na lista de sinônimos de *M. (Are.) laxissima*, e cuja localidade-tipo é a Bahia, poderia ser reintegrado. Contudo, a lista de sinonímia de *M. (Are.) laxissima* inclui muitos outros nomes (*e.g.*, *hyatti*, *mucifluens*, *jamaicensis*, *whitfieldi*, etc.), e uma amostragem satisfatória para a revisão desta espécie deveria, além de incluir a localidade-tipo destes nomes, cobrir um maior perímetro da costa brasileira. Além disso, nenhum dado da morfologia das amostras de *M. laxissima* do Brasil utilizadas nas análises moleculares – cujas extrações de DNA foram realizadas por colaboradores – foi registrado e novas amostras devem ser analisadas a fim de ressaltar as diferenças entre estes grupos.

#### 1.4.3. Relações filogenéticas de Mycalina

Nenhuma das topologias obtidas recuperou a monofilia *stricto sensu* de Poecilosclerida ou de suas subordens. Dentre estas, Mycalina foi o grupo mais variável em termo das relações de seus integrantes. A maior parte das famílias desta subordem (que apresentaram mais de dois gêneros representados) mostrou ser polifilética, incluindo a polifilia de alguns gêneros. As topologias reconstruídas a partir dos dados combinados de 16S e 28S (Figuras 1.23 e 1.24) recuperaram as sequências de Mycalina distribuídas em sete clados distintos – *Mycale*, *Podospongia+Isodyctia*, *Sigmosceptrella*, *Diacarnus*,

*Desmacella+Merlia*, *Esperiopsis*, e *Biemna*, sendo os dois últimos não relacionados às demais Poeciloscleridas – os quais serão discutidos abaixo.

O clado correspondente à *Mycale* apresentou alto suporte, e a única relação de proximidade deste gênero com outra Mycalina se deu na reconstrução baseada no marcador 28S, na qual foi recuperada uma relação de parentesco entre *Mycale* e *Cladorhiza*, mas com baixo suporte. Vargas e colaboradores (2012), em sua reconstrução filogenética obtida a partir de 28S e *cox1*, também recuperaram esta mesma relação, mas com alto suporte dos dados, com a inclusão de outros gêneros de Cladorhizidae. O baixo suporte das relações do presente trabalho não implica em uma refutação dos resultados de Vargas e colaboradores (2012), mas provavelmente decorre da inadequação do marcador utilizado e do baixo número de OTUs de Cladorhizidae utilizadas.

O clado formado por *Podospongia* + *Isodictya* também apresentou alto suporte nas análises de dados combinados. Contudo, esta relação não foi obtida a partir das sequências de 16S; Isto poderia ter se dado por conta do ramo extremamente longo apresentado por *Isodictya*. Esta, por sua vez, apresentou uma relação de parentesco com *Ulosa* com alto suporte para os dados de 16S, porém ambas com longos ramos. Se esta relação se deve ou não à uma atração de ramos longos, mesmo que empregando métodos postuladamente menos tendenciosos a este artefato (BERGSTEN, 2005; KOLACZKOWSKI e THORNTON, 2009), é algo em aberto. Redmond e colaboradores (*in press*) reportam uma relação de parentesco entre *Isodictya* e *Amphilectus* a partir de dados de 18S. Contudo, os dados aqui apresentados de 28S sugerem que *Amphilectus* esteja relacionado à *Crambe*, relação esta que não é suportada por Redmond e colaboradores (*in press*). Como a relação de *Amphilectus* e *Crambe* encontrada aqui se mostrou com baixo suporte, a relação apresentada pelos outros autores seria mais provável. Dando mais suporte a este argumento, a topologia recuperada por Morrow e colaboradores (2012) retrata *Amphilectus* na mesma posição filogenética encontrada por Redmond e colaboradores (*in press*). Assim, há certa evidência que suporte um clado compreendendo *Isodictya*, *Amphilectus*, *Ulosa* e *Podospongia*, muito embora, a relação entre estes gêneros seja duvidosa.

O clado correspondente à *Sigmosceptrella*, nas topologias dos dados combinados de 16S e 28S, se mostrou um dos mais basais de Poecilosclerida. Os dados de 28S sustentam uma relação de parentesco entre *Sigmosceptrella* e *Guitarra* – a qual não esteve representada nas análises de dados combinados. Por sua vez, os dados de 16S evidenciam uma relação de parentesco, com alto suporte, entre *Sigmosceptrella* e *Negombata*. Os resultados apresentados

por Redmond e colaboradores (*in press*) sustentam um clado formado por *Negombata* e *Neopodospongia*, o qual estaria relacionado à *Diacarnus*. Contudo, os dados combinados de 16S e 28S aqui apresentados consideram *Diacarnus* mais basal que *Sigmosceptrella* e as demais Poecilosclerida, o que vem de encontro ao apresentado por Redmond e colaboradores (*in press*). Devido ao maior suporte dos dados destes autores, a relação apresentada por eles poderia ser vista como mais verossímil. Contudo, os resultados apresentados aqui, apesar do menor suporte, originam-se da utilização de dois marcadores nas reconstruções filogenéticas, o que poderia creditar a estes maior confiabilidade. Desta forma, indiretamente, os resultados aqui apresentados sustentariam uma relação de parentesco entre *Diacarnus* e *Sigmosceptrella*, com a última relacionada à *Guitarra*, e neste clado seria também incluído um outro formado por *Negombata* e *Neopodospongia*. Nas reconstruções de Redmond e colaboradores (*in press*), há um forte suporte para uma relação de parentesco deste clado com o discutido no parágrafo anterior. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho suportam uma relação diferente para o clado composto por *Isodictya* e *Podospongia*, o qual seria mais derivado do que o anterior, estando mais relacionado com as demais poeciloscleridas. Devido à grande discrepância entre os resultados e à ausência de outros trabalhos que possam vir a ser utilizados para corroborar ou refutar estas duas hipóteses conflitantes, conclui-se que ambas são equiprováveis até que novos resultados sejam publicados.

O clado formado por *Desmacella* e *Merlia* se mostrou bem suportado pelas análises, à exceção daquela com o 28S. Uma ressalva importante a se fazer é que os resultados de 28S precisariam ser re-analizados, incluindo apenas sequências de organismos mais proximamente relacionados – o que diminuiria tanto o número de posições perdidas por alinhamento divergente quanto a saturação de substituição, aumentando, assim, o sinal filogenético. Contudo, os dados de 28S – com base, sobretudo (mas não unicamente), em análises por meio dos métodos de NJ e MP (dados não mostrados) – apresenta um grau de suporte considerável para o agrupamento destes gêneros, que incluiriam ainda outros tais como *Hamacantha*, *Esperiopsis*, *Phlyctaenopora*, *Tetrapocillon* e *Dragmatella*. O agrupamento entre *Desmacella* e *Merlia* também é corroborado por dados de 18S obtidos por Redmond e colaboradores (*in press*). Neste trabalho, este clado também é recuperado na porção basal do clado das poeciloscleridas, repetindo a relação reportada por Morrow e colaboradores (2012) – embora neste último, apenas *Desmacella* esteja presente nas análises. Embora o agrupamento de *Desmacella*, *Tetrapocillon* e *Dragmatella* – sendo os dois últimos mais próximos entre si – seja defensável por uma análise mais criteriosa dos dados de 28S (dados não mostrados), a

inclusão de *Esperiopsis* neste clado é mais problemática. Nas reconstruções com dados combinados efetuadas aqui, *Esperiopsis* aparece relacionado com alto suporte à hadromerida *Suberites*, assim como nas reconstruções baseadas no marcador 16S – muito provavelmente devido ao prevaecimento do sinal filogenético de 16S em relação ao de 28S. Mitchell e colaboradores (2011) recuperaram uma relação de parentesco entre *Esperiopsis* e *Crambe* – embora parte das relações obtidas por estes autores tenha sido refutada pela maioria dos demais estudos filogenéticos (e.g., MORROW *et al.*, 2012; REDMOND *et al.*, in press; este trabalho). Sendo assim, devido ao posicionamento inconstante de *Esperiopsis* nas reconstruções, onde este é até excluído de Poecilosclerida, uma visão mais conservadora manteria este gênero próximo de outras Mycalina, o que, neste caso, os resultados apresentados aqui suportariam uma relação de parentesco com *Phlyctaenopora*.

Por sua vez, o clado representado por *Biemna* nas reconstruções de dados combinados aparece externo às demais Poecilosclerida. Nas reconstruções com o marcador 28S, este aparece relacionado a espécies de Tetractinellida, Raspailiidae e outros, uma relação recorrente em resultados publicados na literatura (MITCHELL *et al.* 2011; MORROW *et al.*, 2012; REDMOND *et al.*, in press). Nas reconstruções com base em 16S, *Neofibularia* se inclui neste clado, e naquelas com base em *cox1* inclui-se, além da anterior, *Sigmaxinella*, relação corroborada por Mitchell e colaboradores (2011).

Desta forma, cinco clados de Mycalina podem ser definidos (Figura 1.25), com maior ou menor grau de suporte: o primeiro [Figura 1.25.A; (*Hamacantha*, (*Merlia*, (*Esperiopsis*, *Phlyctaenopora*), (*Desmacella*, (*Tetrapocilon*, *Dragmatella*)))] é o mais basal à Poeciloclerida; o segundo [Figura 1.25.B; (*Diacarnus*, (*Negombata*, *Neopodospongia*), (*Sigmosceptrella*, *Guitarra*))] é mais derivado do que o anterior, porém mais basal que os demais; o terceiro (Figura 1.25.C; (*Isodictya*, *Podospongia*, *Amphilectus*, *Ulosa*))] apresenta uma posição filogenética incerta, e para a qual duas hipóteses explanatórias são possíveis: em uma ele está relacionado ao segundo clado e em outra ele possui relação de parentesco com Myxillina e Microcionina; o quarto (Figura 1.25.D; (*Mycale*, Cladorhizidae))] apresenta uma relação de proximidade com Myxillina e Microcionina; e, por fim, o quinto (Figura 1.25.E; (*Biemna*, *Neofibularia*, *Sigmaxinella*))] não pertence ao clado composto pelas Poecilosclerida, estando relacionado, possivelmente, a Tetractinellida .



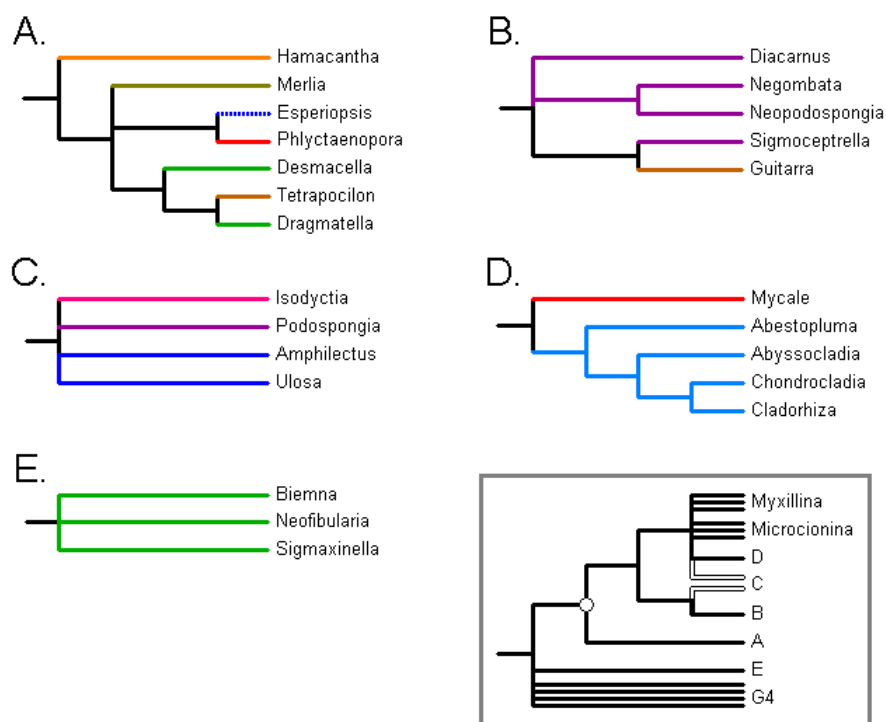


Figura 1.25. Clados de Mycalina deduzidos a partir dos resultados deste trabalho e outros disponíveis na literatura. A composição dos clados (A-E) é discutido no texto. As cores identificam as Famílias de Mycalina: Mycalidae (vermelho), Cladorhizidae (azul claro), Isodyctiidae (rosa), Podospongiidae (roxo), Desmacellidae (verde), Merliidae (amarelo), Esperiopsiidae (azul escuro), Hamachantidae (laranja), Guitarridae (marrom). A caixa em destaque indica as relações filogenéticas entre os clados, sendo que o círculo branco no nó indica o clado correspondente à Poecilosclerida, os ramos múltiplos indicam polifilia, relações insertas e/ou não averiguadas neste trabalho, e os ramos em branco, hipóteses concorrentes.

#### 1.4.4. Relações subgenéricas de *Mycale*

##### 1.4.4.1. Espécies não relacionadas à *Mycale*

A monofilia de *Mycale s.s.* foi refutada pelas reconstruções filogenéticas realizadas neste trabalho. A merofilia do grupo se deveu especialmente à separação das demais *Mycale*, de *M. (Anomomycale) titubans*, *M. fibrexilis* (que inclusive se mostrou polifilética), e *M. (Aegogropila) phillipensis*. *Mycale fibrexilis* teve materiais recuperados em distintas relações de parentesco com outras espécies de Poecilosclerida que não Mycalina. Já, *M. (Aeg.) phillipensis* não apresentou uma relação bem suportada com nenhuma outra Poecilosclerida – provavelmente devido a seu longo ramo. À exceção destas três espécies, todas as demais *Mycale* foram recuperadas em um único clado monofilético, indicando uma grande coesão taxonômica.

A separação de *M. (A.) titubans* de *Mycale* ainda é uma novidade se considerarmos a literatura, mas já foi observada por outros pesquisadores (C. Morrow e N. Boury-Esnault, pers. comm.; REDMOND *et al.*, in press). Esta espécie se distingue morfológicamente de outras *Mycale* pela presença de anisoquelas derivadas chamadas anomoquelas. Estas – se considerarmos a classificação válida atual sob uma perspectiva filogenética – seriam homólogas às anisoquelas tipo I de outras *Mycale*. Em *Mycale* são encontrados outros grupos com tal grau de derivação em suas anisoquelas, como *Naviculina* e *Grapelia*, que apresentam, naviculiquelas e anisoquelas unguiferadas, respectivamente. Porém, estas microscleras seriam consideradas homólogas às anisoquelas palmadas típicas de outros grupos de *Mycale*, enquanto que, por outro lado, a posição filogenética de *Anomomycale* encontrada neste trabalho sugere, que a anomoquela corresponde a uma convergência, mesmo que aproximada, deste tipo de espícula, o que reforça a idéia de uma revisão apropriada da evolução e estrutura das anisoquelas encontradas em *Mycale* (ver Capítulo 2). De todo modo, esta característica poderia ser considerado um suporte morfológico para a separação de *Anomomycale* – o qual deveria então ser elevado à gênero – e sua realocação em um grupo à parte, relacionado a outras poeciloscleridas que não *Mycale* – relação esta ainda a ser propriamente determinada.

*Mycale fibrexilis* é a primeira e mais utilizada espécie de *Mycale* na literatura de sistemática molecular de esponjas, geralmente, como representante de Poecilosclerida (e.g., COLLINS *et al.*, 1998; PETERSON e ADDIS, 2000; BORCHIPELLINI *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 2001; NICHOLS, 2005; KOBER e NICHOLS, 2007). Contudo, o primeiro trabalho a questionar a relação desta espécie com outras *Mycale* foi Erpenbeck e colaboradores (2005), tendo sido o primeiro trabalho a incluir duas espécies de *Mycale* em uma análise filogenética molecular, a qual foi obtida com o marcador 28S. Os autores argumentam que a não formação de um clado entre *M. fibrexilis* – a qual eles assinalam como pertencente à *Carmia sensu* de Laubenfels (1949) – e *M. (N.) flagellifera* seria um reflexo de suas diferenças morfológicas, como arquitetura do esqueleto e formato das anisoquelas, o que, implicitamente, sugere que *Mycale* poderia ser merofilético. Por sua vez, Loh e colaboradores (2012), em sua reconstrução filogenética, encontraram *M. fibrexilis* como a única exceção para a monofilia de *Mycale*. Contudo, os autores não apresentam nenhuma argumentação a respeito. Adicionalmente, a ocorrência de sequências desta espécie em posições diferentes nas reconstruções obtidas evidencia um polifiletismo desta espécie, quando não uma identificação errônea por parte dos pesquisadores. Apesar da reportada abundância da espécie, desde sua publicação (WILSON, 1894), somente De Laubenfels (1949) e Pollock (1998) redescobriram

esta espécie. Mas, aparentemente, estes autores se basearam somente na descrição original e Wilson (1894), sendo assim, necessária ainda uma revisão para que se possa determinar acuradamente seu devido posicionamento sistemático em Poecilosclerida.

A última espécie de *Mycale* não relacionada às demais espécies do gênero, *M. (Aeg.) phillipensis*, até agora não havia sido analisada por meios moleculares, e sua posição filogenética é pela primeira vez reportada. Contudo, a descrição original da espécie (DENDY, 1896) retrata uma esponja tipicamente pertencente à *Mycale*, e dessa forma, não há qualquer critério morfológico para a realocação desta espécie em outro gênero. Além disso, a amostra utilizada foi fornecida e identificada por B. Calcinaï (Universidade Politécnic de Marcas, Itália), e faz parte do material de um trabalho ainda a ser publicado (CALCINAI *et al.*, in press) que redescrever esta espécie para o Indo-Pacífico, sendo esta claramente condizente com a definição de *Mycale*. Sendo assim, uma das possibilidades seria que o posicionamento desta sequência nas reconstruções filogenéticas decorreria de um artefato promovido pelo longo ramo que esta espécie apresentou nas reconstruções filogenéticas. Muito embora outras espécies de *Mycale* que também tenham apresentado ramos longos terminaram por agrupar com outras espécies do gênero, nenhuma apresentou uma taxa evolutiva tão expressiva quanto a apresentada por *M. (Aeg.) phillipensis*, a qual foi quase 2 vezes maior do que a espécie de *Mycale* mais derivada encontrada com o marcador 16S. Por este prisma, é razoável supor que esta espécie tenha se mostrado divergente das demais *Mycale*, mesmo que de fato pertença ao gênero. De todo modo, esta questão será facilmente resolvida por meio da utilização de outros marcadores moleculares que apresentem menores taxas evolutivas nesta espécie. Contudo, há também a possibilidade desta espécie ter convergido morfológicamente de forma a apresentar características encontradas em *Mycale*, tal como, até certo ponto, *Anomomycale* (ver acima). Contudo, ao contrário desta última, *M. (Aeg.) phillipensis* não aparenta apresentar nenhum caráter diagnóstico que a distingua das demais espécies de *Mycale*, e, desta forma, sua separação em uma grupo a parte é questionável.

#### 1.4.4.2. Classificação subgenérica e clados recuperados

Em função dos resultados apresentados acima, o subgênero *Anomomycale* não pertenceria a *Mycale*, e que dos dez subgêneros restantes, somente dois não estiveram representados nas análises: *Grapelia* e *Raphidoteca*. Por outro lado, *Aegogropila* apresentou um número expressivo de espécies representadas (12 spp.). Ainda assim, o número de espécies incluídas nas análises é insatisfatório. Dada a diversidade do gênero, a reconstrução

de uma hipótese filogenética mais realística implicaria na inclusão de mais amostras, sobretudo das espécies-tipo de alguns táxons, de espécies mais divergentes e dos subgêneros não representados. De qualquer forma, a partir das relações recuperadas no agrupamento monofilético das demais *Mycale* – referido em Resultados como clado A – foram encontrados dez clados distintos com alto suporte – clados B - J.

O subgênero *Aegogropila* se mostrou um dos mais problemáticos nas reconstruções recuperadas. Este se mostrou polifilético nas reconstruções, sendo dividido principalmente em dois clados (D e J), e com algumas espécies "perdidas" em outros clados dominados por espécies de outros subgêneros. Das espécies de *Aegogropila* encontradas no clado D, *M. (Aeg.) americana* e *M. (Aeg.) citrina* são consideradas como espécies próximas, sendo que, por sua vez, *M. (Aeg.) carmigropila* – cuja alocação subgenérica apresenta certa ambiguidade – é considerada como mais próxima de outras espécies não pertencentes a este clado (e.g., *M. (C.) magnirhaphidifera*) (HAJDU e RÜTZLER, 1998). As relações recuperadas contradizem a literatura, apresentando *M. (Aeg.) citrina* e *M. (Aeg.) carmigropila* mais relacionadas entre si do que com *M. (Aeg.) americana*, que seria mais basal. Contudo, *M. (Aeg.) carmigropila* está representada por apenas uma única amostra, e outras examinadas neste trabalho falharam em ser amplificadas com os marcadores escolhidos, o que poderia fornecer melhores indícios para esta relação. Por outro lado, o clado J abarca a maior parte das espécies de *Aegogropila* analisadas – *M. (Aeg.) crassissima*, *M. (Aeg.) contarenii*, *M. (Aeg.) escarlatei*, *M. (Aeg.) furcata*, *M. (Aeg.) lilianae*, *M. (Aeg.) rotalis*, *M. (Aeg.) sulevoidea* e *M. (Aeg.) syrinx* – o qual também inclui uma sequência de *M. (Aeg.) magellanica*, cuja situação será discutida na próxima seção. Contudo, neste clado, estas espécies apresentam uma relação parafilética nas interpretações mais conservadoras das relações recuperadas (i.e., suporte dos ramos > 75 % e congruência entre marcadores e métodos de reconstrução). Algumas relações de parentesco entre estas espécies puderam ser recuperadas, como por exemplo, a proximidade entre *M. (Aeg.) crassissima* e *M. (Aeg.) syrinx*, e entre *M. (Aeg.) contarenii* e *M. (Aeg.) escarlatei* (embora com menor suporte), encontrada com o marcador 16S. Hajdu e colaboradores (1995) assinalaram uma proximidade entre *M. (Aeg.) escarlatei* e *M. (Aeg.) sulevoidea*, mas uma vez que a última não esteve representada nas reconstruções com 16S, e devido à inadequação de 28S para recuperar as relações entre *Mycale*, esta relação permanece a ser explorada. Não foi encontrada nenhuma referência em prol da relação entre *M. (Aeg.) crassissima* e *M. (Aeg.) syrinx*, mas as poucas descrições disponíveis das duas espécies revelam diferenças importantes (ver Capítulo 2), o que levanta dúvidas acerca desta relação, a qual poderia

decorrer de artefatos provocados por contaminações e inadequação do marcador. *M. (M.) vansoesti sensu* Calcinai e colaboradores (2006) se mostrou uma adição inesperada a este clado. Os autores, ao descreverem esta espécie – que, segundo estes, apresenta uma combinação peculiar de características – argumentam a respeito de sua similaridade com espécies de *Mycale* de diversos subgêneros. Sendo que sua opção para a alocação desta espécie no subgênero *Mycale*, embora não-explicita, se deve, sobretudo, à proximidade com *M. (C.) cockburniana* Hentschel, 1911 – que os autores assinalam ao subgênero *Mycale* quando na realidade esta está alocada em *Carmia* – e à presença de megascleras difusas na superfície destas esponjas, o que os autores consideraram como um esqueleto ectossomal confuso, típico do subgênero – embora nem a descrição e a imagem de MEV fornecida permitem verificar apropriadamente esta afinidade. Contudo, dada a alta divergência molecular – evidenciada pelo longo ramo que esta espécie apresentou para o marcador 16S – e morfológica – devido à presença de características derivadas não encontradas em outras espécie de *Mycale* como anisoquelas tipo II em forma de sigma, com alas curtas e curvadas para fora – a derivação da estrutura esquelética ectossomal não é um cenário irreal. Desta forma, a organização esqueleto ectossomal em *M. (M.) vansoesti sensu* Calcinai e colaboradores (2006) seria decorrente da perda da reticulação tangencial típica encontrada em *Aegogropila* (ver Capítulo 2). Em suma, sua similaridade com espécies de *Carmia* e *Aegogropila*, seu posicionamento no clado J – que inclui espécies destes subgêneros (ver abaixo) – e sua alta divergência molecular e morfológica, seriam evidências que suportam a remoção desta espécie do subgênero *Mycale*. Se esta espécie deveria ser alocada em *Aegogropila*, *Carmia* ou um novo subgênero à parte, é algo a ser determinado após uma revisão mais criteriosa de espécies semelhantes (mas ver Capítulo 2).

O subgênero *Arenochalina* foi recuperado como monofilético nas reconstruções realizadas (clado C), muito embora este tenha sido representado por somente duas espécies (mas ver próxima seção). Contudo, em se tratando de um subgênero com um número relativamente baixo de espécies (14 spp.), a inclusão de outras mais permitiria cobrir uma grande parcela da diversidade deste grupo, e verificar se os resultados encontrados neste trabalho condizem com a realidade. As topologias de dados combinados de 16S e 28S parecem suportar uma relação de parentesco entre este grupo e um dos clados de *Aegogropila* (clado D). Como argumentado acima, por motivos conservadores, esta relação de proximidade entre os dois clados é desconsiderada no restante deste trabalho, muito embora,

análises posteriores revelaram que há certa congruência morfológica entre os dois grupos, o que poderia servir como um suporte para esta relação (ver Capítulo 2).

Por sua vez, o subgênero *Carmia* foi recuperado dividido em dois grupos: o primeiro compreendendo somente sequências de *M. (C.) magnirhaphidifera* (ver também próxima seção), enquanto que o segundo grupo (representado pelo clado I) inclui sequências das espécies *M. (C.) microsigmatosa*, *M. (C.) cecilia* e *M. (C.) fistulifera*, além de outras espécies não pertencentes à *Carmia*, como *M. (M.) phyllophila* e *M. (Aeg.) adhaerens*. Entre os dois grupos há consistentes diferenças morfológicas, sobretudo na composição espicular, embora não haja referência a trabalhos que expressem diretamente uma separação de *Carmia* com base nestas características (ver Capítulo 2). A composição do clado I, à exceção de *M. (Aeg.) adhaerens* (ver abaixo), é suportada pela literatura, uma vez que estas espécies compartilham uma série de características morfológicas (ver Capítulo 2). Van Soest (1982) considera *M. (M.) phyllophila* como parte de um complexo de espécies de *Mycale* que se caracterizam pela presença de uma única categoria de tamanho de anisoquelas e sigmas, que incluiria *M. (C.) microsigmatosa*, *M. (C.) senegalensis* Levi, 1952 e *M. (C.) sanguinea* Tusurnamal, 1969. Bergquist e Fromont (1988), em sua descrição de *M. (C.) hentscheli* (como *Carmia h.*) consideraram que esta era próxima de *M. (M.) phyllophila*, sobretudo por sua composição espicular. Os resultados aqui apresentados fornecem ainda mais suporte para esta proximidade entre *M. (M.) phyllophila* e espécies de *Carmia*. As descrições disponíveis desta espécie não reportam características que permitam uma alocação indubitável desta em *M. (Mycale)*. E uma vez que esta alocação é refutada pelos argumentos apresentados acima, *M. (M.) phyllophila* estaria melhor alocada em *Carmia*, embora uma revisão do material tipo seja necessária para uma tomada final de decisão. Por outro lado, nenhum outro trabalho expressa semelhanças entre *M. (Aeg.) adhaerens* e espécies de *Carmia* deste grupo, cujas diferenças morfológicas são significativas (ver Capítulo 2). Porém, esta relação foi obtida somente para o marcador 28S, que se mostrou inadequado para recuperar as relações filogenéticas de *Mycale*. Além do mais, a sequência utilizada nas análises foi gerada por outros pesquisadores (LOH *et al.*, 2012), e, sendo assim, a possibilidade de erro de identificação da amostra ou contaminações na amplificação de DNA não poderiam ser averiguadas propriamente por este trabalho. Desta forma, por conservadorismo, o posicionamento desta espécie é aqui

considerado um nó abaixo deste clado\*, posição esta que a reúne com outras espécie pertencentes ao mesmo subgênero (clado J). Uma vez que o posicionamento de *M. (Aeg.) adhaerens* não pôde ser determinado apropriadamente, este permanece uma questão em aberto a ser melhor avaliado por meio de outros marcadores moleculares e amostras adicionais. Contudo, mesmo o marcador molecular mais variável (16S) falhou em recuperar relações monofiléticas para as espécies deste grupo, sendo este reconhecido como um único clado politômico, com algumas sequências apresentando maior ou menor grau de divergência. Uma vez que os resultados obtidos foram incapazes de determinar uma delimitação entre espécies, este clado constitui, no escopo deste trabalho, um complexo de espécies, denominado complexo *M. (C.) microsigmatosa*. Esta nomeação se deu simplesmente devido à presença de um maior número de sequências desta espécie e por esta ter servido foco do estudo de variabilidade populacional apresentado posteriormente neste trabalho (Capítulo 3).

O subgênero *Mycale* se mostrou o mais divergente nas análises moleculares. As duas únicas espécies recuperadas em um mesmo clado foram *M. (M.) alagoana* e *M. (M.) arenaria*, as quais são consideradas pertencendo a um grupo bem delimitado de espécies dentro de *M. (Mycale)* caracterizadas, principalmente, por possuir anisoquetas tipo I curvadas, a chamada "reunião curvada" (do inglês, "*curved-assembly*"). Mais particularmente, a um subgrupo deste, que reúne espécies morfologicamente semelhantes à *M. (M.) immitis*, ou o grupo-*immitis*. Contudo, Hajdu (1995), em sua reconstrução filogenética do subgênero *Mycale*, ao recuperar e delimitar tais agrupamentos, encontrou uma relação de grupo-irmão entre *M. (M.) arenaria* e *M. (M.) thielei* – a qual também pertence ao grupo-*immitis*, relação esta que não foi recuperada em nenhuma das análises realizadas neste trabalho. Este resultado contradiz os resultados de Hajdu (1995), que argumenta em prol da formação de um grupo natural para estas espécies. Contudo, somente a utilização de novos marcadores poderia, de fato, vir refutar tais conclusões, uma vez que sempre há a possibilidade de uma taxa evolutiva por parte deste incompatível com a filogenia a ser recuperada por conta do grau de divergência entre as espécies. Além do mais, somente três espécies do chamado grupo-*immitis* foram analisadas neste trabalho, e nenhum representante de *Grapelia*, a qual também faz parte da "reunião curvada", e uma verificação mais adequada deste agrupamento requer um maior número de amostras. *M. (M.) lingua*, por sua vez, em todas as reconstruções, foi recuperada formando um clado com *M. (Aegogropila) tunicata*. Dado que estas duas espécies apresentam

---

\* Posição assumida para as análises posteriores (Capítulo 2 e 4), como expresso no sumário das relações filogenéticas de *Mycale* (ver Figura 1.26).

características morfológicas bem distintas (ver Capítulo 2), este se mostra um agrupamento anômalo, não havendo qualquer trabalho na literatura que o suporte. Porém, as amostras destas espécies foram doadas pelo Museu Zoológico de Amsterdã (ZMA), e o identificador destas é desconhecido, e sendo assim, é possível que a identificação deste material esteja errada. Todavia esta possibilidade não pôde ser verificada neste trabalho uma vez que os fragmentos das amostras doadas foram totalmente consumidos durante os procedimentos moleculares. Tendo em vista que as extrações de DNA deste material foram realizadas por um colaborador, também há possibilidade de que tenha havido contaminação ou troca de identificação deste material durante seu processamento. Sendo assim, este agrupamento é bastante questionável, e necessita de uma revisão a partir de novas amostras e/ou marcadores. Porém a grande similaridade entre as sequências de 28S de *M. (Aeg.) tunicata* com as de *M. (M.) lingua*, tanto as obtidas neste trabalho quanto as disponíveis em bancos de dados públicos na internet, evidencia que, caso haja algum erro na identificação ou contaminação destas amostras, este provavelmente se deu nas amostras de *M. (Aeg.) tunicata*. E até que haja evidências concretas de uma ou outra explicação desta anomalia, a sequência de *M. (Aeg.) tunicata*, para fins comparativos nas análises realizadas nos próximos capítulos, será desconsiderada. Outra problemática envolvendo as amostras de *M. (M.) lingua* e *M. (Aeg.) tunicata* é o seu agrupamento com sequências de *Paresperella*. Considerando que este grupo apresenta características morfológicas bem definidas, não seria esperado que este fosse recuperado com espécies tão divergentes. *Paresperella* foi representada nas análises por apenas uma espécie, o que prejudica quaisquer afirmações a respeito de seu posicionamento filogenético. Sequências de *Paresperella* de outras espécies também foram obtidas, mas devido ao agrupamento com espécies muito divergentes (não pertencentes a *Mycale*) e dúvidas em relação a identificação deste material, estas foram removidas das análises finais (dados não mostrados). Sendo assim, há certa dúvida em relação a monofilia de *Paresperella*, cuja única distinção morfológica é uma modificação de um tipo espicular – sigmas serrilhadas – cuja homoplasia seria facilmente justificável, dado o grau de plasticidade encontrado na espiculogênese em esponjas (MALDONADO et al., 1999). Porém, até que mais amostras de outras espécies de *Paresperella* sejam analisadas, e sua monofilia seja avaliada, esta relação é vista como anômala, mas sem critérios para descartá-la, aceita até que novas evidências sejam geradas. As demais espécies de *M. (Mycale)* nas reconstruções, *M. (M.) laevis* e *M. (M.) grandis* (que esteve presente apenas nas análises com o marcador 28S), também não foram recuperadas formando agrupamentos com nenhuma outra espécie do subgênero. Este grau de



divergência entre sequências de *M. (Mycale)* indica que este subgênero talvez seja composto por vários subgrupos menores, como sugerido por Hajdu (1995), mas mais numerosos do que apontado por este autor. Considerando que a diagnose deste subgênero se baseia em uma característica morfológica relativamente pouco consistente – esqueleto ectossomal "confuso" – e dada a variabilidade encontrada no grupo para outras características (ver Capítulo 2), é provável que este, de fato, seja polifilético, estando distribuído em um número maior de pequenos agrupamentos do que se acreditava.

Os subgêneros *Naviculina*, *Oxymycale*, e *Zygomycale* foram os que apresentaram menor número de espécies amostradas, ao lado de *Paresperella* (como discutido acima). Uma vez que *Oxymycale*, assim como *Paresperella*, contou com somente uma única espécie nas reconstruções, nada se pode dizer a respeito de sua composição, exceto que diferentemente desta última, *Oxymycale* não foi recuperado formando qualquer clado com outras sequências de *Mycale*. *Naviculina*, por sua vez, foi representada por três espécies, *M. (N.) arcuiris*, *M. (N.) flagellifera* (somente nas análises com 28S) e *M. (N.)* sp. (somente com 16S). Em cada análise correspondente, seja 16S ou 28S, *Naviculina* foi recuperada como um grupo monofilético, refletindo um alto grau de coesão determinado por uma característica morfológica distinta, a presença de naviculiquela (ver Capítulo 2). *Zygomycale*, por sua vez, contou com a presença de *M. (Z.) angulosa* e *M. (Z.) parishi*, as quais também foram recuperadas em um único clado. Contudo, a delimitação entre estas espécies não foi evidente a partir dos dados moleculares, que se apresentaram em um complexo de espécies – similarmente ao complexo *M. (C.) microsigmatosa* – caracterizado pela presença de isoquelas (ver Capítulo 2).

#### 1.4.5. Relações de parentesco entre os clados

As reconstruções filogenéticas de *Mycale* revelaram uma relativa falta de resolução dos ramos mais internos, o que pode ser creditado tanto à inadequação dos marcadores moleculares para recuperar estas relações quanto a uma divergência filogenética maior do que a esperada dada a sistemática atual do grupo. Contudo, algumas relações de parentesco se mostraram congruentes, como a formação de um clado entre sequências de algumas espécies de *Aegogropila* com *Carmia* e *Zygomycale* (clado B). A proximidade entre estes grupos é amplamente discutida na literatura, sendo que, no passado *Aegogropila* já foi até considerado um sinônimo júnior de *Carmia* (DE LAUBENFELS, 1936), assim como *Zygomycale* também já foi considerado um sinônimo júnior, mas desta vez de *Aegogropila* (VAN SOEST, 1984).

As reconstruções filogenéticas morfológicas de Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994) recuperaram uma relação de parentesco entre *Aegogropila* e *Carmia*. No entanto, os autores não incluíram *Zygomycale* em suas análises. Os autores também recuperaram uma maior proximidade de *Paresperella* com *Aegogropila*, ao contrário do encontrado neste trabalho. Hajdu (1995) também recuperou um agrupamento entre estes subgêneros, incluindo *Zygomycale*. Mas este agrupamento também incluía *Paresperella* e, adicionalmente, *Oxymycale*, relações estas não corroboradas pelas topologias recuperadas no presente trabalho. A filogenia molecular de Loh e colaboradores (2012) também parece mostrar uma relação de proximidades entre estes grupos, porém a ausência de suporte nos ramos de sua topologia parece indicar uma relação fraca entre elas por meio de seus dados.

As reconstruções filogenéticas morfológicas de *Mycale* (HAJDU e DESQUEYROUX-FAÚNDEZ, 1994; HAJDU, 1995) recuperam *Arenochalina* como grupo mais basal do gênero, uma relação que também não é suportada pelas filogenias moleculares aqui reconstruídas. Os dados de 28S suportam uma relação basal de *Naviculina* em relação as demais *Mycale*, e considerando a características distintiva deste subgênero, este posicionamento fortaleceria – juntamente com o posicionamento de *Anomomycale*, externo ao gênero – uma redefinição dos tipos de anisoquelas encontradas em *Mycale*, a qual consideraria microscleras modificadas, como anomoquela e naviculiquela, tipos espiculares específicos, podendo ou não ser homólogas às outras anisoquelas. Contudo, nas reconstruções com base no marcador 16S, assim como nas reconstruções de dados combinados – possivelmente devido a uma prevalência do sinal filogenético de 16S em relação ao de 28S – quem assume esta posição basal é *M. (M.) laevis*. Mas, provavelmente, este posicionamento se deve mais a um artefato produzido pela taxa evolutiva das sequências deste espécie do que a uma relação natural. Uma vez que o posicionamento deste grupo na base da evolução do gênero aumenta ainda mais a problemática da definição de agrupamentos em *Mycale*, e a incongruência desta posição com as recuperadas com o marcador 28S, e em outros trabalhos (LOH *et al.*, 2012), a relação basal de *Mycale* se apresenta sem resolução, e tanto *M. (M.) laevis* quanto *Naviculina* estariam em uma politomia de base. E devido a falta de resolução de outros clados, esta politomia de base se estenderia a uma grande parte do gênero, cujas relações não puderam ser recuperadas com um suporte aceitável.

Desta forma, os clados recuperados de *Mycale* podem ser resumidos de seguinte forma:

1. *Carmia* I (monofilético), compreendendo as espécies *M. (C.) microsigmatosa*, *M. (C.) fistulifera*, *M. (C.) phyllophila* e *M. (C.) cecilia*;
2. *Zygomycale* (monofilético), compreendendo as espécies *M. (Z.) angulosa* e *M. (Z.) parishi*;
3. *Aegogropila* I (parafilético), compreendendo as espécies *M. (Aeg.) crassissima*, *M. (Aeg.) contarenii*, *M. (Aeg.) escarlatei*, *M. (Aeg.) lilianae*, uma das espécies crípticas de *M. (Aeg.) magellanica*, *M. (Aeg.) sulevoidea* e *M. (Aeg.) syrinx*.
4. *Aegogropila* II (monofilético), compreendendo as espécies *M. (Aeg.) furcata* e *M. (Aeg.) rotalis*.
5. *Carmia* II (parafilético), compreendendo duas espécies crípticas de *M. (C.) magnirhaphidifera*;
6. *Aegogropila* III (monofilético), compreendendo as espécies *M. (Aeg.) americana*, *M. (Aeg.) carmigropila* e *M. (Aeg.) citrina*;
7. *Arenochalina* (monofilético), compreendendo *M. (Are.) mirabilis*, as duas espécies crípticas de *M. (Are.) laxissima*, e uma das espécies crípticas de *M. (Are.) magellanica*.
8. *Mycale* I (monofilético), compreendendo as espécies do grupo-*immitis* *M. (M.) arenaria* e *M. (M.) alagoana*;
9. *Paresperella* (monotípico), compreendendo amostras não identificadas até o nível de espécie;
10. *Mycale* II (monotípico), compreendendo somente *M. (M.) lingua*;
11. *Mycale* III (parafilético), compreendendo as espécies *M. (M.) grandis*, *M. (M.) laevis* e *M. (M.) thielei*;
12. *Oxymycale* (monotípico), compreendendo somente *M. (O.) acerata*; e
13. *Navicula* (monofilético), compreendendo as espécies *M. (N.) arcuiris*, *M. (N.) flagellifera* e amostras não identificadas até o nível de espécie.

As relações filogenéticas entre estes grupos seria: ((1,2,3),4,5),6,7,8,9,10,11\*,12,13\*), sendo que 6 e 7 poderiam ou não formar um clado entre si, e 11 ou 13 poderiam corresponder ao grupo ancestral dentro de *Mycale*.

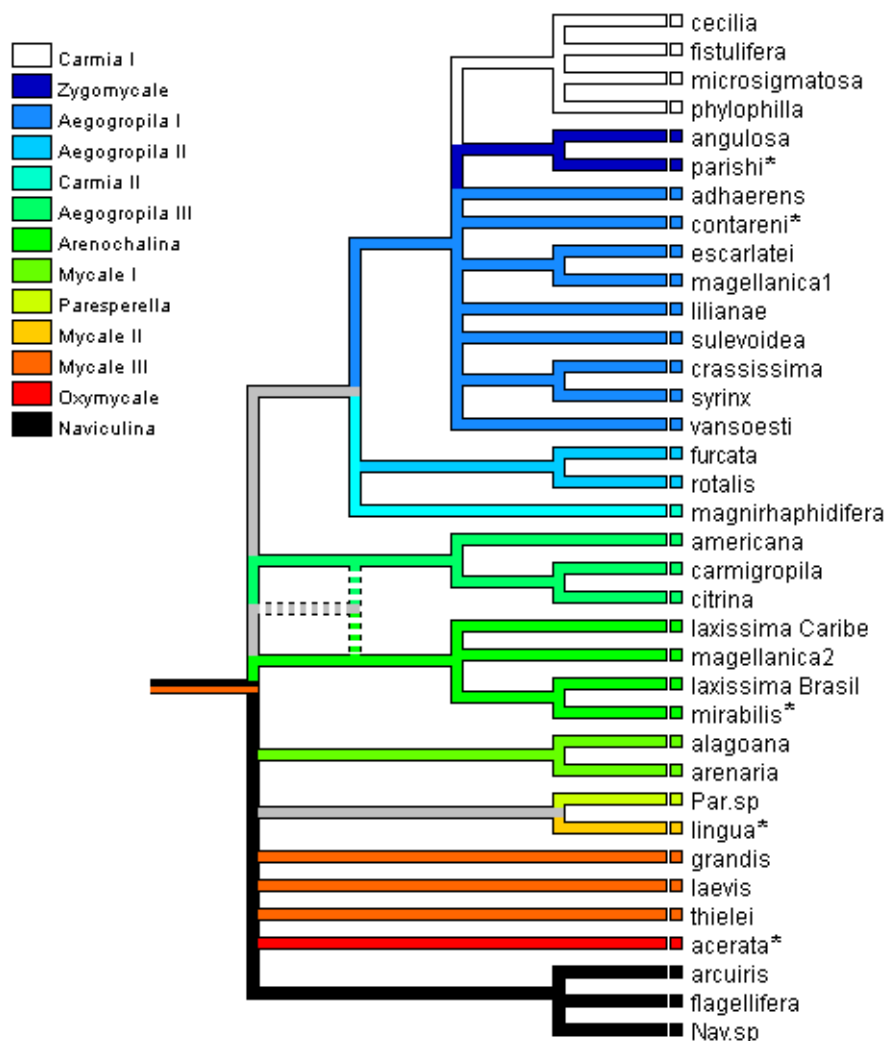


Figura 1.25. Sumário das relações filogenéticas entre espécies de *Mycale* Gray, 1867 obtido a partir das reconstruções realizadas por meio de dados moleculares. As cores identificam os clados mono- e parafiléticos, definidos pelo subgênero da maioria das espécies compreendidas conforme legenda. Os táxons terminais considerados na análise são definidos por seus epítetos, e, quando o caso, por sua localidade. Os asteriscos indicam as espécies-tipo de seus sub-gêneros correspondentes. Os ramos tracejados entre os grupos *Aegogropila* III e *Arenochalina* indicam uma hipótese potencial, menos conservadora, onde estes apresentam uma relação de parentesco entre si. A raiz da árvore indica as duas hipóteses obtidas para o grupo basal de *Mycale*. Ver texto para mais detalhes.

## 2 DA EVOLUÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

### 2.1 Introdução

Embora a morfologia do gênero *Mycale* Gray, 1867 tenha sido brevemente descrita na Introdução Geral deste trabalho, em vista dos detalhes da anatomia deste grupo tratados neste capítulo, uma descrição mais detalhada da morfologia destas espécies se faz necessária.

#### 2.1.1 Morfologia externa

As esponjas do gênero *Mycale* apresentam uma grande variação em suas características morfológicas externas (Figura 2.1). Esses animais podem ser encontrados em formas que variam desde finas incrustações em diversos substratos – rochosos, não-consolidados, de origem animal, etc – às outras mais maciças, as quais podem ser observadas tanto em estruturas eretas – tubulares ou ramificadas – quanto amorfas – repentes, lobadas e outras (Figura 2.2.A). Esta variação, em alguns casos, pode até mesmo ser observada entre indivíduos de uma mesma espécie, como, por exemplo, em *M. (Zygomycale) angulosa* (DUCHASSAING e MICHELOTTI, 1864), cuja variabilidade inclui as principais formas típicas encontradas no gênero (Figura 2.1.C-D). Embora essa variabilidade encontrada em *Mycale* não tenha sido especificamente estudada, trabalhos realizados com outras esponjas têm mostrado que a forma das esponjas no ambiente apresenta uma grande plasticidade fenotípica influenciada principalmente por fatores ambientais como correntes marinhas, hidrodinamismo e predação (e.g., BELL et al., 2002; HILL e HILL, 2002)

A superfície destas esponjas também apresenta uma grande variação, onde podem ser observadas esponjas com superfícies que variam de lisa a irregular. Ocorrem também outras mais ornamentadas, que incluem a presença de cônulos, estriamentos, espinhamentos, poros e outras variações (Figura 2.2.B). As espécies de *Mycale* normalmente apresentam uma consistência macia e compressível. Contudo não é incomum encontrar esponjas deste gênero com consistências mais fibrosas ou mesmo firmes e duras. A superfície e consistências das esponjas está intimamente relacionada à morfologia interna desses animais, sendo que

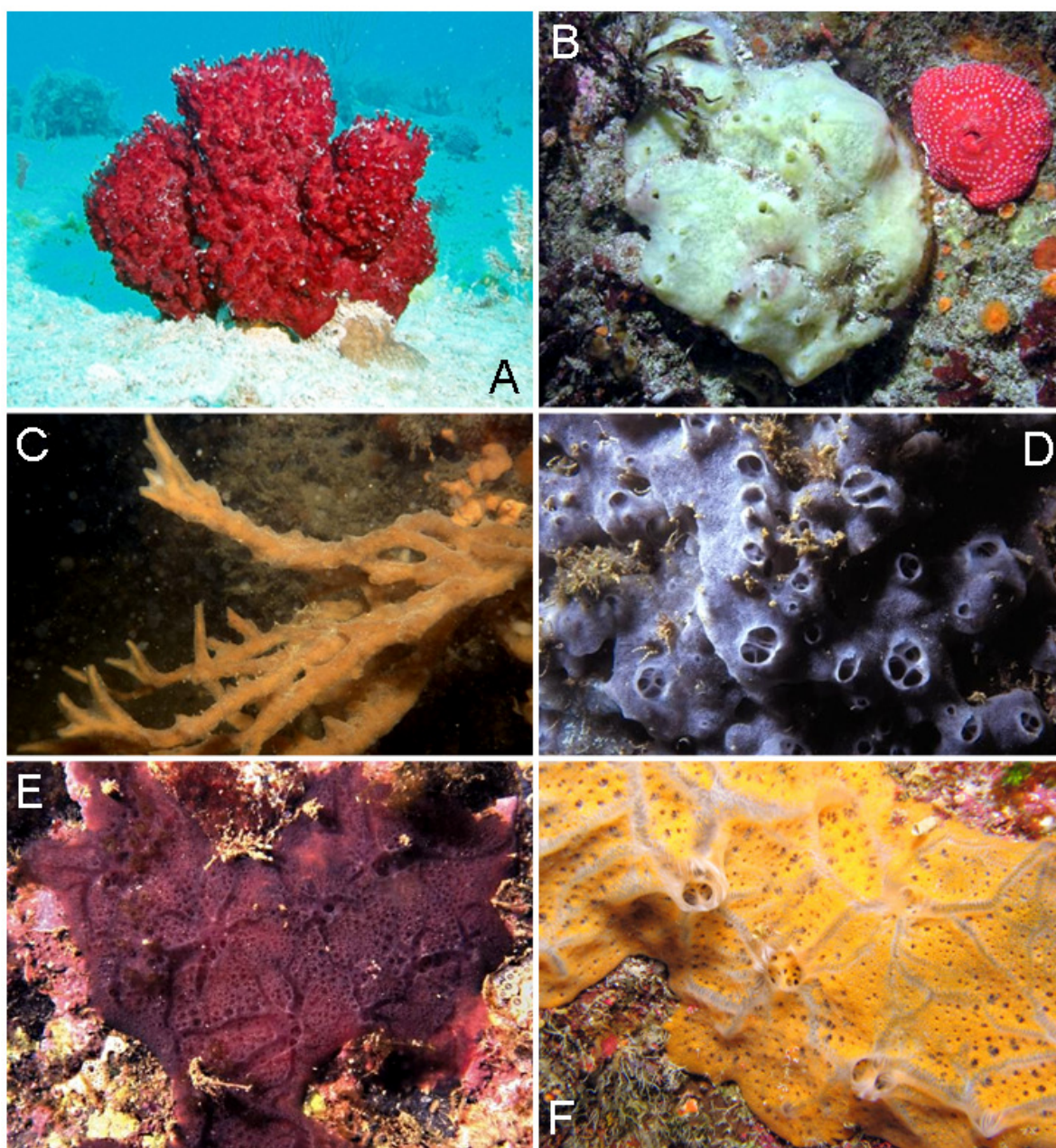


Figura 2.1. Exemplos da diversidade morfológica encontrada em *Mycale* Gray, 1867. Fotografias subaquáticas *in situ* de indivíduos das espécies: (A) *M. (Arenochalina) laxissima* (Duchassaing e Michelotti, 1864); (B) *M. (Aegogropila) adhaerens* (Lambe, 1893); (C-D) *M. (Zygomycale) angulosa* (Duchassaing e Michelotti, 1864); (E) *M. (Carmia) magnirhaphidifera* van Soest, 1984; e (F) *M. (Mycale) laevis* (Carter, 1882). Crédito das fotos: Coralpedia, J. Watanabe, F. Moraes, E. Hajdu e F. Charpin.

estrutura esquelética subjacente desempenha um papel crucial na determinação destas características. Desta forma, a regularidade dos tratos esqueléticos terminais influencia a mesma na superfície das esponjas, enquanto que tratos esquelético mais robustos implicaria em consistências mais firmes.



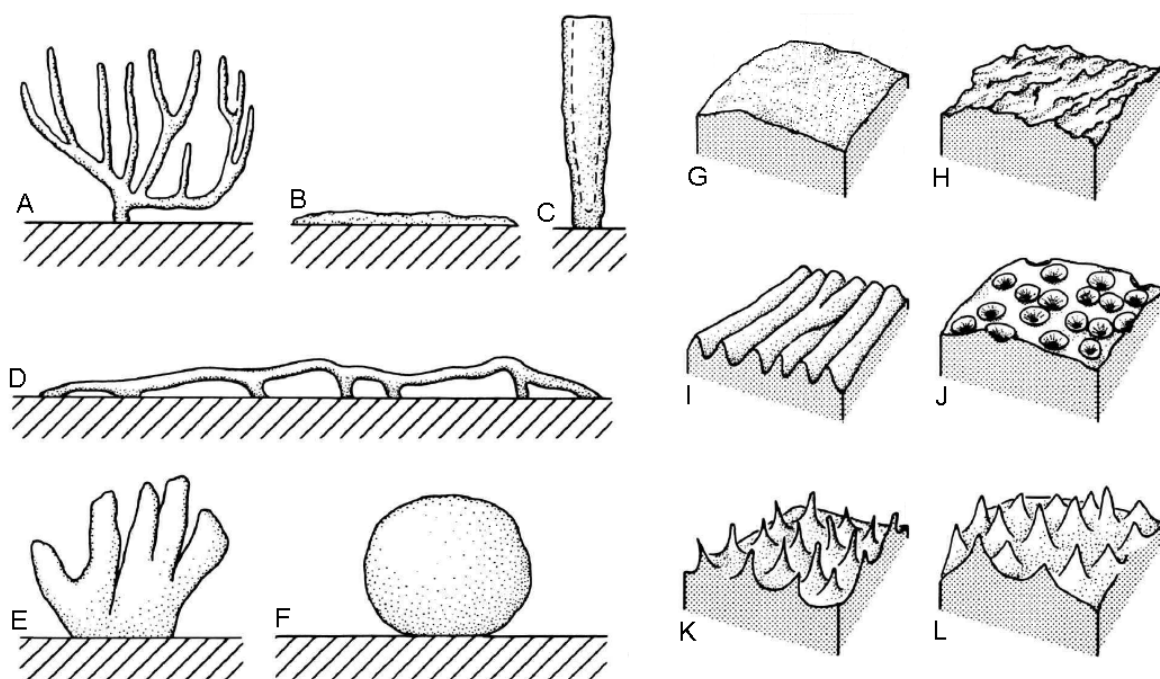


Figura 2.2. Ilustrações esquemáticas de algumas das possíveis formas de crescimento (A-F) e esculpturas superficiais (G-L) encontradas em *Mycale* Gray, 1867. As formas de crescimento, dentre outras, podem ser: (A) arborescente; (B) incrustante; (C) tubular; (D) repente; (E) ramificada ereta; (F) maciça. As superfícies podem ser: (G) lisa; (H) irregular; (I) estriada; (J) crivada por poros; (K) espinada; e (L) conulosa. Retirado de Boury-Esnault e Rützler (1997).

A coloração deste animais é altamente polimórfica, na qual indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar miríades de cores diferentes, como por exemplo *M. (Naviculina) arcuiris* Lerner e Hajdu, 2002. Em *Mycale*, podem ser observadas esponjas com cores que vão desde branco a bege, passando por tons mais claros, como amarelo, azul e verde, até cores fortes como rosa, vermelho, laranja, roxo, marrom e outras. Esta é outra característica em esponjas cuja variabilidade também é associada a fatores ambientais, onde, neste caso, a associação com microorganismos parece ser uma das principais fontes de variação. Esta relação é bastante evidente em esponjas hospedeiras de microorganismos fotossintéticos, tais como *Aplysina cauliformis* (Carter, 1882) e *Cliona viridis* (Schmidt, 1862) cujas colorações se devem em grande parte a seus simbiontes – cianobactérias e dinoflagelados, respectivamente. Um exemplo em *Mycale* é dado pela espécie *M. (M.) vansoesti* sensu Calcinaï e colaboradores (2006), cuja coloração na superfície externa e na parede do átrio é branca, mas manchas cor de rosa, provenientes da presença de uma alga filamentosa simbiote, podem ser vistas esporadicamente. Algumas espécies, como, por exemplo, *Halichondria moorei* Bergquist, 1961, podem mudar de cor quando trocam de sexo – as esponjas são geralmente

hermafroditas – indicando uma associação entre sua coloração e um ambiente químico específico. Mas, ao contrário do que as cores vibrantes que esses animais podem sugerir, em contraste ao que ocorre em outros metazoários, não há evidências de que as esponjas apresentem aposematismo (PAWLIK *et al.*, 1995).

Uma característica peculiar de algumas espécies de *Mycale* é a exudação de um muco espesso, principalmente ao ser manipulada (Figura 2.3). A exudação de muco é relatada para várias espécies de *Mycale*, a qual varia enormemente em grau, sendo bastante abundante em espécies como *M. (Arenochalina) laxissima* (Duchassaing e Michelotti, 1864) e *M. (Aegogropila) americana*. A composição e natureza deste muco ainda são desconhecidas, e a sua funcionalidade, incerta. Contudo, há evidências de que este muco auxiliaria o descongestionamento dos canais aquíferos dessas esponjas, facilitando o bombeamento de partículas em suspensão que poderiam obstruí-los (KOWALKE, 2000). Todavia, esta explicação fisiológica implica em uma variação na exudação de muco influenciada por condições ambientais, o que aparentemente não condiz com o aparecimento desta característica, uma vez que espécies de *Mycale* sob as mesmas condições variam na sua exudação de muco, enquanto que as mesmas espécies em ambientes diferentes parecem se comportar da mesma maneira, apresentando uma produção de muco relativamente constante.

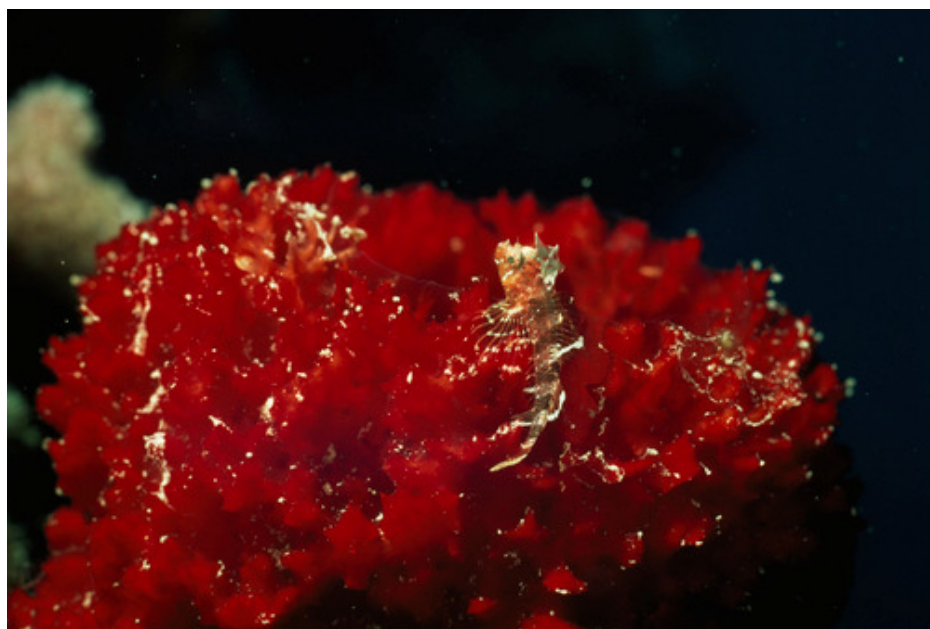


Figura 2.3. Exudação de muco em *Mycale* Gray, 1867. Na foto um peixe tripterigídeo se camufla em meio ao muco brilhante de uma espécie de *Mycale*. Crédito da foto: D. Doubilet, *National Geographic Stock*.



### 2.1.2 Estrutura do esqueleto

A organização do esqueleto em *Mycale*, como na maioria das esponjas, se dá distintamente entre uma camada mais superficial da pinacoderme e uma mais interna, contendo as câmaras coanocitárias. A estrutura esquelética destas duas camadas difere em relação às funções de cada uma, onde um esqueleto ectossomal protege e isola o interior das esponjas e um coanossomal fornece suporte aos canais aquíferos e a própria.

O esqueleto ectossomal das espécies de *Mycale* apresenta três organizações estruturais típicas. A primeira, chamada de ectossoma não-especializado, consiste em uma camada superficial, ou córtex, sem organização aparente, onde praticamente não há uma distinção clara entre esta e a porção mais interna do esqueleto (Figura 2.4.A). Na segunda, o ectomossoma é dito confuso, pois apresenta uma distinta malha de espículas desorganizadas, principalmente megascleras – mas a ocorrência de microscleras também é comum – na superfície das esponjas (Figura 2.4.B). Por último, em algumas espécies, pode ser encontrado um ectossoma bem definido, consistindo em uma malha reticulada tangencial à superfície, na qual tratos esqueléticos constituídos de megascleras formam uma estrutura especializada em padrões triangulares, retangulares e poligonais, sendo, em muitos casos, destacável com facilidade (Figura 2.4.C).

Subjacente à camada ectossomal, em certas espécies de *Mycale*, é possível observar – visíveis na superfície – uma organização dos canais aquíferos exalantes convergindo para os ósculos, normalmente formando, em geral, um padrão estrelado (ver Figura 2.1.E-F). Estes canais subectossomais se apresentam de maneira espécie-específica, embora se acredita que os padrões formados por estes, intimamente relacionados a estrutura dos canais aquíferos e distribuição dos ósculos, possam ser influenciados por fatores ambientais.

O esqueleto de sustentação encontrado em *Mycale* pode estar organizado em três formas básicas: plumoso, reticulado e plumoreticulado. O esqueleto coanossomal plumoso consiste em uma organização esquelética na qual tratos espiculares – primários – ascendem da base de fixação da esponja a partir dos quais outros irradiam obliquamente (Figura 2.4.D). Por sua vez, o esqueleto coanossomal reticulado se apresenta como uma rede tri-dimensional de tratos esqueléticos dispostos, quase sempre, de forma regular (Figura 2.4.D). Já o esqueleto coanossomal plumoreticulado consiste em uma organização esquelética intermediária entre os dois anteriores, no qual, assim como no esqueleto plumoso, tratos espiculares primários ascendentes são claramente distinguíveis a partir da base das esponjas. Contudo os tratos secundários que se irradiam destes terminam por se entrecruzar nas porções mais superiores

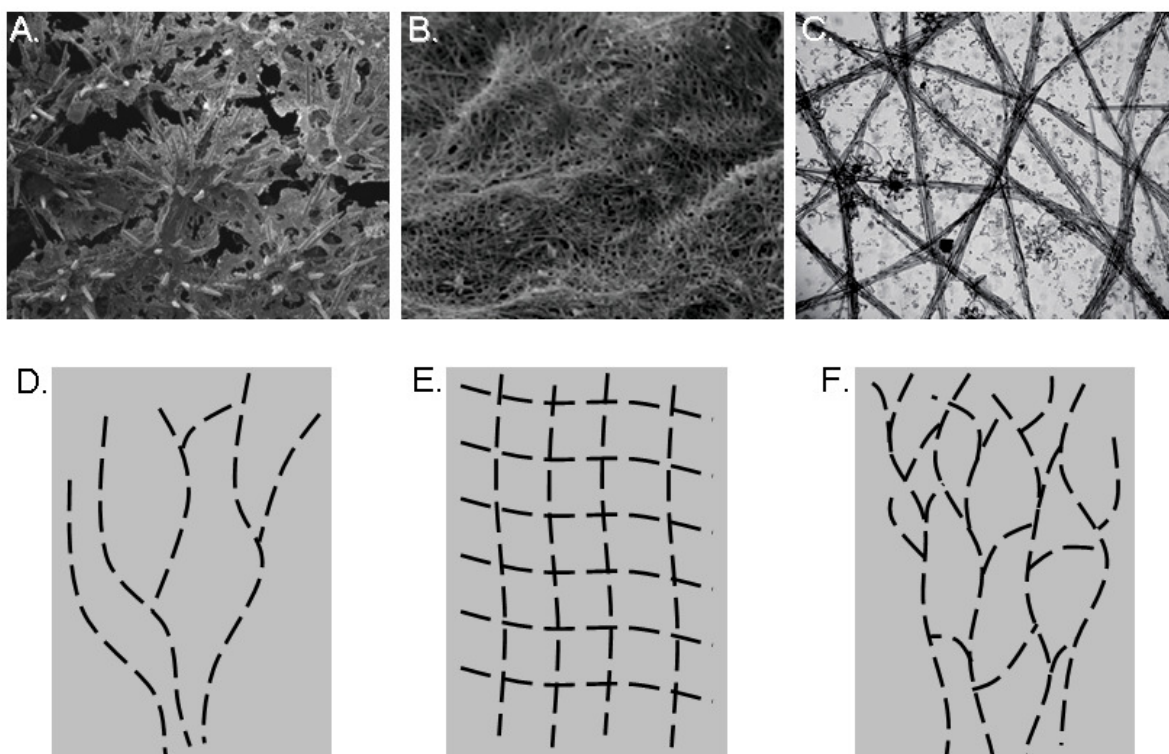


Figura 2.4. Organização típica dos esqueletos ectossomal (A-C) e coanossomal (D-F) encontrada em espécies de *Mycale* Gray, 1867. Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das esponjas *Mycale* (*Zygomycale*) *ramulosa* Carballo e Cruz-Barraza, 2010, *Mycale* (*Mycale*) *vansoesti sensu* Calcinai, Cerrano, Totti, Romagnoli e Bavestrello, 2006 e *Mycale* (*Naviculina*) *diversisigmata* Van Soest, 1984 evidenciando, respectivamente, os ectossomas não-especializado (A), confuso (B) e especializado com reticulação tangencial (C). Esquematização dos esqueletos coanossomais plumoso (D), reticulado (E) e plumoreticulado (F).

do esqueleto, similarmente ao esqueleto reticulado (Figura 2.4.F). Nem sempre a distinção entre esses três tipos esqueléticos é clara, uma vez que é possível observar um gradiente de variação entre as formas típicas. Além disso, ainda pouco se sabe a relação entre o hábito ou a forma dessas esponjas e a organização do esqueleto, o que poderia impelir restrições ao desenvolvimento destas características. Por exemplo, a caracterização do esqueleto coanossomal em formas mais maciças é quase sempre mais acurado do que a de formas incrustantes, uma vez que, nas primeiras, o maior espaço interno das esponjas permite uma distinção mais clara entre os tratos superiores e os da base.

### 2.1.3 Elementos do esqueleto

Os elementos que constituem o esqueleto das espécies de *Mycale* compreendem, sobretudo, espículas. Embora fibras de espongina também sejam distinguíveis, estas

apresentam uma grande variação em grau entre as espécies, sendo mais conspícuas, por exemplo, em espécies como *M. (C.) carmigropila* e *M. (Are.) mirabilis*. Na última, as fibras de espongina apresentam inclusões de material externo e, até mesmo, algas filamentosas. Um exemplo similar também pode ser encontrado em *M. (M.) vansoesti* sensu Calcinaï e colaboradores (2006), a qual apresenta baixos valores de silicato, e algas filamentosas, fixadas por projeções de fibras de espongina contribuem diretamente na constituição de seu esqueleto (CALCINAI *et al.*, 2006).

As espículas de maiores dimensões, megascleras – 60 µm a 2 mm – tipicamente encontradas em *Mycale* são subtilóstilos, i.e., espículas monoaxônicas com uma extremidade pontiaguda e a outra com uma cabeça ligeiramente definida. Hajdu *et al.* (1994) consideram os subtilóstilos de *Mycale* um tipo particular de substilóstilo, chamado mycalóstilo, que difere dos demais em relação a extremidade da cabeça; onde, em *Mycale*, esta aparentemente é definida mais por uma constrição, formando um pescoço, do que por uma extremidade inflada. Esta diferenciação apresenta uma importante implicação evolutiva, pois remete a uma derivação de uma característica a um novo estado, como apontado por Hajdu *et al.* (1994), Contudo, a maioria dos autores comumente se refere a essas megascleras unicamente como subtilóstilos, principalmente por ainda não haver evidências que determine uma diferença intrínseca no processo ontogenético entre a forma típica de um subtilóstilo e dos mycalóstilos.

Em *Mycale*, também são observadas megascleras do tipo óxea – espículas monoaxônicas com as duas extremidade pontiagudas – as quais, por sua vez, substituem os subtilóstilos nas espécies em que estão presentes. Acredita-se que as óxeas sejam derivadas dos subtilóstilos, embora esta suposição se deva exclusivamente a pressupostos filogenéticos, sem evidências ontogenéticas. A presença desta espícula caracteriza o sub-gênero *Oxymycale*.

Em *Mycale*, a variedade de espículas de pequenas dimensões, microscleras – menores do que 60 µm – é bem maior (Figura 2.5), sendo que as mais comumente observadas são as sigmas – espículas em forma de 'C' ou 'S' – e anisoquelas palmadas – espículas com um eixo curvado e alas recurvadas de tamanhos desiguais nas extremidades, sendo que as laterais coalescem com o eixo e a central permanece livre. Mais raramente, são encontradas isoquelas palmadas, cuja presença das últimas caracteriza o sub-gênero *Zygomycal*.

Embora as sigmas possam apresentar grandes variações de tamanho, as formas destas espículas é relativamente fixa, ou apresenta poucos parâmetros passíveis para variação. Uma derivação importante é a presença de uma micro-esculturação serrada nas bordas das sigmas de algumas espécies, uma característica diagnóstica do sub-gênero *Paresperella*. Por outro

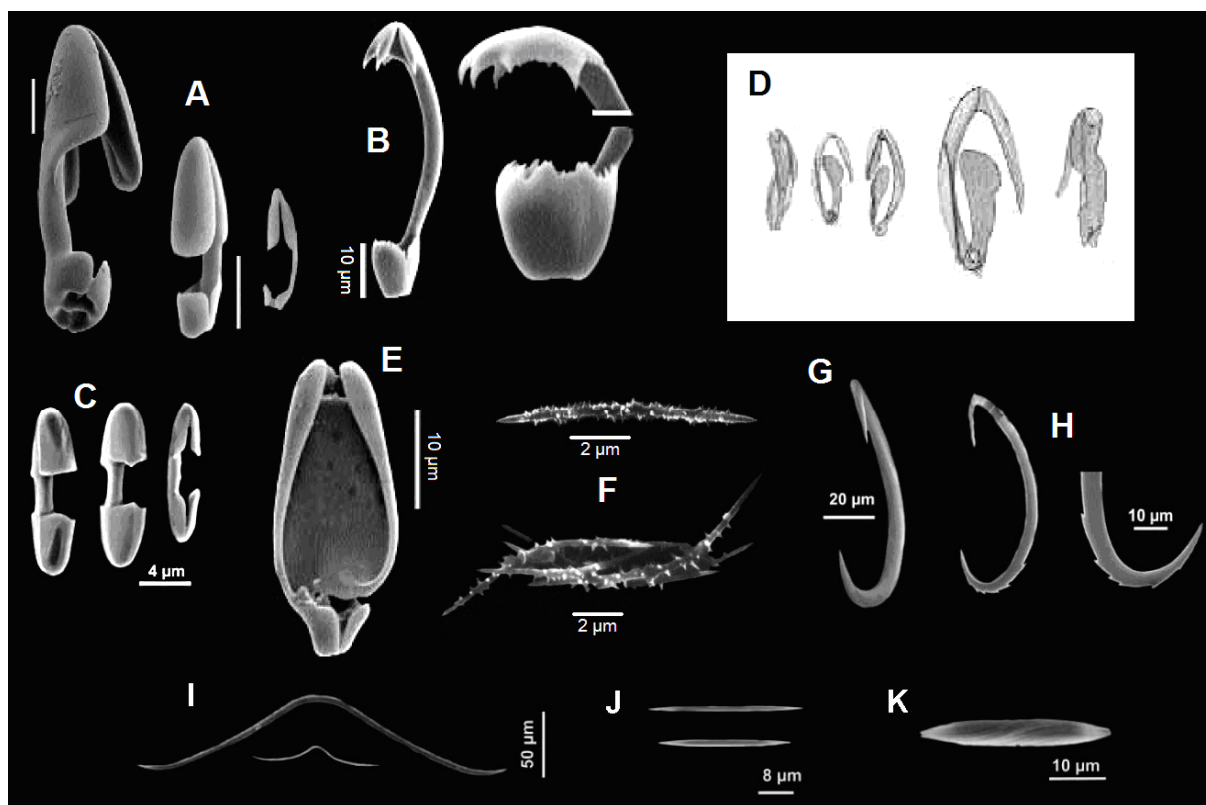


Figura 2.5. Principais microscleras de *Mycale* Gray, 1927. A. Anisoquela em três categorias de tamanho, *M. (Aegogropila) contareni* (Martens, 1824). B. Anisoquela unguiferada, *M. (Grapelia) unguifera* Hajdu, Zea, Kielman e Peixinho, 1995. C. Isoquelas, *M. (Zygomycale) ramulosa* Carballo e Cruz-Barrazo, 2010. D. Anomoquela, *M. (Anomomycale) titubans* (Schmidt, 1870). E. Naviculiquela, *M. (Naviculina) diversisigmata* (van Soest, 1984). F. Micracantóxas, *M. (Aegogropila) lilianae* Carballo e Hajdu, 1998 (em cima), *M. (Carmia) urizae* Carballo e Hajdu, 1998 (embaixo). G. Sigma, *M. (Zygomycale) ramulosa* Carballo e Cruz-Barrazo, 2010. H. Sigma serreada, *M. (Paresperella) psila* (de Laubenfels, 1930). I. Toxas em duas categorias de tamanho, *M. (Aegogropila) magnitoxa* Carballo e Cruz-Barrazo, 2010. J. Ráfides, *M. (Z.) ramulosa* Carballo e Cruz-Barrazo, 2010. K. Tricodragma, *M. (Aegogropila) dickinsoni* Carballo e Cruz-Barrazo, 2010.

lado, o gênero apresenta uma grande variedade de formas de anisoquelas consideradas derivadas, como anomoclelas, naviculiclelas, e anisoquelas unguiferadas. Em *Mycale*, é possível observar também uma grande variação em torno do morfotipo básico da anisoquela palmada, uma variação que vai desde formas mais curvadas, com alas curtas, à anisoquelas retas com alas longas e paralelas ao eixo. Doumenc e Levi (1987), em um dos poucos trabalhos em Porifera a empregar métodos morfométricos a fim de reconhecer agrupamentos de formas básicas de espículas, a partir de análises de parâmetros morfométricos das anisoquelas-I de *Mycale*, definiram cinco formas distintas – identificadas por A - E – que se

distinguem por apresentar sucessivamente eixos maiores e alas menores. Contudo, nenhum trabalho posterior veio a utilizar a categorização de formas típicas definidas pelos autores, ou mesmo outro método quantitativo para tal, e a diversidade de formas das anisoquelas em *Mycale*, com exceção das formas mais derivadas apresentadas acima, se encontram todas agrupadas sob uma única designação.

Além das variações no formato geral das anisoquelas, uma alta variabilidade de detalhes na morfologia destas espículas também é observada. Estas características microscópicas na estrutura das anisoquelas só começaram a ser detalhadas com a introdução e predominância do uso de micrografias eletrônicas de varredura (MEV), sem a qual, estas continuariam a ser desconhecidas. O pé das anisoquelas – a quela menor das anisoquelas – é uma fonte contínua de micro-características (Figura 2.6). Nesta é possível observar projeções digitiformes na ala frontal, esporões basais, alas (quase) fusionadas, formando um poro arredondado, ou não fusionadas, ondulações na falce, e outras mais. A cabeça das anisoquelas – quela maior – também podem apresentar muitas micro-características, embora estas pareçam ser relativamente menos frequentes. Da mesma forma, estas pequenas modificações na forma das anisoquelas parece ser mais frequente em anisoquelas de menores categorias de tamanho do que nas maiores. Todavia, mesmo sendo predominante atualmente o uso de MEV na descrição de novas espécies, muitas espécies – sobretudo as descritas no século XIX – ainda não foram examinadas por novas técnicas, e ainda há uma grande lacuna no conhecimento a cerca da ocorrência e natureza destas características, e até que ponto estas estão relacionadas à fatores genéticos ou ambientais.

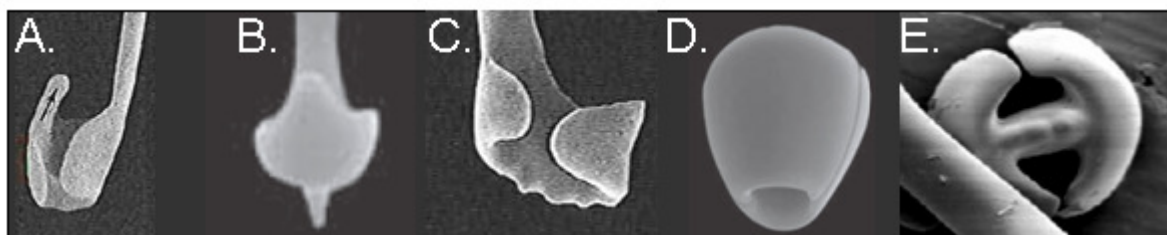


Figura 2.6. Exemplos de características microscópicas observadas nas anisoquelas de *Mycale* Gray, 1927. A. Projeção digitiforme na ala frontal do pé na anisoquela-II de *M. (Aeg.) citrina* Hajdu e Rützler, 1998. B. Esporão basal na anisoquela-III de *M. (M.) alagoana* Cedro, Hajdu e Correia (2011). C. Falce ondulada na anisoquela-I de *M. (M.) laevis* (Carter, 1882). D. Poro arredondado do pé da anisoquela-I de de *M. (M.) alagoana* Cedro, Hajdu e Correia (2011). E. Pé não fusionado da anisoquela-I de *Mycale jasoniae* Lehnert, Stone e Heimler, 2006. Repare que as figuras C e E apresentam as mesmas características, mas em espécies e ângulos diferentes.

Outras microscleras frequentemente observadas são ráfides – semelhantes às óxeas, mas mais finas e geralmente menores – e toxas – semelhantes às ráfides mas com uma inflexão central, em forma de arco – podendo estar tanto isoladas quanto em feixes, formando tricodragmas e toxodragmas, respectivamente. Mais raramente, em algumas espécies de *Mycale* são encontradas micracantóxeas – semelhantes às anteriores, mas apresentando espinhações ao longo do eixo – às quais, acredita-se, serem derivadas de toxas (mas ver abaixo). As relações entre estes tipos de espículas ainda são incertas, mas postula-se que uma série de transformação possível entre elas se dê a partir de espículas do tipo ráfide, por serem estruturalmente mais simples, sendo as toxas formas derivadas destas, e micracantóxeas mais derivadas ainda. Contudo, estas espículas – pelo menos as ráfides e toxas – são consideradas simplesiomórficas em relação às afinidades dentro de Poecilosclerida onde a descontinuidade na sua ocorrência ao longo do grupo seria devido mais a perdas secundárias do que aquisição independente entre as linhagens (VAN SOEST, 1987, 1991; HAJDU *et al.*, 1994).

As dimensões dos tipos espiculares relatados acima – *i.e.*, comprimento, largura, etc – apresentam uma alta variabilidade intra- e interpopulacional (ver Capítulo 3), e normalmente seguem uma distribuição normal típica. Contudo, a maioria, senão todos, podem ser encontrados em diferentes categorias de tamanhos, que representam classes entre as quais há uma perceptível descontinuidade nas dimensões dessas espículas. Essas classes são representadas por números romanos (I, II, III, ...) em ordem decrescente de tamanho, onde por exemplo em uma espécie com sigmas em duas categorias, a sigma tipo I (ou sigma-I) equivale as sigmas maiores enquanto a sigma tipo II (ou sigma-II) as sigmas menores. Acredita-se que o número de categorias de tamanhos de um tipo particular de espícula apresente um forte caráter filogenético, tendo sido utilizado em maior ou menor grau em todas as filogenias morfológicas de *Mycale* (HAJDU e DESQUEYROUX-FAÚNDEZ, 1994; HAJDU, 1999), todavia, ainda é incerto se categorias entre espécies divergentes são ou não homólogas entre si. Similarmente, essas filogenias também utilizaram o tamanho de algumas espículas como características, implicando em uma hipótese primária na qual espécies com espículas com dimensões próximas estariam mais relacionadas. Esta concepção é de certa forma aceita na literatura, se ampliada a fim de incluir características quantitativas como um todo, e se baseia na premissa evolutiva de descendência com modificação. Assim sendo, duas espécies-irmãs, ao compartilhar um ancestral comum direto, compartilhariam uma série de características derivadas deste, e, desta forma, seria mais provável que os valores de suas características quantitativas fossem mais próximos entre si do que com espécies mais distantes. Contudo,

características quantitativas são, por excelência, multifatoriais, e, desta forma, desconhecendo-se os mecanismos de formação destas, é impossível avaliar de que forma pequenas diferenças em múltiplos fatores pode vir a produzir grandes efeitos na morfologia final destas. Além disso, características multifatoriais tendem a ser fortemente influenciadas por fatores ambientais, o que poderia levar, no caso, à homoplasia entre duas espículas com dimensões semelhantes. Embora métodos comparativos tenham sido desenvolvidos para avaliar a evolução de características quantitativas de forma a incluir hipóteses filogenéticas (e.g., FELSENSTEIN, 1985; HARVEY e PAGEL, 1991), em esponjas há uma relativa falta de trabalhos neste sentido, e uma melhor avaliação dos padrões evolutivos das dimensões das espículas ainda se faz necessária.

#### 2.1.4 Homologias e homoplasias em *Mycale*

Como visto anteriormente, os trabalhos pioneiros de Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994) e Hajdu (1999) permitiram a avaliação da homologia das características morfológicas em *Mycale* Gray, 1867. Nas reconstruções filogenéticas de Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994) a presença de anisoquelas-I curvadas, e anisoquelas-III esporadas seriam sinapomorfias do clado formado por *Mycale s.s.* e *Grapelia (Gra)*. É interessante destacar que os autores dividiram *Grapelia* em dois grupos, cuja diferença reside no tipo de esqueleto ectossomal encontrado nestes grupos, sendo confuso no primeiro grupo, comparavelmente ao encontrado em *Mycale s.s.*, e reticulado e/ou com reticulações homoplásticas no segundo. Esses autores também indicam que a ausência de toxas é compartilhada por estes subgêneros, e uma vez que toxas também estão ausentes em *Arenochalina*, mas amplamente distribuídas em *Carmia*, *Aegogropila* e na família-irmã Hamachantidae, se levanta a questão se a ausência é uma característica derivada (*i.e.*, perda secundária).

A filogenia dos subgêneros de *Mycale* reconstruída por Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994) se tornou uma importante referência para a evolução do grupo, sendo utilizada como base para outros trabalhos que tiveram como foco a evolução de características em *Mycale*. Por exemplo, essa filogenia foi utilizada por Hajdu e colaboradores (1995) para discutir a significância filogenética de toxas similares à centrotílotes e micracantóxeas na evolução de *Mycale*, enquanto Carballo e Hajdu (1998) avaliaram diferentes hipóteses de evolução das micracantóxeas em Mycalidae com base na mesma filogenia. Para esses autores, toxas similares à centrotílotes e micracantóxeas constituiriam apomorfias distintas e independentemente adquiridas ao longo da evolução de Mycalidae, uma vez que são espículas

sinapomórficas para Haplosclerida e Poecilosclerida e sua ocorrência é muito esparsa entre os táxons.

Carballo e Hajdu (1998) postulam quatro hipóteses possíveis para a evolução das micracantóxeas em Mycalidae, assumindo a filogenia proposta por Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994): 1) origem única, incluindo diversas reversões independentes (perdas); 2) origem única, com reversões desconhecidas (*i.e.*, espécies que possuem micracantóxeas formariam um clado monofilético, o que implicaria na polifilia de *Aegogropila* e/ou *Carmia*); 3) duas ou mais origens independentes; 4) problemas na taxonomia (*i.e.*, origem única mais inclusiva, na qual micracantóxeas poderiam ocorrer em outros subgêneros também, tendo sido ignorados em descrições anteriores) (Figura 2.7). Contudo, as hipóteses 2 e 4 parecem ser mais plausíveis segundo análises posteriores (HAJDU, 1999; ver abaixo). Semelhantemente seriam as anisoquelas com projeções basais esporadas, que, a despeito de sua similaridade morfológica, poderiam também constituir aquisições independentes.

Por outro lado, Hajdu (1999), a partir de uma filogenia mais abrangente, arguiu que a ausência de esqueleto ectossomal em *Carmia* aparentemente seria uma perda secundária, ao contrário do postulado por Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994). Como argumentado por

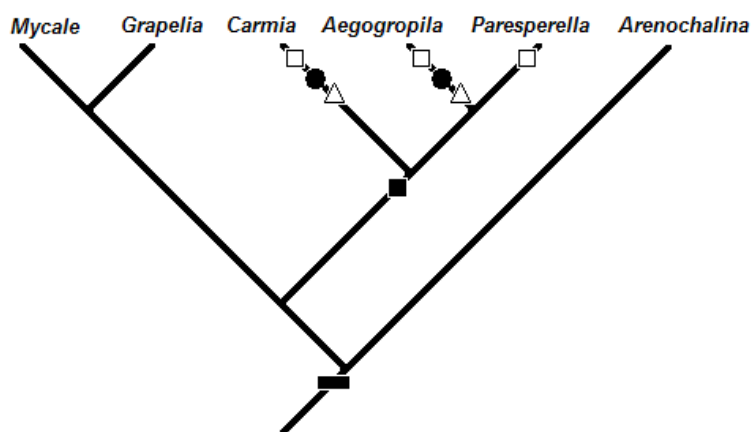


Figura 2.7. Hipóteses de evolução das micracantóxeas de Mycalidae segundo a filogenia proposta por Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994). Hipótese 1 (quadrado) – origem única, incluindo diversas reversões independentes (perdas). Hipótese 2 (círculo) – origem única, com reversões desconhecidas (*i.e.*, espécies que possuem micracantóxeas formariam um clado monofilético, o que implicaria na polifilia de *Aegogropila* e/ou *Carmia*). Hipótese 3 (triângulo) – duas ou mais origens independentes. Hipótese 4 (retângulo) – problemas na taxonomia (*i.e.*, origem única mais inclusiva, na qual micracantóxeas poderiam ocorrer em outros subgêneros também, tendo sido ignorados em descrições anteriores). Símbolos fechados representam homologias. Símbolos abertos representam homoplasias. Redesenhado de Carballo e Hajdu (1998).



Hajdu e van Soest (1996), algumas perdas de características seriam mais facilmente alcançadas, e, reciprocamente, seria esperado que também pudessem ocorrer evoluções paralelas dessas características. Hajdu e Rützler (1998) reportaram uma *M. (Aegogropila)* ? que apresentava tanto presença quanto ausência de esqueleto ectossomal, o que, para Hajdu (1999) suporta a hipótese que tal estrutura ectossomal possui baixo valor adaptativo. A hipótese de que o esqueleto ectossomal poderia ser muitas vezes perdido entre linhagens também já foi postulada por Hajdu e colaboradores (1995), que questionam se o subgênero *Carmia* não poderia ser um grupo artificial abrangendo linhagens evolutivas convergentes. Hajdu (1999) também argumenta que muitas espécies atualmente assinaladas à *Carmia* poderiam indicar uma alocação apropriada de vários grupos monofiléticos distintos, relacionadas a grupamentos de espécies que portariam especializações ectossomais. Nestes casos, esses possíveis grupos que seriam formados por ausência/perda de especialização ectossomal não deveriam formar um clado monofilético, como já previsto pela relação inferida entre *Arenochalina* e *Carmia*.

#### 2.1.5 Objetivos

Este capítulo possui como objetivo principal:

- Avaliar a evolução das características morfológicas do gênero *Mycale*, Gray, 1867 tendo como base hipóteses filogenéticas obtidas no capítulo anterior por meio de dados moleculares.

Este possui, ainda, os seguinte objetivos específicos:

- Determinar limites na variação morfológica das anisoquetas tipo I por meio de análises morfométricas;
- Estimar o padrão evolutivo das dimensões dos principais tipos espiculares de *Mycale*;
- Reconstruir as características morfológicas ancestrais das espécies de *Mycale* compreendidas nas hipóteses filogenéticas aceitas.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Tabulação dos dados morfológicos

As espécies de *Mycale* estudadas por meio de dados moleculares (Capítulo 1) foram revisadas na literatura a fim de se obter uma descrição abrangente de suas características morfológicas. Com o auxílio do programa Xper2<sup>®</sup>, uma matriz de descritores morfológicos foi elaborada. A seguir, cada espécie teve seus dados tabulados considerando o máximo de informação disponível na literatura. A estrutura dos dados correspondentes aos descritores morfológicos criada para tabular as informações das espécies de *Mycale*, assim como a literatura revisada de cada espécie, pode ser vista no Apêndice F. Esta considerou que cada característica qualitativa apresentasse diferentes estados polimórficos, tentando sempre otimizar a matriz de forma a minimizar descritores ambíguos ou com alta sobreposição, e as características quantitativas observaram os valores reportados em todos os trabalhos utilizados a fim de gerar uma média para o táxon. Devido à heterogeneidade na descrição das espécies utilizadas, as quais datam deste o século XIX, era esperado que a tabela resultante apresentasse muitas lacunas. Contudo, certas características, tipicamente utilizadas na taxonomia do gênero, estavam amplamente disponíveis, e estas, prioritariamente, foram utilizadas nas análises subsequentes. Os termos utilizados na descrição das espécies, também sujeitos à grande variação, foram padronizados, e, na medida do possível, foram utilizados aqueles conceituados por Boury-Esnault e Rützler (1997).

A partir da tabulação dos dados, estes foram empregados na elaboração de uma matriz para fim de análise a partir de reconstrução de estados ancestrais por parcimônia. Os estados de cada característica foram definidos por valores de zero a nove, dependendo do número de estados da mesma. As características quantitativas foram definidas em classes de intervalo regular, de acordo com a sua variabilidade. Nesta matriz, foram utilizadas somente as características com boas descrições ou consideradas importantes para a taxonomia do grupo na literatura (ver abaixo). As características quantitativas, sobretudo mensurações de espículas, foram tabelas em planilha eletrônica para fins de análise estatística.

### 2.2.2 Hipóteses filogenéticas

As análises evolutivas das características morfológicas foram realizadas com base nas topologias obtidas a partir de dados moleculares (ver Capítulo 1). A hipótese filogenética aceita para cada análise subsequente se baseou em uma topologia obtida em dois passos: o

primeiro definindo uma topologia de base, determinada pelo resultado das relações evolutivas obtidas com altos valores de suporte por meio dos dados combinados de 16S e 28; e o segundo incluindo táxons não representados anteriormente, cujas posições destes no cladograma derivam das relações filogenéticas obtidas independentemente entre os diferentes marcadores, conforme o caso, desde que apresentassem alto suporte e não fossem conflitantes entre si. As informações conflitantes entre os marcadores foram definidas por politomias de base. Em seguida, de acordo com a amostragem de espécies de cada análise a seguir, a topologia das hipóteses filogenéticas foi redesenhada de forma a remover os táxons faltosos, mas conservando as relações creditadas como válidas. As topologias utilizadas nas análises subsequentes são mostradas conforme o caso.

### 2.2.3 Morfometria de anisoquelas tipo I

A fim de determinar limites na variação das anisoquelas tipo I encontradas em *Mycale*, foi realizada uma análise morfométrica destas espículas. Com base nas ilustrações disponíveis na literatura, foram realizadas mensurações de medidas lineares e angulares, totalizando onze parâmetros morfométricos, a saber: o comprimento total da anisoquela (a); o comprimento da cabeça da anisoquela (b); o comprimento do pé da anisoquela (c); o ângulo de abertura entre as alas laterais da cabeça da anisoquela (e); o ângulo de abertura entre as alas laterais do pé da anisoquela (f); o ângulo de abertura da ala frontal da cabeça em relação ao eixo da anisoquela (g); o ângulo de curvatura da cabeça em relação ao eixo da anisoquela (h); o ângulo de curvatura do pé em relação ao eixo da anisoquela (i); o ângulo de abertura da ala frontal do pé em relação ao eixo da anisoquela (j); a distância entre o centro da haste, na sua porção mediana, e o eixo da anisoquela (k); o ângulo de abertura entre as alas frontal e lateral da cabeça da anisoquela (l) (Figura 2.8).

O eixo da anisoquela foi definido como a reta imaginária entre os pontos da porção mediana na altura da base da cabeça e pé da anisoquela. Os ângulos foram medidos com base na reta tangente ao ponto mediano do arco formado pelas retas imaginárias traçadas pontos em posições definidas, como o ápice da cabeça e do pé, as bases da cabeça e do pé, e as extremidades das alas frontais e laterais, a base das alas frontais e laterais do pé, e a porção mediana da haste entre a base e a cabeça da anisoquela.

Para reduzir o efeito do tamanho nas comparações, o comprimento da cabeça (b) e do pé (c) foram convertidos em proporções em relação ao comprimento total da espícula (a) em porcentagem, respectivamente,  $(b/a)*100$  e  $(c/a)*100$ . Da mesma forma, a distância entre o

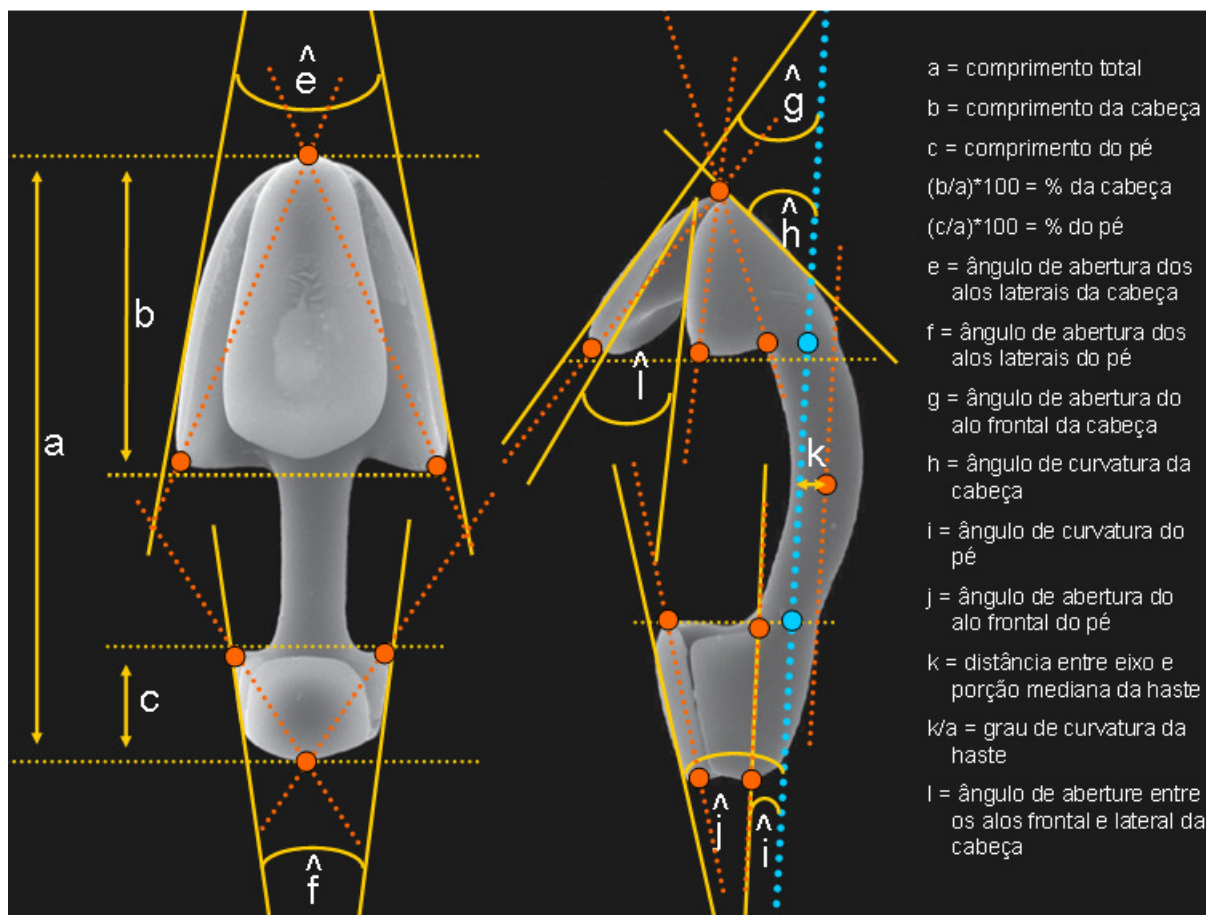


Figura 2.8. Esquema das mensurações realizadas para análise morfométrica das anisoqueias tipo I encontradas no gênero *Mycale* Gray, 1867. À esquerda, vista frontal da anisoqueia I de *Mycale* (*Aegogropila*) *escarlatei*, e, no centro, vista lateral da anisoqueia tipo I de *Mycale* (*Mycale*) *alagoana*, mostrando os pontos de referência, as retas imaginárias e as medidas realizadas. À esquerda se encontram descritos os parâmetros morfométricos (a-l), assim como suas respectivas proporções. Ver o texto para mais detalhes. Micrografias eletrônicas por varredura (MEV) das anisoqueias retiradas de Hajdu e Teixeira (2011) e Cedro e colaboradores (2012), respectivamente.

eixo e a porção mediana da haste (k) utilizada em relação ao tamanho total, onde k/a foi denominado como grau de curvatura da haste.

Uma vez que as medidas acima dependem tanto da vista frontal quanto lateral da anisoqueia, as espécies que não apresentaram ilustrações disponíveis de ambas as vistas não foram analisadas. Devido às ilustrações e micrografias disponíveis variarem em relação a posição das espículas no espaço, podendo estar rotacionadas ligeiramente em torno do seu eixo, as medidas angulares foram classificadas em intervalos regulares a cada 5° a fim de minimizar potenciais erros.

Após a tabulação dos dados, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA, *principal component analysis*) para determinar grupos entre as espécies com base na

totalidade das variáveis morfométricas obtidas das anisoquelas tipo I. A PCA foi realizada com três fatores e valor *eigen* mínimo de 1,0 utilizando o programa STATISTICA® 7. A seguir, foi calculada a distância euclidiana entre cada espécie com base nos fatores gerados utilizando o programa MATLAB®, e estes foram utilizados para produzir um agrupamento entre as mesmas por meio do algoritmo UPGMA.

#### 2.2.4 Morfometria comparativa das espículas

Foram avaliadas as relações morfométricas entre os principais tipos espiculares encontrados em *Mycale* ao longo de sua filogenia. Para tal, foram produzidos gráficos de dispersão entre o comprimento do subtilóstilo I (x: L) e a largura do subtilóstilo I (y: W), o comprimento da sigma I (y: S) e o comprimento da anisoquela I (y: A). Os pontos, correspondentes aos valores x e y de cada espécie, foram unidos por ramos utilizando o programa Mesquite v2.75 (MADDISON e MADDISON, 2011). As relações entre os táxons foram baseadas na hipótese filogenética mais abrangente para os táxons considerados na análise, e para facilitar a visualização dos cladogramas, grupos de A - I foram formados, como mostra a Figura 2.9. Por fim, foram estimadas regressões entre os fatores utilizando o programa STATISTICA® 7.

#### 2.2.5 Reconstrução das características ancestrais

Por meio da matriz de dados morfológicos tabulada (ver seção 2.2.1), foi realizada uma análise de reconstrução de estados ancestrais por parcimônia utilizando o programa Mesquite v2.75 (MADDISON e MADDISON, 2011). A hipótese filogenética assumida está retratada na Figura 2.9. Ainda, foram calculados os números observados (obs), mínimos (min) e máximos (max) de passos de cada característica ao longo da topologia, assim como os índices de consistência (CI, do inglês *consistency index*; = min / obs), retenção (RI, *retention index*; = (max - obs) / (max - min)), retenção redimensionado (RC, *rescaled consistency index*; = CI \* RI), homoplasia (HI, *homoplasy index*; = 1 - CI) e o ajuste de Goloboff (G-fit, *Goloboff's implied weights*; = k / [k + (max - obs)], onde k é uma constante arbitrária) utilizando o programa PAUP\*4 (SWOFFORD, 2003).

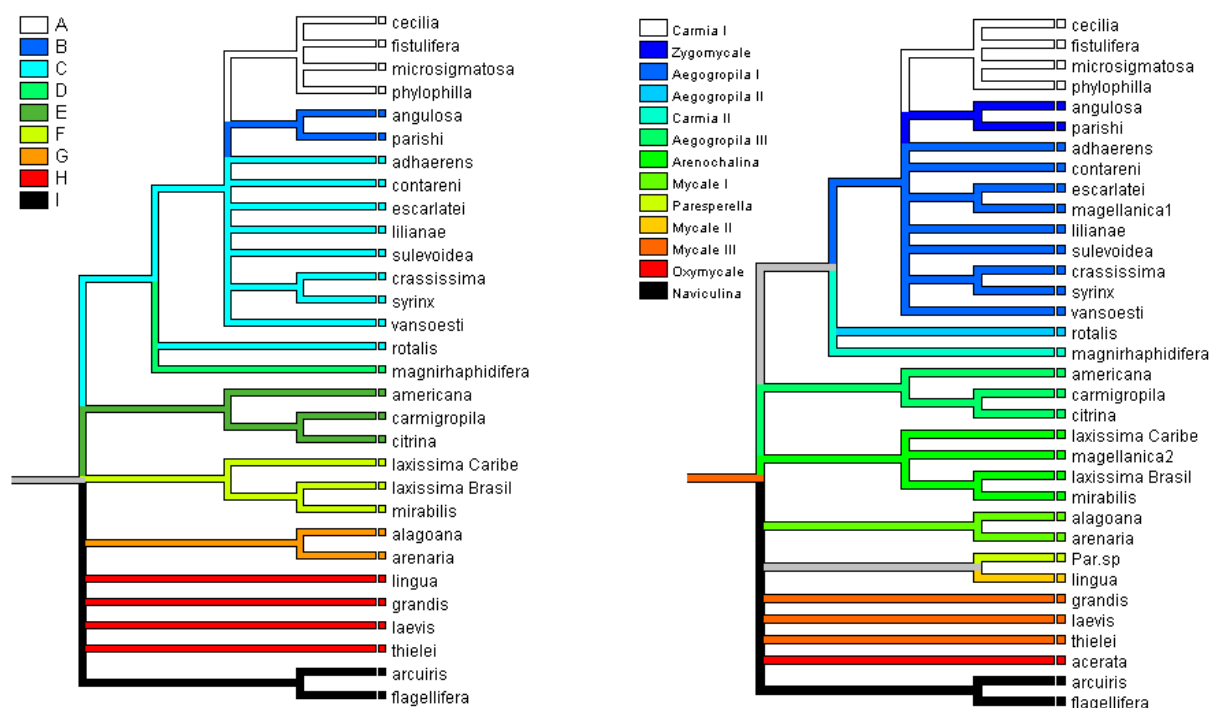


Figura 2.9. Cladogramas expressando as hipóteses filogenéticas de *Mycale* Gray, 1867 assumidas para a análise morfométrica comparativa das principais espículas encontradas no gênero (esquerda) e para a reconstrução de características ancestrais por parcimônia das características morfológicas (direita). Relações baseadas em marcadores moleculares, como discutido no texto. Os grupos compreendem clados mono- e parafiléticos para fins comparativos, definidos de A - I (esquerda) e pelo subgênero da maioria das espécies compreendidas (direita). Os táxons terminais considerados na análise são definidos por seus epítetos, e, quando o caso, por sua localidade. Ver texto para mais detalhes.

## 2.3 Resultados

No total, 32 espécies de *Mycale* tiveram suas características morfológicas revisadas em mais de 40 publicações. Um total de 170 características foram tentativamente tabeladas, porém, destas, a maior parte estava insuficientemente disponível ou reportada. As demais, após otimização das informações, resultaram em 30 características com alto grau de completude entre as espécies.

Os tamanhos médios das principais espículas de cada espécie podem ser vistos na Tabela 2.1. O comprimento médio do subtilóstilo I em *Mycale* foi de  $343,1 \pm 127 \mu\text{m}$ , sendo que a espécie com maior valor,  $800 \mu\text{m}$ , foi *M. (M.) lingua*, enquanto que a com menor,  $192 \mu\text{m}$ , foi *M. (M.) vansoesti*. A largura média do subtilóstilo I no gênero foi de  $7,9 \pm 3,5 \mu\text{m}$ , com *M. (M.) lingua* também apresentando o maior valor,  $19 \mu\text{m}$ , e o menor valor correspondente à *M. (C.) flagellifera*,  $2 \mu\text{m}$ . O comprimento da sigma I foi, em média no grupo, igual a  $56,0 \pm 21,9 \mu\text{m}$ , sendo que *M. (Aeg.) syrinx* apresentou os maiores valores,  $97,5 \mu\text{m}$ , enquanto que o menor,  $15,0 \mu\text{m}$ , foi encontrado em *M. (M.) thielei*. Por fim, o valor médio do comprimento da anisoquela I em *Mycale* foi igual a  $43,6 \pm 21,1 \mu\text{m}$ , com o maior valor encontrado em *M. (M.) grandis*,  $120 \mu\text{m}$ , e o menor em *M. (C.) microsigmatosa*,  $19,2 \mu\text{m}$ .

### 2.3.1 Morfometria de anisoquelas tipo I

Das espécies de *Mycale* revisadas, 16 apresentaram ilustrações de anisoquelas tipo I satisfatórias para obtenção de medidas relativas aos parâmetros morfométricos citados, embora cinco destas contem somente com desenhos disponíveis, e uma com uma micrografia de baixa resolução. Os valores dos parâmetros morfométricos obtidos podem ser encontrados na Tabela 2.2. *Mycale (M.) alagoana* apresentou menor proporção da cabeça em relação ao tamanho total da anisoquela (25 %), enquanto que *M. (C.) fistulifera* e *M. (Are.) mirabilis* apresentaram a maior (65 %). O ângulo de curvatura da cabeça em relação ao eixo foi menor em *M. (Aeg.) escarlataei* ( $0^\circ$ ) e maior em *M. (M.) arenaria* ( $35^\circ$ ). Já o menor ângulo de abertura da ala frontal foi encontrado em *M. (Are.) laxissima* ( $10^\circ$ ), e o maior em *arenaria* e *alagoana* ( $60^\circ$ ). Por sua vez, o ângulo de abertura entre as alas laterais da cabeça foi menor em *M. (Aeg.) carmigropila* e *M. (Aeg.) contarenii* ( $20^\circ$ ) e maior em *alagoana* ( $100^\circ$ ). O menor ângulo entre as alas frontal e lateral da cabeça foi encontrado também em *carmigropila* e *contarenii* ( $5^\circ$ ), já o maior em *arenaria* ( $40^\circ$ ). A menor proporção do pé em relação ao comprimento total foi encontrada em *M. (M.) laevis* (15 %), enquanto que a maior em *M. (M.)*

Tabela 2.1. Medidas das principais espículas encontradas no gênero *Mycale* Gray, 1867, das espécies analisadas neste trabalho. Para cada espécie, é reportado o comprimento (L) e largura (W) do subtilóstilo I e o tamanho da sigma I (S) e anisoquela I (A). Valores médios, medidos em  $\mu\text{m}$ , obtidos com base na literatura. Ver texto para mais detalhes.

| Espécie  | L   | W    | S    | A     |
|--|-----|------|------|-------|
| <i>M. (Aeg.) adhaerens</i>                                   | 300 | 7.0  | 61.2 | 40.4  |
| <i>M. (Aeg.) americana</i>                                   | 374 | 6.7  | 47.6 | 37.0  |
| <i>M. (Aeg.) carmigropila</i>                                | 303 | 6.0  | 57.3 | 38.4  |
| <i>M. (Aeg.) citrina</i>                                     | 410 | 8.7  | 78.0 | 48.0  |
| <i>M. (Aeg.) contarenii</i>                                  | 290 | 9.0  | 52.5 | 39.0  |
| <i>M. (Aeg.) crassissima</i>                                 | 385 | 8.5  | 40.0 | 52.0  |
| <i>M. (Aeg.) escarlatei</i>                                  | 294 | 7.6  | 66.0 | 39.6  |
| <i>M. (Aeg.) liliana</i>                                     | 255 | 5.3  | 85.0 | 40.2  |
| <i>M. (Aeg.) rotalis</i>                                     | 237 | 5.2  | 64.5 | 28.2  |
| <i>M. (Aeg.) sulevoidea</i>                                  | 310 | 9.0  | 80.0 | 48.0  |
| <i>M. (Aeg.) syrinx</i>                                      | 333 | 11.0 | 97.5 | 41.0  |
| <i>M. (Are.) laxissima</i> - Brasil                          | 265 | 6.3  | 80.0 | 27.5  |
| <i>M. (Are.) laxissima</i> - Caribe                          | 265 | 6.3  | 91.0 | 23.0  |
| <i>M. (Are.) mirabilis</i>                                   | 210 | 5.5  | 55.0 | 27.2  |
| <i>M. (C.) cecilia</i>                                       | 238 | 5.2  | 36.7 | 20.2  |
| <i>M. (C.) fistulifera</i>                                   | 250 | 2.0  | 35.0 | 23.0  |
| <i>M. (C.) magnirhaphidifera</i>                             | 287 | 4.7  | 45.0 | 33.5  |
| <i>M. (C.) microsigmatosa</i>                                | 250 | 4.5  | 33.0 | 19.2  |
| <i>M. (M.) alagoana</i>                                      | 440 | 12.7 | 65.0 | 63.6  |
| <i>M. (M.) arenaria</i>                                      | 441 | 11.5 | 35.0 | 58.4  |
| <i>M. (M.) grandis</i>                                       | 520 | 11.0 | 54.0 | 120.0 |
| <i>M. (M.) laevis</i>  | 464 | 12.3 | 41.0 | 72.0  |
| <i>M. (M.) lingua</i>  | 800 | 16.5 | 19.0 | 70.0  |
| <i>M. (M.) phylophilla</i>                                   | 242 | 6.0  | 42.5 | 21.0  |
| <i>M. (M.) thielei</i>                                       | 456 | 15.6 | 15.0 | 71.2  |
| <i>M. (M.) vansoesti</i> sensu Calcinai <i>et al.</i> , 2006 | 192 | 3.2  | 22.9 | 21.6  |
| <i>M. (N.) arcuiris</i>                                      | 353 | 6.1  | 50.0 | 39.0  |
| <i>M. (N.) flagellifera</i>                                  | 560 | 11.5 | 80.0 | 46.0  |
| <i>M. (Z.) angulosa</i>                                      | 294 | 5.7  | 69.8 | 47.5  |
| <i>M. (Z.) parishii</i>                                      | 275 | 7.5  | 80.0 | 52.0  |
| Média  | 343 | 7.9  | 56.0 | 43.6  |
| Desvio-padrão  | 127 | 3.5  | 21.9 | 21.1  |

*lingua* (35 %). O ângulo de curvatura do pé variou pouco entre as espécies, sendo de 0° na maioria destas, e de 5° em *laxissima* e *M. (Aeg.) americana*, e 10° em *arenaria*. O ângulo de abertura da ala frontal do pé foi menor em *laxissima* (0°), e maior em *M. (O.) acerata* (45°). Já o ângulo de abertura entre as alas laterais do pé foi maior em *laevis* (60°) e menor em *laxissima* e *fistulifera* (0°). O grau de curvatura da haste também variou pouco entre as espécies, com muitas delas apresentando hastes retas ( $k/a = 0,00$ ), mas algumas revelaram



graus de curvatura bem acentuados, como *alagoana* ( $k/a = 0.06$ ). Por fim, houve uma alta variação no comprimento total da anisoquela I, sendo que *laxissima* e *fistulifera* apresentaram a menor anisoquela (23  $\mu\text{m}$ ), enquanto que *acerata* revelou possuir a maior anisoquela de todas (105  $\mu\text{m}$ ).

A análise de componentes principais (PCA) revelou que o 1º fator da análise (autovalor = 11,812) corresponde a praticamente 73,8% da variação entre as espécies, enquanto que os 2º e 3º fatores (autovalor = 1,767 e 1,309) correspondem a 11,0 % e 8,2 %, respectivamente, sendo o restante derivado de outros fatores não incluídos no modelo. A dispersão entre os fatores 1 e 2 mostrou um completo isolamento de *alagoana* e *arenaria* em relação as demais espécies (dados não mostrados), mostrando que as espículas destas espécies apresentam uma grande divergência em seus valores. Contudo, para uma melhor resolução de divergências entre as espículas das outras espécies, foi preferível utilizar a fatoração gerada a partir dos fatores 2 e 3 (Figura 2.10.A). Nesta, é possível ainda distinguir o isolamento de *alagoana* e *arenaria* das demais espécies, contudo, é também possível observar um maior grau de separação entre as demais (o que antes não era possível de ser visualizado com clareza). De maneira mais clara, o gráfico de agrupamento reconstruído a partir das distâncias entre os fatores 2 e 3 (Figura 2.10.B) apresenta essa separação, onde quatro grupos de anisoquelas foram distinguidos com base nas suas similaridades. A anisoquela I forma A agrupa espículas pertencentes a *adhaerens*, *americana*, *carmigropila*, *contareni*, *escarlatei*, *arcuiris* e *mirabilis*. A anisoquela I forma B agrupa espículas de *magnirhaphidifera*, *laxissima* e *fistulifera*. A anisoquela I forma C agrupa *lingua*, *acerata* e *laevis*. E por fim, a anisoquela I forma D agrupa espículas pertencentes a *arenaria* e *alagoana*. A análise multivariada de significância (MTS) foi capaz de distinguir entre os grupos identificados acima ( $F = 4,885$ ;  $df = 33$ ;  $p = 0.021$ ), muito embora alguns parâmetros como % do pé, ângulo do pé com o eixo e ângulo de abertura da ala frontal do pé tenham sido incapazes de diferenciar os grupos, como mostrado nas análises univariadas (APÊNDICE G). O teste *post-hoc* de Bonferroni (APÊNDICE G) evidencia que a forma D se distingue das demais pela maioria dos parâmetros.

Já a forma A se distingue da B por apresentar maior ângulo de abertura entre as alas laterais do pé, e da forma C por possuir anisoquela bem menores em comprimento, muito embora a forma global seja bastante similar (Tabela 2.3; Figura 2.10.C). Por fim, a forma B se diferencia da C por apresentar valores menores em ambos parâmetros anteriormente citados.

Tabela 2.2. Medidas dos parâmetros morfométricos das anisoquelas tipo I de espécies de *Mycale*, Gray, 1867. As espécies cujos valores foram obtidos estão indicadas por seus epítetos. As espécies marcadas com @ e # foram as quais estavam disponíveis somente desenhos e micrografias de baixa resolução, respectivamente. Os parâmetros morfométricos foram: proporção da cabeça em relação ao comprimento total, em porcentagem ( $b/a*100$ ); ângulo de curvatura da cabeça (h); ângulo de abertura da ala frontal da cabeça (g); ângulo de abertura entre as alas laterais da cabeça (e); ângulo de abertura entre as alas frontal e lateral da cabeça (l); proporção do pé em relação ao comprimento total, em porcentagem ( $c/a*100$ ); ângulo de curvatura do pé (i); ângulo de abertura da ala frontal do pé (j); ângulo de abertura entre as alas laterais do pé (f); grau de curvatura da haste (k/a); comprimento total da anisoquela I (a). As unidades das medidas são indicadas conforme o caso. Ver texto para mais detalhes.

| Parâmetros       | Espécies         |                     |                  |                   |                |                               |                 |                               |                  |                          |                                 |               |                            |                             |                 |                              |
|------------------|------------------|---------------------|------------------|-------------------|----------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|------------------------------|
|                  | <i>adhaerens</i> | <i>carmigropila</i> | <i>contareni</i> | <i>escarlatei</i> | <i>liliana</i> | <i>mirabilis</i> <sup>#</sup> | <i>arcuiris</i> | <i>americana</i> <sup>@</sup> | <i>laxissima</i> | <i>magnirhaphidifera</i> | <i>fistulifera</i> <sup>@</sup> | <i>laevis</i> | <i>lingua</i> <sup>@</sup> | <i>acerata</i> <sup>@</sup> | <i>alagoana</i> | <i>arenaria</i> <sup>@</sup> |
| cabeça (%)       | 50               | 50                  | 60               | 50                | 60             | 65                            | 50              | 50                            | 45               | 50                       | 65                              | 40            | 40                         | 50                          | 25              | 30                           |
| h (°)            | 10               | 5                   | 5                | 0                 | 20             | 15                            | 10              | 15                            | 20               | 15                       | 20                              | 5             | 15                         | 20                          | 20              | 35                           |
| g (°)            | 25               | 20                  | 20               | 25                | 35             | 25                            | 20              | 30                            | 10               | 30                       | 25                              | 20            | 25                         | 30                          | 60              | 60                           |
| e (°)            | 25               | 20                  | 20               | 30                | 25             | 30                            | 30              | 35                            | 25               | 30                       | 25                              | 30            | 65                         | 45                          | 100             | 65                           |
| l (°)            | 10               | 5                   | 5                | 15                | 10             | 15                            | 20              | 10                            | 10               | 20                       | 15                              | 10            | 10                         | 10                          | 25              | 40                           |
| pé (%)           | 30               | 30                  | 25               | 20                | 20             | 25                            | 25              | 30                            | 30               | 20                       | 20                              | 15            | 35                         | 25                          | 25              | 30                           |
| i (°)            | 0                | 0                   | 0                | 0                 | 0              | 0                             | 0               | 5                             | 5                | 0                        | 0                               | 0             | 0                          | 0                           | 0               | 10                           |
| j (°)            | 25               | 20                  | 10               | 20                | 25             | 20                            | 15              | 20                            | 0                | 15                       | 10                              | 10            | 15                         | 45                          | 10              | 15                           |
| f (°)            | 30               | 25                  | 25               | 15                | 30             | 35                            | 30              | 40                            | 5                | 15                       | 5                               | 60            | 30                         | 40                          | 15              | 20                           |
| curvatura        | 0,00             | 0,00                | 0,01             | 0,00              | 0,00           | 0,00                          | 0,00            | 0,00                          | 0,00             | 0,01                     | 0,00                            | 0,01          | 0,01                       | 0,00                        | 0,06            | 0,05                         |
| comprimento (µm) | 40,0             | 38,4                | 39,0             | 39,6              | 40,2           | 27,5                          | 39,0            | 37,0                          | 23,0             | 33,5                     | 23,0                            | 72,0          | 70,0                       | 105,0                       | 36,6            | 28,4                         |

Tabela 2.3. Valores dos parâmetros morfométricos para as diferentes formas de anisoqueles tipo I de *Mycale*, Gray, 1867. As formas A - D foram determinadas por análise de componentes principais (PCA) seguida por análise de agrupamentos. Os parâmetros morfométricos foram: proporção da cabeça em relação ao comprimento total, em porcentagem ( $b/a*100$ ); ângulo de curvatura da cabeça (h); ângulo de abertura da ala frontal da cabeça (g); ângulo de abertura entre as alas laterais da cabeça (e); ângulo de abertura entre as alas frontal e lateral da cabeça (l); proporção do pé em relação ao comprimento total, em porcentagem ( $c/a*100$ ); ângulo de curvatura do pé (i); ângulo de abertura da ala frontal do pé (j); ângulo de abertura entre as alas laterais do pé (f); grau de curvatura da haste (k/a); comprimento total da anisoquela I (a). As unidades das medidas são indicadas conforme o caso. Ver texto para mais detalhes.

| Parâmetros       | A           | B           | C           | D           |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| cabeça (%)       | 54,4 ± 6,2  | 53,3 ± 10,4 | 43,3 ± 5,8  | 27,5 ± 3,5  |
| h (°)            | 10,0 ± 6,5  | 18,3 ± 2,9  | 13,3 ± 7,6  | 27,5 ± 10,6 |
| g (°)            | 25,0 ± 5,3  | 21,7 ± 10,4 | 25,0 ± 5,0  | 60,0 ± 0,0  |
| e (°)            | 26,9 ± 5,3  | 26,7 ± 2,9  | 46,7 ± 17,6 | 82,5 ± 24,7 |
| l (°)            | 11,3 ± 5,2  | 15,0 ± 5,0  | 10,0 ± 0,0  | 32,5 ± 10,6 |
| pé (%)           | 25,6 ± 4,2  | 23,3 ± 5,8  | 25,0 ± 10,0 | 27,5 ± 3,5  |
| i (°)            | 0,6 ± 1,8   | 1,7 ± 2,9   | 0,0 ± 0,0   | 5,0 ± 7,1   |
| j (°)            | 19,4 ± 5,0  | 8,3 ± 7,6   | 23,3 ± 18,9 | 12,5 ± 3,5  |
| f (°)            | 28,8 ± 7,4  | 8,3 ± 5,8   | 43,3 ± 15,3 | 17,5 ± 3,5  |
| curvatura        | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 |
| comprimento (µm) | 37,6 ± 4,2  | 26,5 ± 6,1  | 82,3 ± 19,7 | 32,5 ± 5,8  |

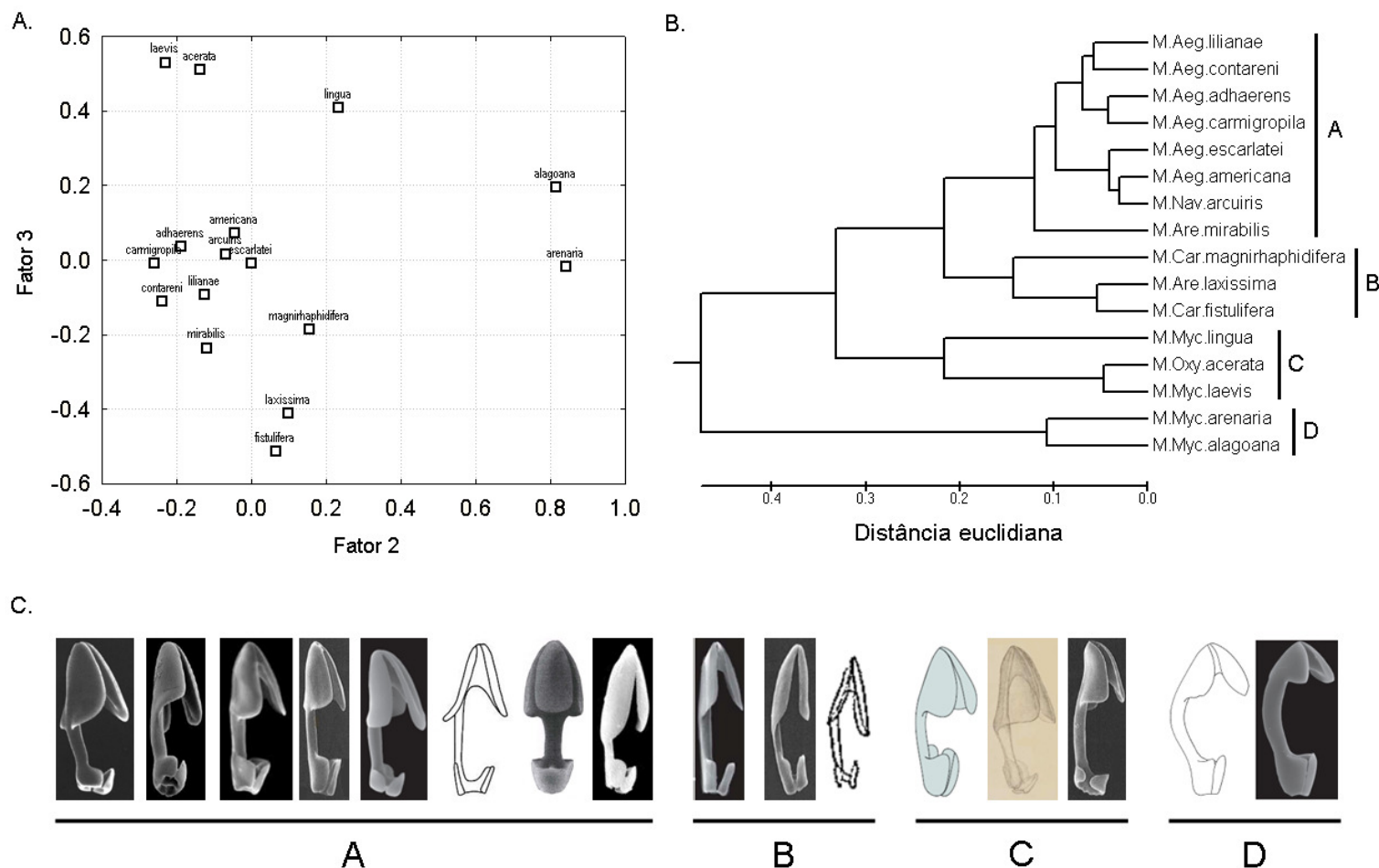


Figura 2.10. Análise morfométrica das anisothecas I encontradas em *Mycale* Gray, 1867. A. Gráfico de dispersão entre os valores dos fatores 2 e 3 obtidos pela análise de componente principal (PCA, *Principal component analysis*) a partir dos parâmetros morfométricos obtidos das anisothecas. B. Classificação das anisothecas I gerada por meio da distância euclidiana entre os táxons, de acordo com a dispersão dos fatores 2 e 3, por meio do algoritmo de UPGMA. C. Ilustrações das anisothecas I de cada táxon, cuja ordenação, da esquerda para a direita, segue a ordem, de cima para baixo, apresentada em B, e agrupadas de acordo com a classificação gerada. Ver texto para mais detalhes.

### 2.3.2 Morfometria comparativa das espículas

As correlações entre o comprimento dos subtilóstilos I (L) e a sua largura (W) mostrou seguir um modelo, cuja probabilidade foi significativa, onde espículas mais compridas tendem a ser igualmente mais largas, com alto grau de predição ( $W = -0,41 + 0,023 * L$ ;  $R^2 = 0,722$ ;  $p = 0,000$ ). Já a correlação entre L e o comprimento da sigma I (S) não apresentou um modelo definido, evidenciando que uma variável não apresenta relações com a outra ( $S = 69,183 - 0,039 * L$ ;  $R^2 = 0,050$ ;  $p = 0,234$ ). Por sua vez, a relação L e comprimento da anisoquela I indica que espécies que possuem subtilóstilos longos tendem a apresentar anisoquelas maiores ( $A = 2,708 + 0,119 * L$ ;  $R^2 = 0,517$ ;  $p = 0,000$ ).

A disposição dos ramos conectando os pontos correspondentes a interseção dos valores L e W das espécies revela que a maioria das ramificações entre os táxons ocorre ao longo da reta representativa do modelo testado (Figura 2.11). Por exemplo, os dois táxons do grupo I, *arcuiris*

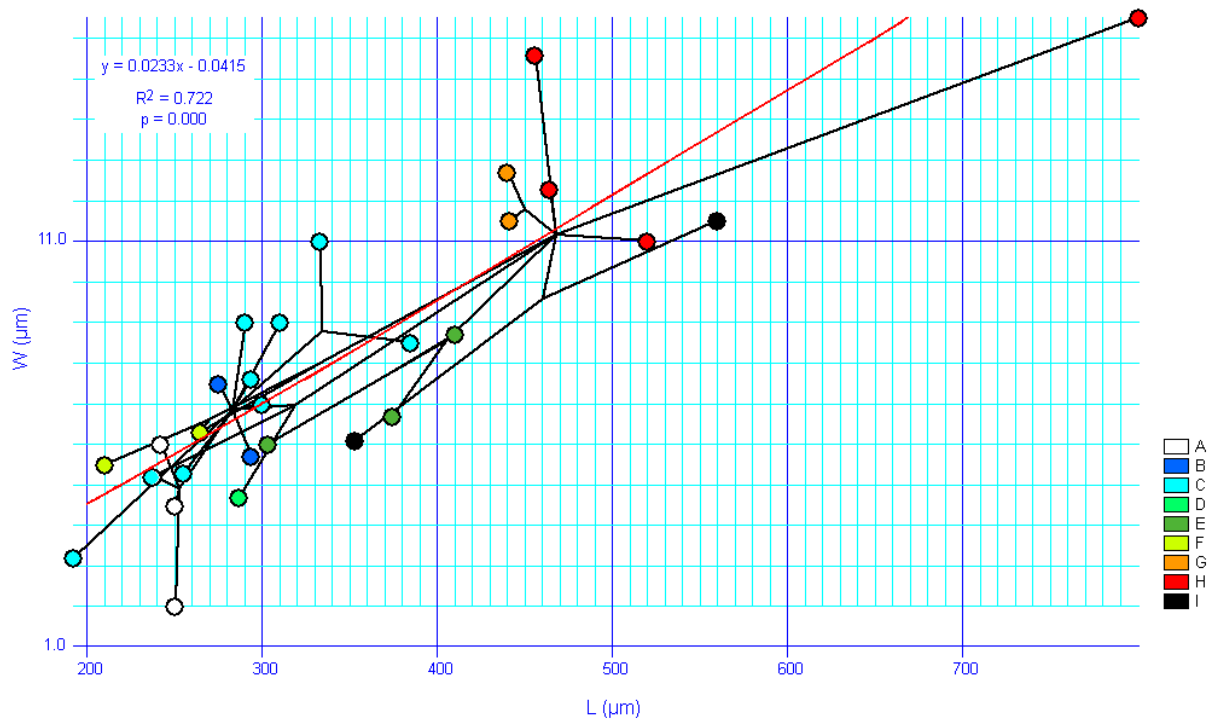


Figura 2.11. Gráfico de dispersão entre o comprimento do subtilóstilo I (L) e sua largura (W) das espécies de *Mycale* Gray, 1867, analisadas neste trabalho. Cada ponto corresponde a uma espécie, cujas cores representam os grupos identificados pela legenda. As linhas em preto conectam os táxons segundo as relações filogenéticas assumidas pela hipótese expressa na Figura 2.9. A reta em vermelho indica o modelo linear estimado, cuja fórmula, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e probabilidade ( $p$ ) estão indicados no canto superior esquerdo do gráfico. Ver texto para mais detalhes.

e *flagellifera*, embora apresentem valores bem divergentes de L e W, é possível observar que esta divergência ocorre ao longo, paralelamente, do esperado pelo modelo. Algo similar ocorre no grupo A, C e H, onde apenas *fistulifera*, *syrix* e *thielei*, respectivamente, se mostram claramente divergentes em oposição ao modelo.

Na relação L e S, onde não houve um modelo explícito sustentado estatisticamente, é possível observar uma alta dispersão entre os grupos (Figura 2.12). Contudo, mesmo dada a aparente ausência de estruturação, alguns táxons se mostraram mais divergentes do que outros, onde se destacam *syrix* e *vansoesti* (grupo C), *thielei* e, especialmente, *lingua* (H), e *flagellifera* (I). Contrariamente, o grupo A se mostrou relativamente homogêneo internamente, embora relativamente divergente das demais, tendendo a se aproximar da relação encontrada em *syrix*.

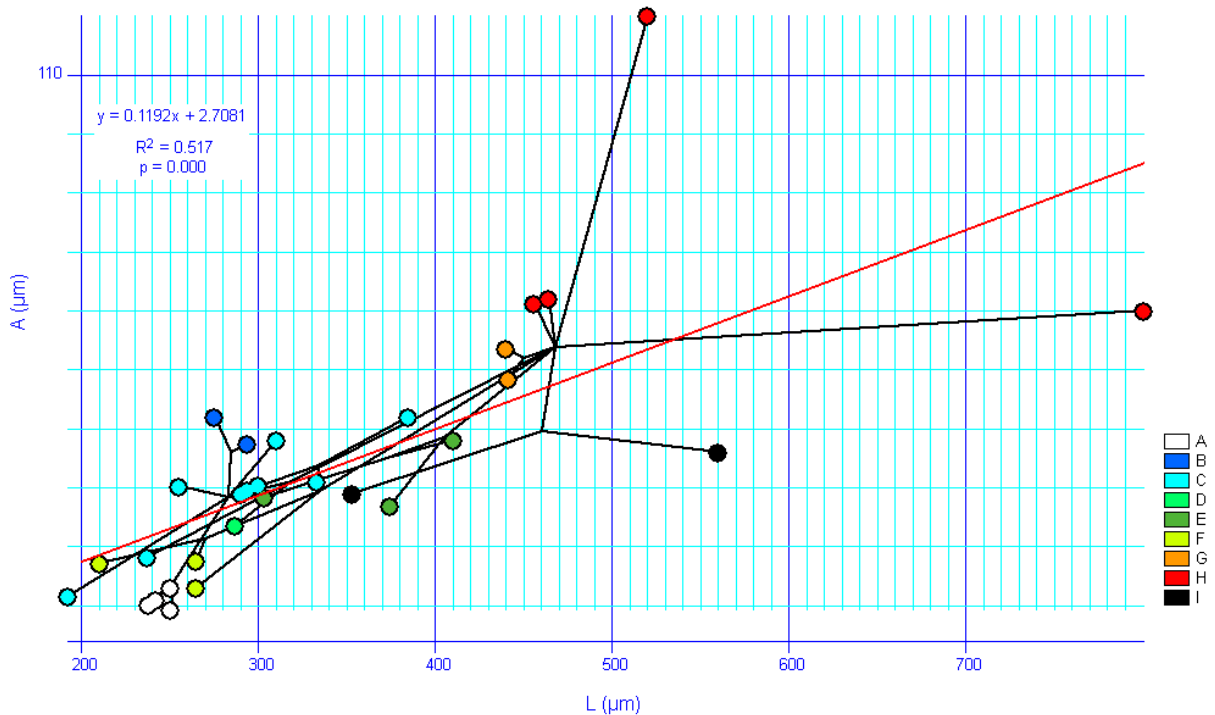


Figura 2.13. Gráfico de dispersão entre o comprimento do subtilóstilo I (L) e o comprimento da anisoquela I (A) das espécies de *Mycale* Gray, 1867, analisadas neste trabalho. Cada ponto corresponde a uma espécie, cujas cores representam os grupos identificados pela legenda. As linhas em preto conectam os táxons segundo as relações filogenéticas assumidas pela hipótese expressa na Figura 2.9. A reta em vermelho indica o modelo linear estimado, cuja fórmula, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e probabilidade (p) estão indicados no canto superior esquerdo do gráfico. Ver texto para mais detalhes.

Por fim, na correlação L e A, é possível verificar que a quase totalidade das ramificações entre os táxons tendem a seguir o modelo linear esperado (Figura 2.13). Ainda, a maioria dos grupos apresenta uma relativa coesão interna, sobretudo os grupos A, B e G, muito embora os grupos A e B apresentem uma ligeira divergência do modelo. O grupo I apresentou certa divergência interna, onde *flagellifera* se destaca de *arcuiris* ao apresentar valores muito superiores de L, o qual, por sua vez apresenta relações mais similares com a maioria dos demais táxons. O grupo H foi o que apresentou maior divergência, tanto interna quando do modelo, especialmente os táxons *grandis* e *lingua*, que se destacaram em direções alternadas para valores maiores de A e L, respectivamente, ao contrário dos demais táxons do grupo, *laevis* e *thielei*, que se mostraram relativamente similares nesta relação.

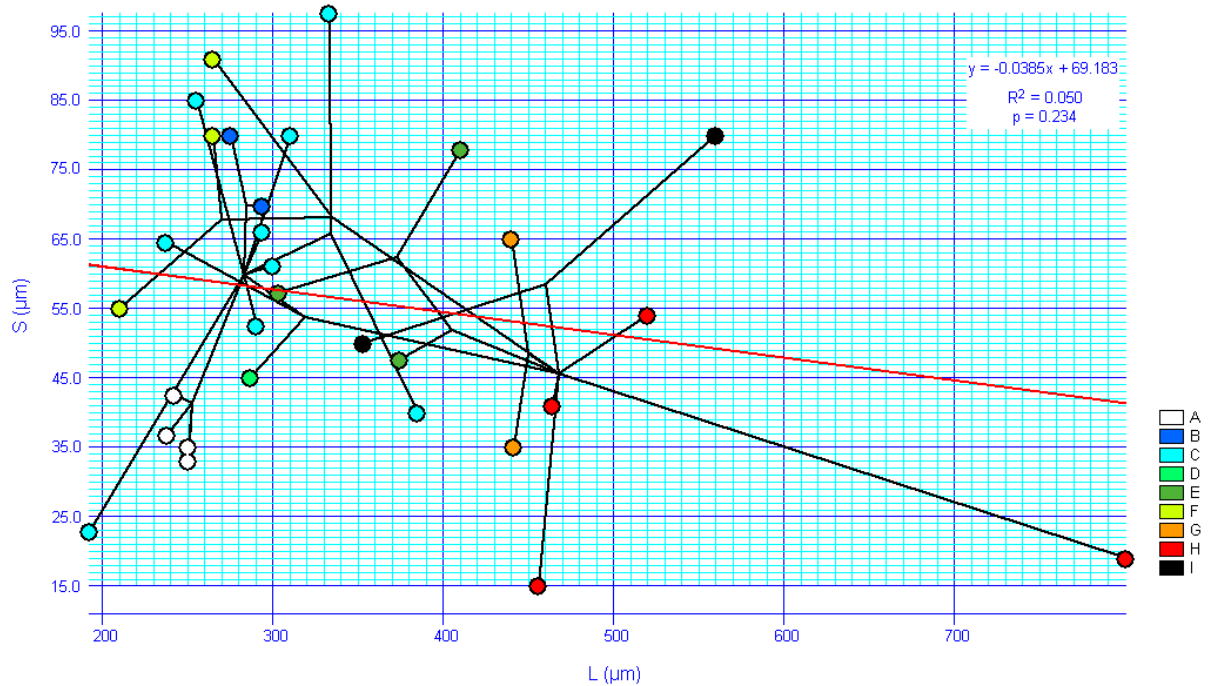


Figura 2.12. Gráfico de dispersão entre o comprimento do subtilóstilo I (L) e o comprimento da sigma I (S) das espécies de *Mycale* Gray, 1867, analisadas neste trabalho. Cada ponto corresponde a uma espécie, cujas cores representam os grupos identificados pela legenda. As linhas em preto conectam os táxons segundo as relações filogenéticas assumidas pela hipótese expressa na Figura 2.9. A reta em vermelho indica o modelo linear estimado, cuja fórmula, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e probabilidade (p) estão indicados no canto superior direito do gráfico. Ver texto para mais detalhes.

### 2.3.3 Reconstrução das características ancestrais

A matriz resultante da tabulação dos dados morfológicas por ser vista na Tabela 2.4. As referências, por espécie, utilizadas para esta revisão podem ser encontradas no Apêndice F. As características revisadas, que foram subsequentemente utilizadas, e os estados de cada uma, foram:

- Característica 1. Forma de crescimento:** (0) incrustante; (1) lobada; (2) tubular; (3) ereta ramificada; (4) maciça.
- Característica 2. Superfície:** (0) híspida; (1) lisa; (2) conulosa; (3) fistulosa; (4) sulcada; (5) rugosa; (6) espinada; (7) poros sulcados.
- Característica 3. Consistência:** (0) frágil; (1) macia; (2) compressível; (3) firme; (4) resiliente.
- Característica 4. Coloração:** (0) azul; (1) laranja; (2) roxo; (3) amarelo; (4) vermelho; (5) verde; (6) rosa; (7) bege; (8) marrom; (9) branco.
- Característica 5. Canais subectossomais:** (0) não-visível; (1) visível.
- Característica 6. Exudação de muco:** (0) ausente; (1) presente.
- Característica 7. Esqueleto ectossomal:** (0) não-especializado; (1) especialização tangencial reticulada; (2) confuso;
- Característica 8. Arranjo da reticulação do esqueleto ectossomal:** (0) triangular; (1) retangular; (2) poligonal.
- Característica 9. Esqueleto coanossomal:** (0) plumoso; (1) plumoreticulado; (2) reticulado.
- Característica 10. Tratos esqueléticos:** (0) multispicular; (1) paucispicular.
- Característica 11. Subtilóstilos:** (0) ausente; (1) em uma categoria de tamanho; (2) em duas categorias de tamanho.
- Característica 12. Forma do subtilóstilo I:** (0) delgado; (1) robusto.
- Característica 13. Comprimento do subtilóstilo I:** (0) entre 100 - 200  $\mu\text{m}$ ; (1) entre 200 - 300  $\mu\text{m}$ ; (2) entre 300 - 400  $\mu\text{m}$ ; (3) entre 400 - 500  $\mu\text{m}$ ; (4) 500  $\mu\text{m}$  ou mais.
- Característica 14. Largura do subtilóstilo I:** (0) entre 2 - 6  $\mu\text{m}$ ; (1) entre 6 - 10  $\mu\text{m}$ ; (2) entre 10 - 14  $\mu\text{m}$ ; (3) 14  $\mu\text{m}$  ou mais.
- Característica 15. Óxeas:** (0) ausente; (1) presente.



- Característica 16. Ráfides:** (0) ausente; (1) retas; (2) sinuosas.
- Característica 17. Isoquelas:** (0) ausente; (1) presente.
- Característica 18. Sigmas:** (0) ausente; (1) em uma categoria de tamanho; (2) em duas categorias de tamanho; (3) em três categorias de tamanho.
- Característica 19. Tamanho da sigma I:** (0) até 20  $\mu\text{m}$ ; (1) entre 20 - 40  $\mu\text{m}$ ; (2) entre 40 - 60  $\mu\text{m}$ ; (3) entre 60 - 80  $\mu\text{m}$ ; (4) 80  $\mu\text{m}$  ou mais.
- Característica 20. Toxas:** (0) ausente; (1) em uma categoria de tamanho; (2) em duas categorias de tamanho; (3) em uma categoria de tamanho formando toxodragmatas.
- Característica 21. Microcontóxeas:** (0) ausente; (1) presente.
- Característica 22. Micróxeas:** (0) ausente; (1) presente.
- Característica 23. Anisoquelas:** (0) em uma categoria de tamanho; (1) em duas categorias de tamanho; (2) em três categorias de tamanho.
- Característica 24. Forma da anisoquela I:** (0) forma A; (1) forma B; (2) forma C; (3) forma D.
- Característica 25. Detalhes da anisoquela I:** (0) nenhum; (1) foice ondulada; (2) pé com poro redondo; (3) pé não fusionado; (4) esporão digitiforme na ala frontal.
- Característica 26. Rosetas:** (0) ausente; (1) presente.
- Característica 27. Forma da anisoquela II:** (0) forma A; (1) forma D; (2) forma B; (3) naviculiqela; (4) anisoquela parecida com sigma, com alas curtos.
- Característica 28. Detalhes da anisoquela II:** (0) nenhum; (1) pé com poro redondo; (2) esporão digitiforme na ala frontal; (3) esporão na base do pé.
- Característica 29. Forma da anisoquela III:** (0) forma A; (1) forma B; (3) naviculiqela.
- Característica 30. Detalhes da anisoquela III:** (0) nenhum; (1) esporão digitiforme na ala frontal; (2) esporão na base do pé.

A partir das reconstruções de estados ancestrais (Figuras 2.14-17) é possível observar que a maior parte das características morfológicas apresentou um alto grau de homoplasia ao longo da topologia estabelecido por meio de dados moleculares. O grau de homoplasia de cada

característica, dada a hipótese filogenética aceita, pode ser visto de maneira mais evidente na Tabela 2.5.

As características que se mostraram mais homoplásticas, dado os valores do índice de retenção, foram a forma do subtilóstilo I (não mostrado), a ocorrência de micracantóxeas e micróxeas (Figura 2.16.F) e a forma da anisoquela III (não mostrado) (RI = 0,00). Por outro lado, as características com maior grau de homologia, segundo o mesmo critério, foram, a organização do esqueleto coanossomal (Figura 2.15.B), subtilóstilos (Figura 2.16.A) e isoquelas (Figura 2.15.E) (RI = 1,00), e, por se tratar de uma autapomorfia na árvore, a ocorrência de óxeas (não mostrado, mas ver Figura 2.16.A). Algumas outras características se destacam nas reconstruções, apresentando um baixo grau de homoplasia, sendo compartilhadas por alguns clados, como, por exemplo, a exudação de muco (Figura 2.14.F; RI = 0,67) e a visibilidade dos canais subectossomais (Figura 2.14.E; RI = 0,60). Sendo que, a última, resultou em uma associação significativa com a forma de crescimento incrustante ( $\chi^2 = 3,882$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,049$ )\*, mesmo que esta tenha apresentado um alto grau de homoplasia (RI = 0,33). Por fim, algumas outras características, embora apresentando um alto grau de homoplasia (RI = 0,47), se mostraram relativamente congruentes com certos clados da topologia utilizada, como a ocorrência de sigmas (Figura 2.16.D) e anisoquelas (Figura 2.17.A).

---

\* Dada a visibilidade (V) ou não (N) dos canais subectossomais e a ocorrência de formas de crescimento incrustantes (E) e outras não-incrustantes (O), é possível determinar uma tabela de contingência onde: VE = 14 spp.; VO = 3 spp.; NE = 8 spp.; e NO = 8 spp. Esta resulta em uma associação estatisticamente significativa entre a visibilidade dos canais subectossomais e a forma de crescimento incrustante para as espécies de *Mycale*.



|     |                     |     |    |      |       |   |   |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----|---------------------|-----|----|------|-------|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Myc | <i>phylophilla</i>  | 0   | 1  | 1    | 1     | 1 | 0 | 0 | -   | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | - | - | - |
| Myc | <i>thielei</i>      | 2   | 1  | 3    | 37    | 0 | 0 | 2 | -   | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Myc | <i>vansoesti</i>    | 2   | 4  | 03   | 9     | 1 | 0 | 2 | -   | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 | 4 | 0 | - | - |
| Nav | <i>arcuris</i>      | 0   | 1  | 0123 | 1579  | 1 | 0 | 1 | 0   | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 3 | 0 | - | - |
| Nav | <i>flagellifera</i> | 0   | ?  | ?    | 15    | 1 | 0 | 1 | ?   | 0 | 1 | 1 | 0 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | ? | 0 | 3 | ? | 2 | ? |
| Oxy | <i>acerata</i>      | 24  | 07 | 1    | 47    | 0 | 0 | 1 | 0   | 1 | 0 | 0 | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 | - | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 4 | 1 | 0 | 2 | - | - |
| Par | <i>sp.citrina</i>   | 0   | 01 | 01   | 3     | 1 | ? | 1 | ?   | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | ? | 0 | 1 | - | - |
| Zyg | <i>angulosa</i>     | 03  | 35 | 1    | 02389 | 0 | 0 | 1 | 0   | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | - |
| Zyg | <i>parishi</i>      | 034 | 12 | 23   | 278   | 0 | 0 | 1 | 012 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 4 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | - |

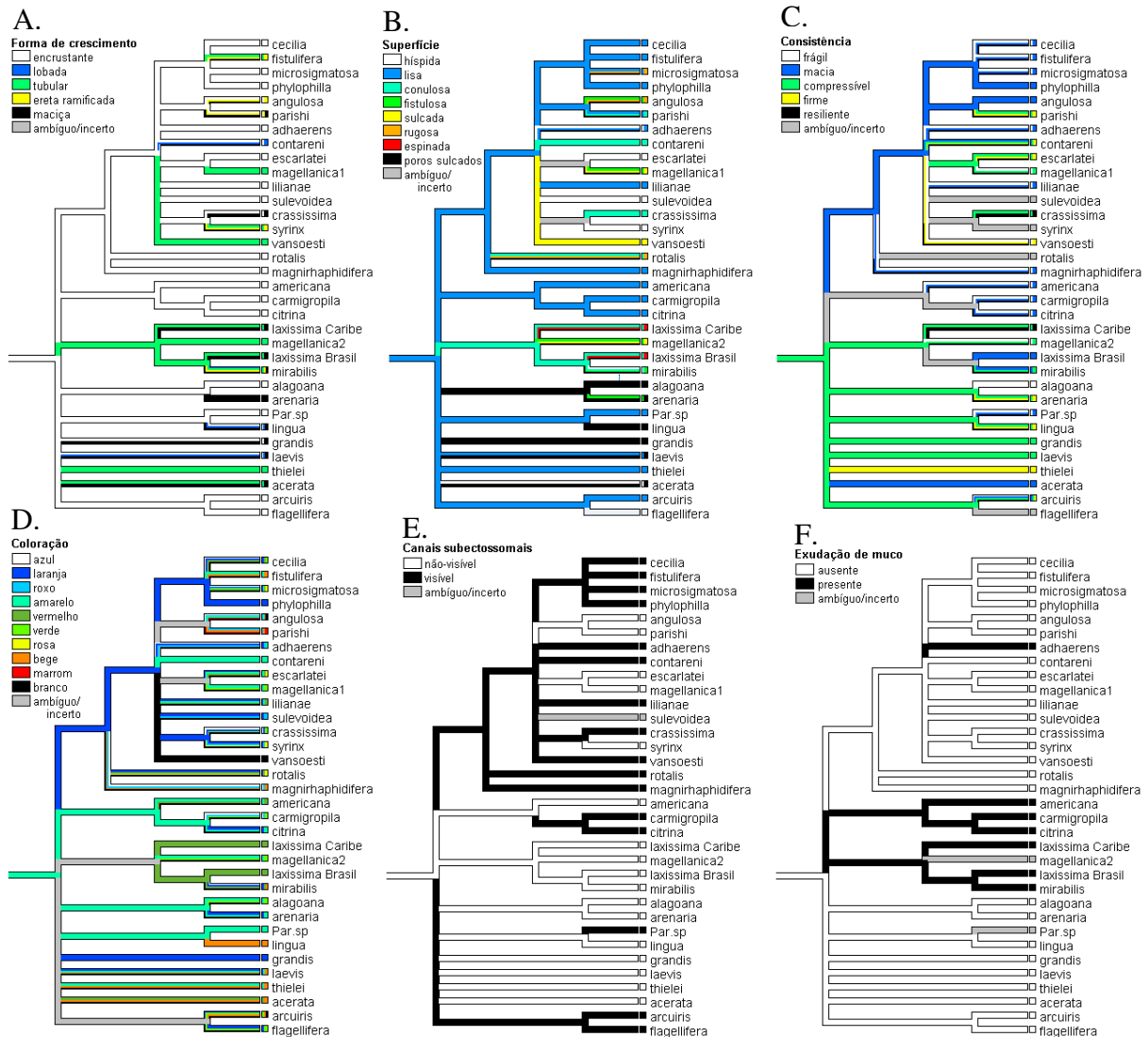


Figura 2.14. Evolução das características morfológicas de *Mycale* Gray, 1867 determinada pela reconstrução de estados ancestrais por parcimônia. As características reconstruídas, forma de crescimento (A), superfície (B), consistência (C), coloração (D), canais ectossomais (E) e exudação de muco (F), e seus estados (conforme legenda) são descritos no texto, e atribuídas às espécies conforme a matriz na Tabela 2.4. Relações baseadas em marcadores moleculares como discutido no texto. Os táxons terminais considerados na análise são definidos por seus epítetos, e, quando o caso, por sua localidade. Ver texto para mais detalhes.

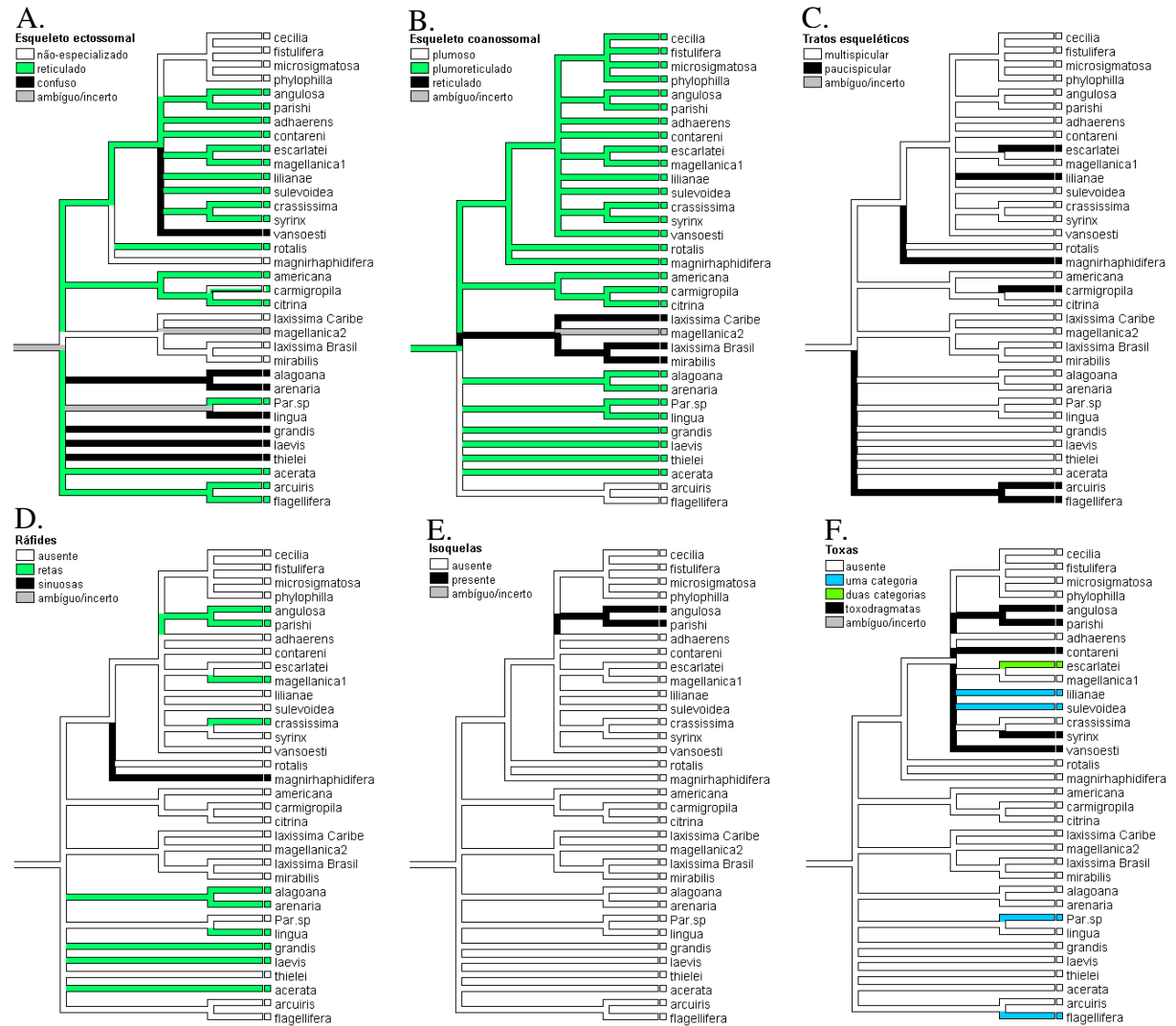


Figura 2.15. Evolução das características morfológicas de *Mycale* Gray, 1867 determinada pela reconstrução de estados ancestrais por parcimônia. As características reconstruídas, esqueleto ectossomal (A), esqueleto coanossomal (B), tratos esqueléticos (C), ráfides (D), isoquelas (E) e toxas (F), e seus estados (conforme legenda) são descritos no texto, e atribuídas às espécies conforme a matriz na Tabela 2.4. Relações baseadas em marcadores moleculares como discutido no texto. Os táxons terminais considerados na análise são definidos por seus epítetos, e, quando o caso, por sua localidade. Ver texto para mais detalhes.

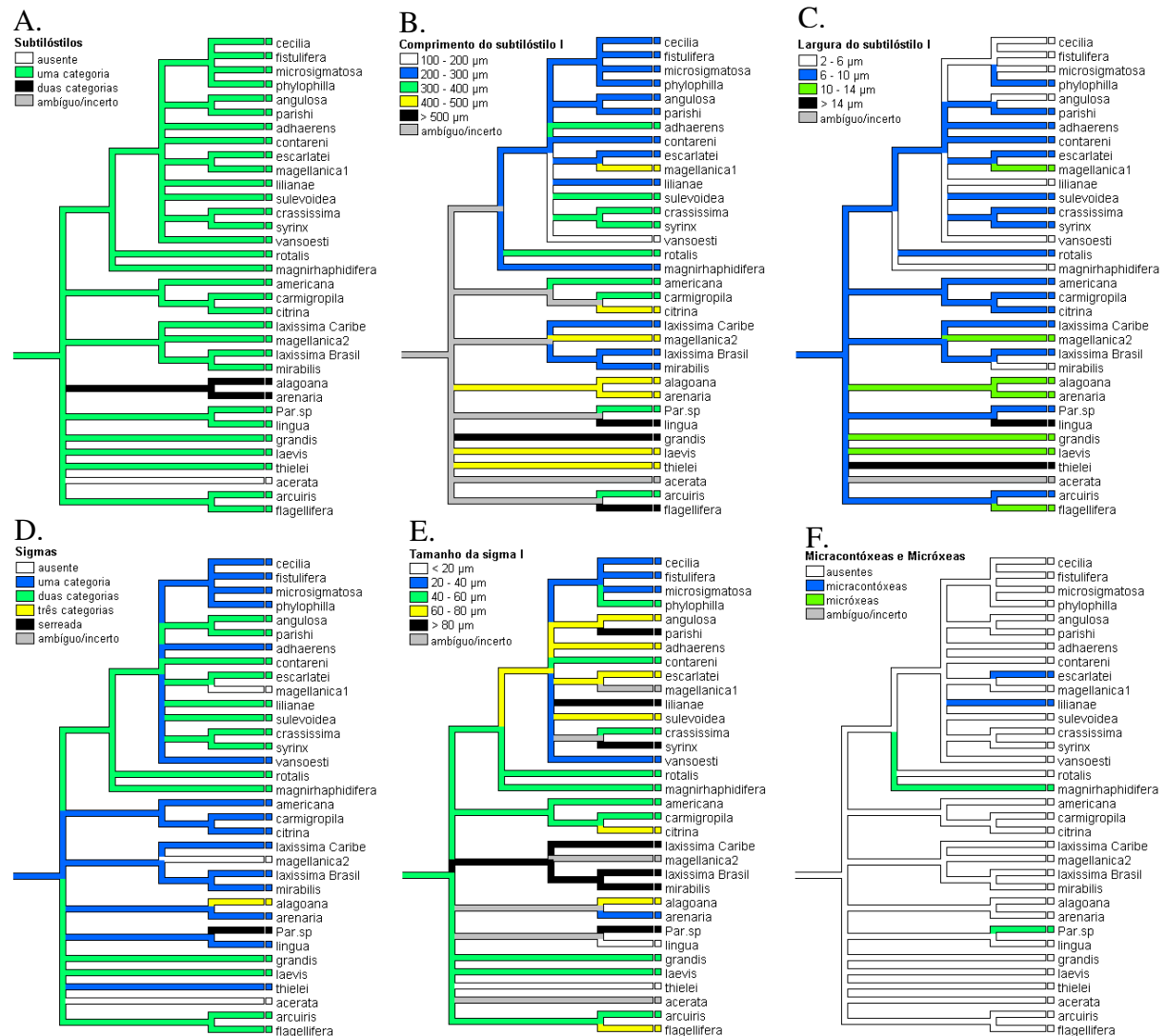


Figura 2.16. Evolução das características morfológicas de *Mycale* Gray, 1867 determinada pela reconstrução de estados ancestrais por parcimônia. As características reconstruídas, subtilóstilos (A), comprimento do subtilóstilo I (B), largura do subtilóstilo I (C), sigmas (D), tamanho da sigma I (E) e micracantóxeas e micróxeas (F), e seus estados (conforme legenda) são descritos no texto, e atribuídas às espécies conforme a matriz na Tabela 2.4. Relações baseadas em marcadores moleculares como discutido no texto. Os táxons terminais considerados na análise são definidos por seus epítetos, e, quando o caso, por sua localidade. Ver texto para mais detalhes.

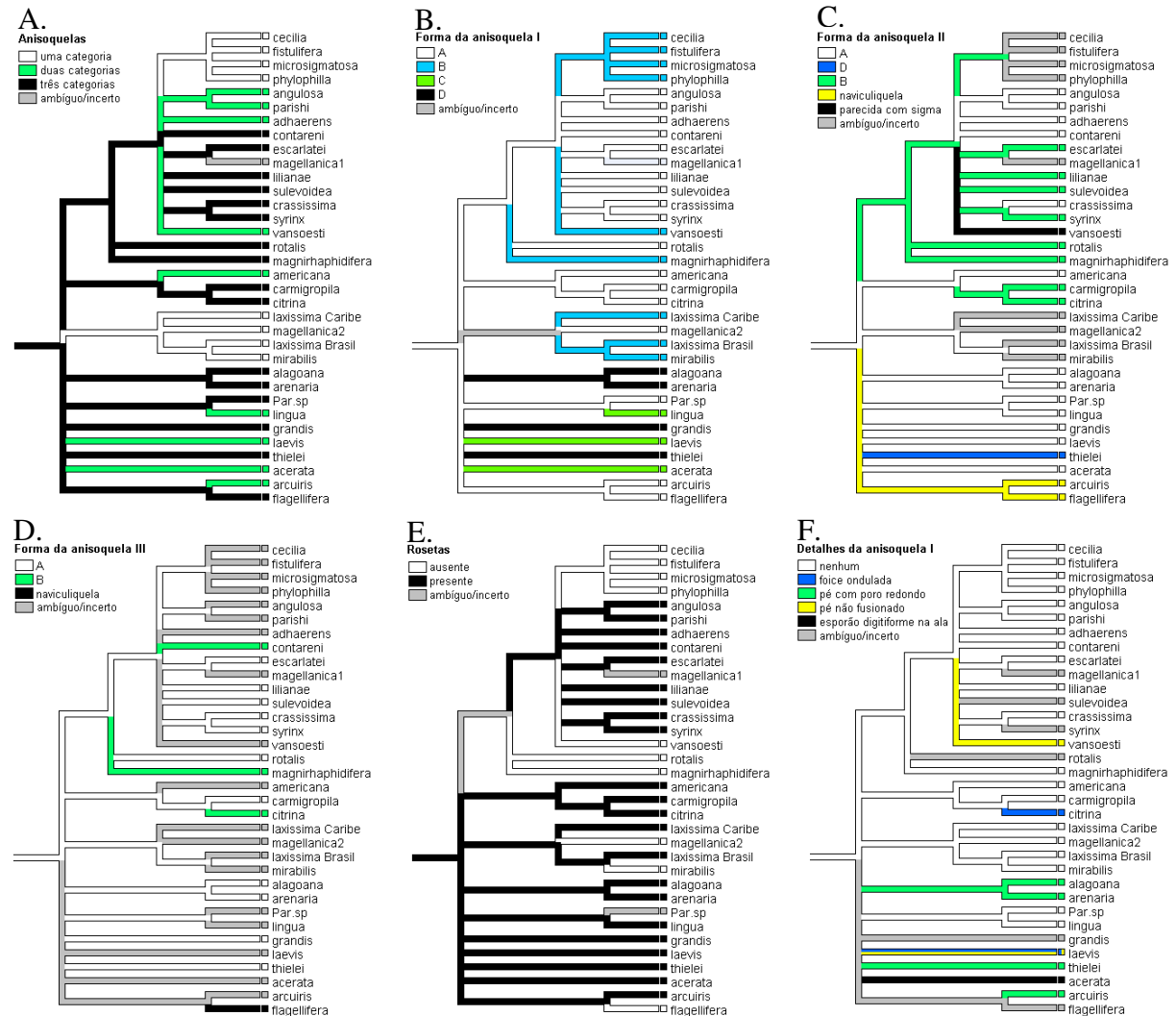


Figura 2.17. Evolução das características morfológicas de *Mycale* Gray, 1867 determinada pela reconstrução de estados ancestrais por parcimônia. As características reconstruídas, anisoquelas (A), forma da anisoquela I (B), forma da anisoquela II (C), forma da anisoquela III (D), rosetas (E) e detalhes da anisoquela I (F), e seus estados (conforme legenda) são descritos no texto, e atribuídas às espécies conforme a matriz na Tabela 2.4. Relações baseadas em marcadores moleculares como discutido no texto. Os táxons terminais considerados na análise são definidos por seus epítetos, e, quando o caso, por sua localidade. Ver texto para mais detalhes.



Tabela 2.5. Sumário da diagnose das características morfológicas de *Mycale* Gray, 1867, dada a hipótese filogenética aceita com base em dados moleculares. As características são indicadas em ordem de descrição (#), assim como o número de passos evolutivos mínimo (Min), observado na árvore (Obs) e máximo (Max) de cada característica. São indicados também os valores calculados dos índices de consistência (CI), retenção (RI), retenção redimensionado (RC), homoplasia (HI) e o ajuste de Goloboff (G-fit). Ver texto para mais detalhes.

| #  | Característica morfológica    | No. de passos |     |     | CI   | RI   | RC   | HI   | G-fit |
|----|-------------------------------|---------------|-----|-----|------|------|------|------|-------|
|    |                               | Min           | Obs | Max |      |      |      |      |       |
| 1  | Forma de crescimento          | 2             | 8   | 11  | 0,25 | 0,33 | 0,08 | 0,75 | 0,33  |
| 2  | Superfície                    | 5             | 15  | 18  | 0,33 | 0,23 | 0,08 | 0,67 | 0,23  |
| 3  | Consistência                  | 3             | 11  | 13  | 0,27 | 0,20 | 0,06 | 0,73 | 0,27  |
| 4  | Coloração                     | 5             | 14  | 17  | 0,36 | 0,25 | 0,09 | 0,64 | 0,25  |
| 5  | Canais subectossomais         | 1             | 7   | 16  | 0,14 | 0,60 | 0,09 | 0,86 | 0,33  |
| 6  | Exudação de muco              | 1             | 3   | 7   | 0,33 | 0,67 | 0,22 | 0,67 | 0,60  |
| 7  | Esqueleto ectossomal          | 2             | 9   | 15  | 0,22 | 0,46 | 0,10 | 0,78 | 0,30  |
| 8  | Arranjo da reticulação        | 1             | 5   | 6   | 0,20 | 0,20 | 0,04 | 0,80 | 0,43  |
| 9  | Esqueleto coanossomal         | 2             | 2   | 5   | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,00 | 1,00  |
| 10 | Tratos esqueléticos           | 1             | 5   | 6   | 0,20 | 0,20 | 0,04 | 0,80 | 0,43  |
| 11 | Subtilóstilos                 | 2             | 2   | 3   | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,00 | 1,00  |
| 12 | Forma do subtilóstilo I       | 1             | 5   | 5   | 0,20 | 0,00 | 0,00 | 0,80 | 0,43  |
| 13 | Comprimento do subtilóstilo I | 4             | 16  | 20  | 0,25 | 0,25 | 0,06 | 0,75 | 0,20  |
| 14 | Largura do subtilóstilo I     | 3             | 15  | 17  | 0,20 | 0,14 | 0,03 | 0,80 | 0,20  |
| 15 | Óxeas                         | 1             | 1   | 1   | 1,00 | 0/0  | 0/0  | 0,00 | 1,00  |
| 16 | Ráfides                       | 2             | 9   | 11  | 0,22 | 0,22 | 0,05 | 0,78 | 0,30  |
| 17 | Isoquelas                     | 1             | 1   | 2   | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,00 | 1,00  |
| 18 | Sigmas                        | 4             | 12  | 19  | 0,33 | 0,47 | 0,16 | 0,67 | 0,27  |
| 19 | Tamanho da sigma I            | 4             | 17  | 21  | 0,24 | 0,24 | 0,06 | 0,77 | 0,19  |
| 20 | Toxas                         | 3             | 9   | 10  | 0,33 | 0,14 | 0,05 | 0,67 | 0,33  |
| 21 | Micracontóxeas                | 1             | 2   | 2   | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 0,50 | 0,75  |
| 22 | Micróxeas                     | 1             | 2   | 2   | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 0,50 | 0,75  |
| 23 | Anisoquelas                   | 2             | 10  | 17  | 0,20 | 0,47 | 0,09 | 0,80 | 0,27  |
| 24 | Forma da anisoquela I         | 3             | 11  | 16  | 0,27 | 0,39 | 0,11 | 0,73 | 0,27  |
| 25 | Detalhes da anisoquela I      | 4             | 7   | 8   | 0,57 | 0,25 | 0,14 | 0,43 | 0,50  |
| 26 | Rosetas                       | 1             | 7   | 10  | 0,14 | 0,33 | 0,05 | 0,86 | 0,33  |
| 27 | Forma da anisoquela II        | 4             | 9   | 12  | 0,44 | 0,38 | 0,17 | 0,56 | 0,38  |
| 28 | Detalhes da anisoquela II     | 2             | 7   | 9   | 0,29 | 0,29 | 0,08 | 0,71 | 0,38  |
| 29 | Forma da anisoquela III       | 2             | 4   | 4   | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 0,50 | 0,60  |
| 30 | Detalhes da anisoquela III    | 2             | 4   | 6   | 0,50 | 0,50 | 0,25 | 0,50 | 0,60  |

## 2.4 Discussão

### 2.4.1 Morfologia das anisoquelas tipo I

A análise dos parâmetros morfométricos extraídos das medidas lineares e angulares das anisoquelas tipo I de *Mycale* resultaam em uma grande variabilidade de formas com diferenças significativas, sendo que quatro formas básicas foram recuperadas. Contudo três destas quatro formas apresentam valores bem similares em seus parâmetros morfométricos, indicando que, embora a diferenças entre elas seja quantificável, esta deve ser melhor explorada. A abordagem metodológica deste trabalho, em categorizar as medidas angulares devido a potenciais erros provenientes da não padronização das micrografias, embora inadequada, permitiu uma boa classificação das espículas. E, no momento que micrografias mais adequadas a este tipo de análise estiverem disponíveis, é possível que o uso dos valores absolutos dessas medidas permita uma melhor distinção entre as formas típicas.

A forma mais discrepante de anisoquela-I encontrada, a forma D, correspondente às anisoquelas curvadas, é reconhecida na literatura como uma forma particular de anisoquela desde longa data, sendo uma característica determinante para o agrupamento de espécies de *Mycale* conhecido como "reunião curvada" (HAJDU, 1995). Esta espícula apresenta valores bem discrepantes de curvatura do eixo e proporção de quelas – tanto de cabeça e pé – e apresenta uma ocorrência taxonômica restrita. Estes fatores refletem uma particularidade que merece ser destacada, haja vista que o uso do termo anisoquela seguido por uma breve descrição de sua forma não faz jus a esta. Propõe-se o termo "curvoquela" para nomear esta forma, sendo esta uma forma derivada de uma anisoquela e não um novo tipo de espícula.

A forma C agrupou reúne espículas caracterizadas por comprimentos muito acima dos encontrados em outras espículas, tendo estas mais do que o dobro do tamanho das demais. Todavia, os demais parâmetros morfométricos destas espículas tendem a apresentar valores intermediários entre a forma D e as demais. Contudo, é possível observar uma grande variabilidade deste outros parâmetros entre as espículas desta forma, sendo que a forma das anisoquelas de *M. lingua* apresenta uma discrepância das de *M. laevis* e *M. lingua*, sobretudo no que diz respeito ao ângulo de abertura entre as alas laterais, a qual é muito maior na primeira. A amostragem deste trabalho não permite avaliar se a forma C compreende uma heterogeneidade maior de formas unidas unicamente por comprimentos elevados, mas esta parece ser uma possibilidade para qual apontam os dados, e que requer uma análise mais abrangente.

A distinção entre as formas A e B por meio dos parâmetros morfométricos utilizados foi tênue, sendo que esta é suportada por valores pouco expressivos de somente algumas medidas. Os parâmetros mais discrepantes entre estas duas formas – os ângulos de abertura da ala frontal do pé e entre as alas laterais do pé – não são evidentes a primeira vista. Uma característica que se mostra distintiva entre as duas formas após as análises, que não foi explorada neste trabalho, é a largura das alas laterais, tanto da cabeça quanto do pé, as quais são muito menores na forma B. Contudo, ainda assim é possível observar uma congruência entre as diferentes formas de anisoquetas das espécies com a sua taxonomia, onde a forma B é encontrada em espécies dos sub-gêneros *Carmia* e *Arenochalina* e a forma A em espécies dos sub-gêneros *Aegogropila* e *Naviculina*. A única exceção foi o agrupamento da anisoqueta de *M. (Arenochalina) mirabilis* com as da forma A, muito embora seja possível observar uma distinção entre estas. Nas análises de componentes principais a anisoqueta-I de *M. mirabilis* é observada entre as anisoquetas das formas A e B e na análise de agrupamentos hierárquica é possível observar que esta espícula é a mais distante do seu grupo. O agrupamento da anisoqueta de *M. mirabilis* com a forma A é aqui considerado anômalo, sobretudo devido à baixa qualidade das micrografias eletrônicas de varredura disponíveis para esta espécie, o que provavelmente embutiu um grande erro na obtenção de suas medidas morfométricas. Ressalta-se que micrografias mais adequadas, tanto em resolução quanto em enquadramento, e uma maior amostragem de espécies são necessárias para melhor avaliar a distinção entre as formas A e B das anisoquetas de *Mycale*, e até que ponto estas estão de acordo a taxonomia destas espécies. Para tal, provavelmente será necessário reavaliar os parâmetros morfométrico utilizados e acrescentar outros, como mencionado acima.

Muito embora Doumenc e Levi (1987) também por meio de dados morfométricos tenha tentado delimitar limites na variabilidade morfológica das anisoqueta de *Mycale*, as análises realizadas no presente trabalho são mais robustas do que a apresentada pelos autores, mesmo tendo estes contado com uma amostragem de espécies bem superior do que a apresentada aqui. Primeiramente, Doumenc e Levi (1987) extraíram suas medidas morfométricas de ilustrações, enquanto que aqui foram utilizadas MEV. Em segundo lugar, o presente trabalho contou com um número maior de parâmetros morfométricos, enquanto que os autores, além de utilizar parâmetros claramente interdependentes, utilizaram apenas a vista frontal das anisoquetas. E em terceiro lugar, a metodologia estatística utilizada aqui é mais robusta para delimitação de grupos. Sem uma comparação mais apropriada entre os dois trabalhos, que contaria com uma

amostragem maior deste próprio, é difícil dizer se a classificação obtida por Doumenc e Levi (1987) para as anisoquelas de *Mycale* em cinco formas distintas é real ou um artefato de sua análise. Esta classificação foi realizada a partir de análises de contorno das espículas, mas como expresso acima, os autores utilizaram ilustrações, e não micrografias para tal, e somente a vista frontal das espículas. Além disso, esta expressa uma diferenciação contínua entre tamanho maiores de eixos e menores de quelas, mas estes dois parâmetros são intrinsecamente dependentes um do outro, uma vez que, dado um comprimento fixo para a anisoquelas, quelas maiores determinam eixos menores. Por outro lado, as formas reconhecidas no presente trabalho incluem uma percepção espacial maior das espículas, e assim sendo, uma maior representatividade da variabilidade destas.

Uma outra análise não explorada neste trabalho – que viria a contribuir para elucidar a evolução das formas de anisoquelas – incluiria não só as anisoquelas tipo I mas todas as demais categorias de tamanho de anisoquelas. Muitas das formas mais derivadas destas espículas são encontradas em outras categorias que não a primeira. Uma análise como esta permitiria avaliar o grau de similaridade entre diferentes formas de diferentes categorias o que permitiria uma melhor classificação e potencializando, em seguida, uma avaliação da homologia e derivação destas. Além disso, outras metodologias de análise, como morfometria geométrica e de contorno, ou mesmo reconstruções tri-dimensionais, implementadas por meio de aquisição de dados automatizada, permitiria um melhoramento dos dados tanto qualitativo quanto quantitativamente.

#### 2.4.2 Dimensões das espículas

As correlações entre as dimensões das espículas encontradas em *Mycale* revelaram que muitas destas medidas apresentam uma relação significativa entre si. Dado que a espiculogênese depende de processos básicos em comum, como a biodeposição de sílica e a síntese de uma matriz orgânica, é razoável pensar que a síntese de diferentes tipos espiculares pode estar relacionada, e, desta forma, gerar padrões ou seguir modelos previsíveis. Até que ponto a análise das relações entre parâmetros morfométricos é capaz de desvendar processos sintéticos subjacentes ainda é algo a ser investigado, mas há fortes evidências de que isto seja possível (de Paula *et al.*, *in prep.*). Os modelos estimados a partir das relações entre parâmetros morfométricos, caso sejam verossímeis, retratam um cenário no qual as propriedades das

espículas, além de ser predizíveis, seguem uma função cujos desvios não esperados só podem ser explicados por fatores externos ao modelo. Neste sentido, a sobreposição de relações filogenéticas a este modelo permite verificar quais ramos evolutivos se mostram neutros em relação ao modelo e quais destoam deste.

Embora as possibilidades de análise realizadas neste trabalho não tenham sido completamente exploradas (mas ver Capítulo 3), estas análises preliminares permitiram verificar padrões significativos para as dimensões das espículas do gênero *Mycale* que até então não haviam sido revelados, como a significativa correlação entre o comprimento dos subtilóstilos-I e o tamanho das anisoquetas-I. Mas, mais do que isso, estas permitiram verificar em que ponto filogenético o modelo esperado para as relações dos parâmetros morfométricos é violado. Nos casos onde os modelos foram significativos, é possível observar que a maior parte dos ramos correspondentes às relações entre as espécies parece seguir a mesma tendência da relação entre os parâmetros – os quais se apresentam paralelos, ou quase, à função preditiva do modelo. Nestes casos, não há qualquer evidência que sugira que as diferenças nas dimensões das espículas destas espécies se deem por particularidades no processo evolutivo destas espécies, sendo cabível postular que estas diferenças se deem unicamente por meio de especificações próprias dos processos espiculogênicos. Por exemplo, na correlação entre o comprimento e a largura do subtilóstilo-I pode-se observar que as duas espécies de *Naviculina* apresentam valores bem discrepantes destes dois parâmetros, mas o ramo que as une segue a mesma direção do modelo esperado. Se estas especificações dos processos de síntese das espículas que modulam estes modelos operam prioritariamente por meio de fatores genéticos, ambientais ou ambos, e em que proporção, isto é algo ainda a ser propriamente avaliado. As análises realizadas apontam para uma certa congruência genética entre as dimensões das espículas de diferentes espécies, onde, nos gráficos de dispersão, é possível observar uma proximidade entre os pontos referentes às espécies mais próximas geneticamente. Contudo, a presença de uma mistura de pontos entre espécies distantes sugere que outros fatores que não genéticos possam estar envolvidos.

Por outro lado é possível observar que as dimensões das espículas de algumas espécies se mostram bem divergentes do esperado, estando os ramos filogenéticos que determinam sua relação com outras espécies em oposição ao modelo determinado pela correlação entre os parâmetros. Nestes casos, é possível especular que outros fatores particulares na linhagem evolutiva destas espécies estejam contribuindo para uma alteração significativa dos processos

espiculogenéticos destas, desviando-as, assim, do modelo mais geral observado nas demais espécies.

Por se tratar de uma abordagem exploratória, estas análises suscitam mais perguntas do que respostas, mas são capazes de apontar padrões e desvios interessantes a serem examinados. A extensão destas análises, com uma maior amostragem de espécies e melhor resolução filogenética poderia evidenciar mais destes padrões, e, associados com trabalhos populacionais que apreendam parte da variabilidade genética e ambiental destas espécies, poderiam sugerir fatores que estivessem relacionados a tais fenômenos.

#### 2.4.3 Sinapomorfias dos clados reconhecidos

As análises de reconstrução de características ancestrais permitiram avaliar o grau de homologia que as características morfológicas apresentaram a partir da hipótese filogenética aceita. De forma geral, uma grande parte das características analisadas apresentou um alto grau de homoplasia (ver abaixo). Entretanto, muitas outras revelaram ser sinapomorfias, dados os clados de *Mycale* reconhecidos no Capítulo 1.

O clado *Carmia* I apresentou como principais sinapomorfias a presença de canais subectossomais, a ausência de esqueleto ectossomal especializado, a ausência de toxas, subtilóstilos-I entre 200 e 300 µm, sigmas e anisoquelas com forma B em somente uma categoria e ausência de rosetas. As características apresentadas acima são encontradas em muitas outras espécies de *Carmia*, evidenciando que tais características possam, de fato, corresponder a sinapomorfias de um grupo natural. Hentschel (1965) já havia sinonimizado duas espécies à *M. microsigmatosa*, que hoje são tidas como válidas: *M. cecilia* – incluída neste clado – e *M. senegalensis* Lévi, 1952, sendo que esta é apontada pelo autor, em sua descrição, ser correlata à *M. tenuispiculata* (Dendy, 1905). Hentschel (1965) também argumentou que *M. microsigmatosa* estaria relacionada à outras espécies com características morfológicas similares, *M. phyllophila* e *M. maunakea* – sendo a última considerada atualmente um sinônimo júnior de *M. cecilia*. Bergquist e Fromont (1988), ao descrever a espécie *Carmia henstcheli*, apontaram uma proximidade desta também com *M. phyllophila*. E por sua vez, van Soest (1982) propôs uma sinonímia entre *M. phyllophila* e de *M. lissochela* Bergquist, 1965 – também considerada como válida atualmente – além de apontar uma relação de proximidade entre *M. phyllophila* e as espécies *M. microsigmatosa*, *M. senegalensis* e *M. sanguinea* Tournamal, 1969. As características

compartilhadas entre estas espécies as coloca relacionadas com o clado I – embora análises moleculares sejam necessárias a fim de corroborar tal afirmação – e a ampla distribuição geográficas destes táxons impõe limites em uma argumentação que as considere como uma única espécie.

O clado anterior se diferencia do clado *Carmia* II pelo último apresentar, adicionalmente, ráfides longas e sinuosas semelhantes à toxas – ausentes no clado anterior – sigmas em duas categorias, micróxeas – também ausentes em *Carmia* I – e anisoquelas em três categorias. A posição taxonômica divergente dos dois clados e as muitas diferenças morfológicas entre estes suportam uma separação deste sub-gênero em dois grupos distintos. Embora o clado *Carmia* II tenha sido representado por apenas uma espécie (duas se considerarmos o criptismo em *M. magnirhaphidifera*), as características apresentadas por este se assemelham as encontradas na espécie tipo do sub-gênero *Carmia*, *M. macilenta* (Bowerbank, 1866), o que sugere que o sub-gênero *Carmia* s.s. corresponderia ao clado *Carmia* II. Desta forma, o clado *Carmia* I deveria ser elevado a um novo sub-gênero de forma a refletir sua distinção das demais espécies de *Carmia*. Contudo esta divisão só poderia ser formalmente proposta com, pelo menos, a inclusão da espécie-tipo do sub-gênero. Embora não haja nenhum nome existente na literatura que identifique espécies com as características morfológicas apresentadas pelo clado *Carmia* I, é proposto aqui, temporariamente, o nome "*Tenuicarmia*" para identificar as espécies de *Carmia* com apenas uma categoria de microscleras. Este faz referência a espécie *M. tenuispiculata*, a qual é o táxon mais antigo de todos os demais que portam as características típicas deste clado. Como mencionado anteriormente, uma revisão das espécies deste sub-gênero, com a inclusão da espécie-tipo e outras mais seria necessário para a formalização de um novo sub-gênero.

O clado *Zygomycete* apresentou como sinapomorfias características há muito reconhecidas como diagnósticas para o sub-gênero. Da mesma forma que os clados *Oxymycale*, *Paresperella* e *Naviculina*, onde as características recuperadas não entram em conflito com a definição dos respectivos sub-gêneros. Como os sub-gêneros *Oxymycale* e *Paresperella* foram representados por apenas uma única espécie, nada se pode dizer a respeito da evolução das características destes grupos, onde nas análises, as características diagnósticas destes aparecem como autapomorfias. Por outro lado, muitas das características do clado *Naviculina* apresentaram um alto grau de polimorfismo, inclusive algumas que se mostraram bem conservadas em outros clados. Por exemplo, as duas espécies de *Naviculina* incluídas nas análises divergem em relação a

presença de toxas, uma característica bem marcante entre os clados de *Carmia* (ver acima). Outras distinções se dão, por exemplo, no número de categorias de anisoquetas e presença de rosetas, além de dimensões de espículas bem divergentes, implicando em uma alta homoplasia destas características no sub-gênero que somente poderá ser melhor avaliada com a análise de um maior número de espécies deste.

O clado *Arenochalina* também se mostrou bastante coerente com a definição do sub-gênero correspondente. A única exceção se deveu à espécie críptica de *M. magellanica*, cuja descrição precisa ainda ser detalhada. Como argumentado no capítulo anterior há certo suporte em uma relação de proximidade entre o clado *Arenochalina* e o clado *Aegogropila* III. As análises de reconstrução ancestral de características parecem corroborar esta proximidade entre os dois clados. Embora esta hipótese não tenha sido testada diretamente, é possível observar que cada um dos clados apresentam características ancestrais em comum, as quais seriam recuperadas como sinpormorfias no caso da formação de um clado entre os dois. Por exemplo, a exudação de muco, com exceção de uma única outra espécie não relacionada, só é evidente nas espécies dos dois clados. Outra característica em comum é a presença de uma única categoria de sigma.

O clado *Aegogropila* I, por sua vez, apresentou uma grande variação nos estados das características analisadas, uma situação provavelmente agravada pela parafilia deste clado. Adicionalmente, o clado *Aegogropila* II não apresentou qualquer característica distintiva do clado anterior, muito embora o primeiro corresponda apenas a uma única espécie. Os poucos estados predominantemente encontrados em ambos os clados são aqueles amplamente encontrados em outras espécies de *Mycale*. Desta forma, para avaliar a evolução das características neste grupo seria necessário, além de uma maior amostragem de espécies, uma maior resolução das relações entre as espécies pertencentes a este. No capítulo 1 é argumentado que os marcadores moleculares apresentaram pouco suporte para tal, mas há evidências que indicam que este estaria subdividido em um número maior de clados. Mas, mesmo espécies consideradas próximas neste clado, como *M. crassissima* e *M. syrinx*, apresentam uma grande divergência de características, como presença e ausência de canais subetocossomais, toxas, ráfides e diferenças na forma e dimensões de microscleras. A grande diversificação de formas neste clado sugere que muitas das características morfológicas consideradas em *Mycale* podem, de fato, ter evoluído por meio de um liga e desliga de genes envolvidos no desenvolvimento destas características. Esta condição latente de características em *Mycale* não é um caso isolado. Hajdu *et al.* (1994) utilizaram-se do



mesmo argumento para explicar a evolução das quelas nas demosponjas, sendo o mesmo encontrado em outros animais, como *Drosophila* (Throckmorton, 1965). Hoje sabe-se que muitas das características que apresentam tal padrão evolutivo são controladas por genes homeobox ou outros genes e mecanismos regulatórios (ver referências em CARROL *et al.*, 2004). Este padrão evolutivo – *i.e.*, o aparecimento disjuntivo de características, resultando em espécies próximas apresentando características divergentes em relação a espécies mais distantes – termina por produzir uma sistemática confusa, uma vez que, dependente destas, a classificação destas será ou determinada por grupos não-naturais, ou por grupos diagnosticados por homoplasias. Contudo, a partir do conhecimento de como opera o desenvolvimento das características morfológicas de esponjas, seria possível determinar apropriadamente os fatores que determinam estas disjunções, e potencialmente definir novos conceitos de homologia para tais características.

Os clados *Mycale* I, II e III se mostram ainda mais problemáticos, uma vez que, com a exceção do primeiro, a resolução das relações evolutivas recuperadas foi inferior a para permitir uma melhor avaliação das características destes grupos. A politomia de base no clado parafilético *Mycale* III se mostrou especialmente inconclusivo, no qual as três espécies compreendidas apresentaram padrões ambíguos nas ocorrências de certas características. Por exemplo, a presença de ráfide e o número de categorias de sigmas sugerem uma relação maior de proximidade entre *M. laevis* e *M. grandis*, contudo, o número de categorias de anisoquelas e a forma da anisoquela-I implicam uma proximidade entre *M. grandis* e *M. thielei*, caso se considerem estas características homólogas neste clado.

Contudo, como as análises moleculares do capítulo anterior sugerem, o sub-gênero *Mycale* apresenta uma divergência evolutiva muito maior do que os demais sub-gêneros. E, embora no escopo deste trabalho tenham-se optado em agrupar estas espécies do clado *Mycale* III em um clado parafilético, estas, na verdade corresponderiam à clados independentes, da mesma forma que os clados *Mycale* I e II. Esta maior divisão entre as espécies do sub-gênero *Mycale* implica um aumento no grau de homoplasia das características observadas. Esta consideração é importante ao levarmos em conta a filogenia morfológica existente para o sub-gênero (Hajdu, 1995), na qual é postulada a formação da já mencionada reunião-curvada, um clado reconhecido, sobretudo, pela presença de anisoquelas-I cuja forma equivale à forma D encontrada neste trabalho. Na filogenia de Hajdu (1995), é possível observar uma relação de proximidade entre *M. arenaria* e *M. thielei*, sendo os dois considerados grupos-irmãos, e embora não considerada na

análise, dadas as características sinapomórficas dos clados reconhecidos neste trabalho, *M. grandis* também estaria incluído no chamado grupo-*immitis*. Contudo, como evidenciado pelas topologias do presente trabalho, a forma D da anisoquela-I seria independentemente adquirida em pelo menos três linhagens: no clado *Mycale* I, que compreende as espécies *M. arenaria* e *M. alagoana*; e nas espécies *M. grandis* e *M. thielei* do clado *Mycale* III. Como não há qualquer evidência que suporte a monofilia entre estas espécies, os resultados do presente trabalho não corroboram a naturalidade da assim chamada reunião curvada, sendo esta, polifilética.

A relação entre *Mycale* II e *Paresperella*, como argumentada no capítulo anterior, é algo a ser investigado em maiores detalhes, não só do ponto de vista molecular, a fim de corroborar esta relação, mas também do morfológico. *M. lingua* e *Paresperella* divergiram em relação a quase todas as características morfológicas analisadas, sendo esta relação pouco suportada por estes dados. Isto implica um grau de homoplasia extremamente alto para praticamente todas as características morfológicas consideradas para o gênero, se, de fato, este for um grupo natural. Contudo, a ocorrência de um clado entre espécies tão divergentes sugere que outras mais não compreendidas pelas análises poderiam estar relacionadas a estas, formando um clado mais diverso do que o encontrado. Mas, mesmo assim, esta suposição não resolveria a questão da homoplasia das características morfológicas de *Mycale*, as quais, no máximo, poderiam ser melhor avaliadas.

Uma outra questão promovida pela ausência de resolução filogenética do clado *Mycale* III se refere às características ancestrais do gênero *Mycale*. Uma vez que uma grande parte dos clados politômicos na base de *Mycale* correspondem às espécies deste clado, os estados ancestrais recuperados para o gênero tenderam em direção aos mesmos estados encontrados nestas. Algumas poucas exceções se devem a características ou amplamente conservadas entre os diferentes clados ou divergentes entre as espécies do sub-gênero *Mycale*.

#### 2.4.4 Características homoplásticas

Todos os polimorfismos considerados neste trabalho são resultado de uma alta plasticidade fenotípica das características em questão nas espécies em que estes ocorrem, sendo a totalidade destas características da morfologia externa. Como já apresentado (ver Introdução), fatores ecológicos – físicos, químico e biológicos – podem desempenhar um papel influente no desenvolvimento destas características, e dessa forma, uma única espécie é passível de apresentar

uma gama de estados diferentes para uma mesma característica, cada qual subjacente a predominância ou somatório de um incontável número de fatores. Mesmo assim, as análises deste trabalho foram capazes de recuperar potenciais estados ancestrais para muitas destas características. Por exemplo, enquanto que a forma incrustante mostrou ser o estado ancestral da forma de crescimento da maior parte dos clados reconhecidos, no clado *Arenochalina*, este foi a forma tubular. Já a coloração amarela se mostrou ser o estado ancestral do clado *Aegogropila* III, sendo a coloração laranja a forma ancestral do clado que une as demais *Aegogropila*, *Carmia* e *Zygomycale*.

Estas análises sugerem que estas características polimórficas nas espécies de *Mycale*, ao contrário de apresentarem estados múltiplos, igualmente possíveis, apresentariam um estado básico que seria modificável por certas condições ambientais. Contudo, esta hipótese seria dificilmente testável, uma vez que não há como isolar completamente os fatores ambientais potencialmente envolvidos. Uma possibilidade seria verificar quais estados seriam os mais frequentes dada a maior variabilidade ambiental possível. Neste caso, estes estados poderiam ser vistos como a forma primária de ocorrência destas características passíveis de plasticidade. E uma nova reconstrução realizada somente a partir destas formas básicas, poderia fornecer mais evidência a respeito da evolução de tais características.

Dois características, cujas homologias são amplamente discutidas na literatura, a ocorrência das microscleras micróxeas e micracantóxeas, se mostraram altamente homoplásticas nas reconstruções inferidas neste trabalho. Como já apresentado anteriormente (ver Introdução), das quatro hipóteses para a evolução das micracantóxeas apresentadas por Carballo e Hajdu (1998), duas não apresentam suporte a partir dos resultados obtidos no presente trabalho. A primeira hipótese, a qual postula uma origem única para estas espículas, se baseia no fato destes autores considerarem uma relação de parentesco entre *Aegogropila*, *Carmia* e *Paresperella*, para os quais, as micracantóxeas seriam uma sinapomorfia. Contudo, como a espécie de *Paresperella* utilizada neste trabalho não está relacionada às espécies dos demais sub-gêneros em questão, esta espícula não poderia ser uma sinapomorfia entre estes, descartando esta hipótese. A outra hipótese não suportada pelos resultados deste trabalho postula uma origem única e implica uma polifilia entre *Carmia* e *Aegogropila*. Contudo, nenhuma reconstrução obtida aqui evidencia uma relação de parentesco entre as espécies que apresentam estas espículas. Desta forma, somente duas hipóteses para a evolução de tal característica seriam possíveis, onde: 1) estas espículas

teriam surgido independentemente entre várias linhagens; ou 2) estas teriam uma origem única mais inclusiva, podendo ocorrer em múltiplos subgêneros, mas ignorados por descrições poucos detalhadas. Todavia, muitas novas espécies de *Mycale* têm sido descritas desde então, e muitas espécies anteriormente descritas vem sendo revisadas, com um uso cada vez maior de MEV, detalhando os tipos espiculares destas espécies. E ainda assim, a ocorrência de micracantóxeas continua sendo restrita a algumas poucas espécies, até onde se sabe, fornecendo cada vez menos suporte para a hipótese de uma origem única para estas espículas, as quais provavelmente evoluíram independentemente em várias linhagens.

O fato é que não houve ainda uma revisão destas características ao ponto de formular uma hipótese robusta para a evolução destas espículas. Muitos autores formulam que micracantóxeas sejam derivadas de toxas, mas a diferenciação entre toxas e ráfides como tipos espiculares distintos se confunde ao levarmos em conta a existência de ráfides longas e sinuosas, consideradas, por alguns autores, consistir em um tipo próprio de espícula, chamada rafidotóxa (HENTSCHEL, 1912; CARBALLO e HAJDU, 2001). Estas espículas são encontradas restritamente em poucas espécies distribuídas em dois sub-gêneros, *Aegogropila* e *Carmia*, e Carballo e Hajdu (2001). A única espécie utilizada neste trabalho que apresentou tal tipo de espícula, *M. (C.) magnirhaphidifera*, na tabulação dos dados, teve esta considerada como uma ráfide derivada. Embora um estudo mais aprofundado destas espículas – com base em análises ultraestruturais e espiculogenéticos, como os realizados por Custódio e colaboradores (2002) – seja necessário a fim de compreender melhor sua evolução, a partir dos resultados deste trabalho é possível delinear uma hipótese plausível para tal (Figura 2.18). Se considerarmos que ráfides, toxas, rafidotóxas, micróxeas e micracantóxeas sejam tipos espiculares homólogos, temos que, muito provavelmente, a forma ancestral destas sejam as ráfides. Esta posição é defendida por muitos autores, que consideram as ráfides como uma característica simplesiomórfica em Demospongiae, uma vez que este tipo de espícula é estruturalmente simples e amplamente encontrado em vários grupos não relacionados. Considerando as ráfides como o estado ancestral destas formas em *Mycale*, teríamos um cenário no qual estas seriam perdidas recorrentemente em várias linhagens. Além disso, teríamos a origem independente das toxas a partir das ráfides em pelo menos três linhagens, sendo que em uma destas teriam surgidos também as micróxeas, mas estas espículas poderiam ter surgido tanto a partir de ráfides ou toxas. Em outra linhagem as rafidotoxas surgiriam a partir de toxas, e as micróxeas surgiriam independentemente nesta

linhagem a partir ou de ráfides ou de rafidotoxas. A evolução das toxas em uma das linhagens de *Mycale* poderia ter ocorrido tanto a partir de ráfides quanto de rafidotoxas, embora esta última seja menos provável. Contudo, nesta mesma linhagem, as micracantóxeas surgiriam a partir de toxas, sendo que estas poderiam tanto ser perdidas em linhagens mais derivadas ou reverterem novamente a ráfides, as quais seriam encontradas juntamente com as toxas. Não há evidências para afirmar se estas ráfides que aparecem em conjunto com as toxas sejam diferentes das encontradas em outros grupos que não possuem toxas. Se considerarmos a irreversibilidade de uma característica complexa, como determinado pela Lei de Dollo, muito provavelmente, estas ráfides corresponderiam a novos tipos espículas, derivados de toxas. Contudo, como argumentado por Carballo e Hajdu (2001) é provável que a ocorrência destas espículas seja determinada por processos que agiriam analogamente a um interruptor, ligando e desligando a expressão dessas características ao longo das linhagens. Nesta interpretação, os autores consideram a ocorrências destas espículas como sinapomorfias em níveis mais exclusivos, e sinapomorfias subjacentes (*underlying synapomorphies*) naqueles mais inclusivos. Entretanto, a argumentação dos autores se baseia, sobretudo, na ocorrência intermitente destas características em espécies de diferentes sub-gêneros. Como os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que muitos destes grupos se apresentam polifiléticos como definidos atualmente, uma vez que seja feita uma redefinição destas linhagens, reconhecendo somente grupos naturais, tal interpretação poderia ser invalidada, e uma mais tradicional, que consideraria uma série de transformação entre estas espículas, seria possível. Ráfides e toxas também são comumente encontradas em outras espécies de Poecilosclerida, e uma revisão mais ampla destes tipos de espículas seria necessária a fim de determinar a homologia destas e estabelecer uma hipótese mais apropriada para a evolução destas características.

#### 2.4.5 Redefinindo os subgêneros?!

Embora este trabalho esteja longe de ser uma revisão do gênero *Mycale*, os resultados aqui obtidos permitem estabelecer parâmetros para a diagnose de grupos naturais. Não é de hoje que se sabe que muitas características diagnósticas do atual sistema de classificação correspondem, na verdade, a homoplasias, como demonstrado aqui (HAJDU, 1999). Mas, por outro lado, características consideradas anteriormente como secundárias, como a exudação de muco, puderam ter sua homologia testada, e indicando uma potencial utilidade taxonômica. Da

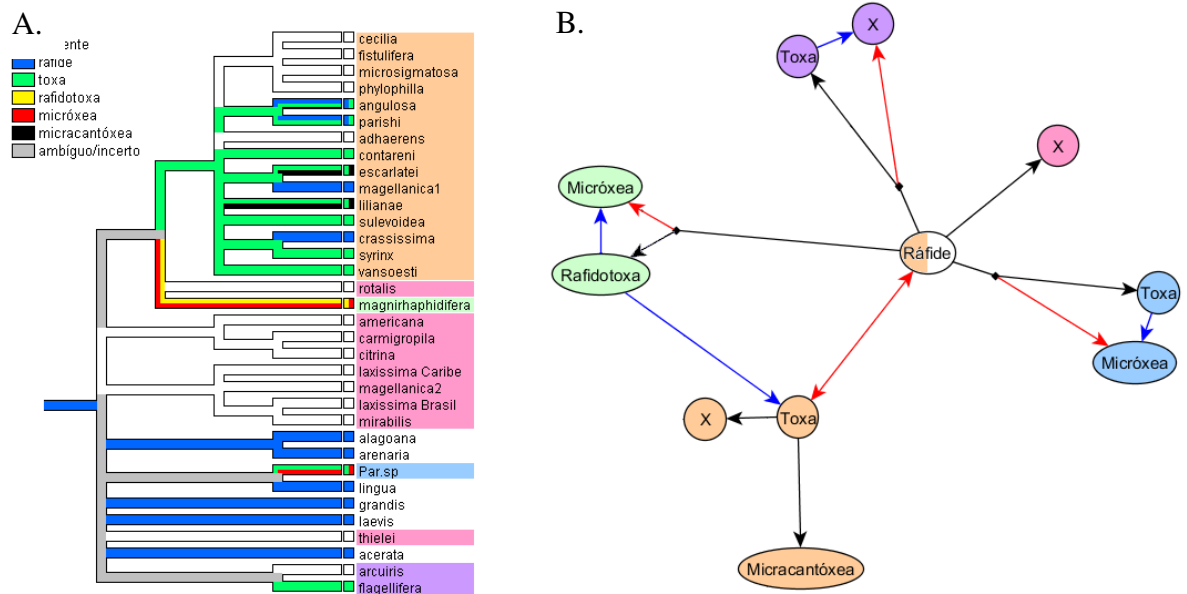


Figura 2.18. Hipótese de evolução das ráfides, toxas, rafidotoxas, micróxeas e micracantóxeas de *Mycale* Gray, 1867 segundo as relações filogenéticas obtidas neste trabalho. A. Reconstrução de estados ancestrais, dada a hipótese filogenética aceita neste trabalho, pressupondo a homologia dessas microscleras, cujo estado ancestral seria a presença de ráfides. As cores dos ramos indicam os estados dos clados segundo a legenda. As cores nos nomes dos ramos terminais indicam diferentes combinações de estados, os quais foram utilizados para hipotetizar as séries de transformação. B. Séries de transformação entre as microscleras, onde as espículas estão indicadas pelas elipses e as setas indicam a direção das mudanças evolutivas. As setas em cores identificam diferentes hipóteses para a origem as espículas interligadas, sendo que as em vermelho indicam transformações diretamente a partir das ráfides e as em azul, transformações a partir de outras espículas derivadas. O "X" indica a perda (ausência) da característica em questão. As cores identificam as linhagens no cladograma ao lado. A seta bidirecional indica uma reversão.

mesma forma, enquanto certas características, tais como a presença de uma única categoria de sigmas e anisoquelas, eram meramente sugeridas como formadoras de complexos de espécies por autores anteriores, as análises deste trabalho puderam demonstrar que estas correspondem a sinapomorfias para novos clados. Abaixo são apresentadas definições para os grupos considerados neste trabalho. Estas são, sobretudo, tentativas de estabelecer novos paradigmas para a sistemática de *Mycale*, e não devem ser vistas como uma revisão taxonômica, a qual, impreterivelmente, dependeria da análise de muitas outras espécies, sobretudo das espécies-tipo

dos sub-gêneros considerados e dos sub-gêneros *Grapelia* e *Rhaphidoteca*, não analisadas neste trabalho.

As definições abaixo, exceto quando especificado ao contrário, assumem como morfologia básica para *Mycale* as seguintes características: forma de crescimento geralmente incrustante; canais subectossomais não-visíveis; ausência de exudação de muco; esqueleto coanossomal plumoreticulado; tratos esqueléticos geralmente multiespiculares; subtilóstilos (= mycalóstilos) em somente uma categoria; ausência de ráfides, isoquelas, toxas, micróxeas e micracantóxeas.

- *Carmia* I (= "*Tenuicarmia*") – *Mycale* com canais ectossomais visíveis, esqueleto ectossomal não especializado, sigmas em somente uma categoria, anisoquelas também em somente uma categoria, tipicamente com forma B e não formando rosetas;
- *Carmia* II – *Mycale* com canais ectossomais visíveis, esqueleto ectossomal não especializado, ráfides sinuosas (= rafidotoxas) presentes, sigmas em pelo menos duas categorias, podendo apresentar micróxeas e anisoquelas em até três categorias, as quais geralmente apresentam forma B;
- *Zygomycala* – *Mycale* com esqueleto ectossomal reticulado, ráfides e isoquelas presentes, toxas em uma categoria formando toxodragmatas, sigmas em duas categorias, anisoquelas também em duas categorias tipicamente com forma A e formando rosetas;
- *Aegogropila* I e II – *Mycale* com canais ectossomais podendo ou não estar visíveis, exudação de muco, quando existente, pouco acentuada; esqueleto ectossomal geralmente reticulado, podendo apresentar derivações para confuso, ráfides podem ou não estar presentes, toxas podem estar presentes em mais de uma categoria, podendo ou não formar toxodragmatas, sigmas podem estar presentes em mais de uma categoria, podem apresentar micracantóxeas, anisoquelas em duas ou mais categorias, anisoquelas-I geralmente com forma A e, em sua maioria, formando rosetas, anisoquelas-II podem apresentar formas A ou B, anisoquelas-III, quando presentes, geralmente com forma A;
- *Aegogropila* III – *Mycale* com canais ectossomais podendo ou não estar visíveis, exudação de muco bastante acentuada, esqueleto ectossomal geralmente reticulado, podendo apresentar derivações não especializado, sigmas em uma categoria, anisoquelas em duas ou mais categorias, anisoquelas-I tipicamente com forma A e formando rosetas,

anisoquelas-II podem apresentar formas A ou B, anisoquelas-III, podem apresentar formas A ou B;

- *Arenochalina* – *Mycale* com forma de crescimento geralmente tubular, exudação de muco bastante acentuada, esqueleto ectossomal não-especializado, esqueleto coanossomal reticulado, sigmas em somente uma categoria, anisoquelas também em somente uma categoria, tipicamente com forma B e podendo ou não formar rosetas;
- *Naviculina* – *Mycale* com canais ectossomais visíveis, esqueleto ectossomal reticulado, esqueleto coanossomal plumoso, tratos esqueléticos tipicamente paucispiculares, podendo ou não apresentar toxas em uma categoria, sigmas em duas categorias, anisoquelas em pelo menos duas categorias, as anisoquelas-I tipicamente com forma A podendo ou não formar rosetas, anisoquelas-II do tipo naviculiquela;
- *Oxymycale* – *Mycale* com esqueleto ectossomal reticulado, subtilóstilos ausentes, substituídos por óxeas, ráfides presentes, sigmas ausentes, anisoquelas em duas categorias, anisoquelas-I tipicamente com forma C, anisoquelas-II e III com forma A;
- *Paresperella* – *Mycale* com canais ectossomais visíveis, esqueleto ectossomal reticulado, toxas em pelo menos uma categoria, sigmas com bordas serradas, podendo apresentar micróxeas, anisoquelas em até três categorias e geralmente com forma A;
- *Mycale I* – *Mycale* com esqueleto ectossomal confuso, ráfides presentes, subtilóstilos em duas categorias, sigmas em pelo menos uma categoria, anisoquelas em três categorias, anisoquelas-I do tipo "curvoquela" (forma D) e formando rosetas, anisoquelas-II e II com forma A;
- *Mycale II* – similar à *Mycale I*, mas subtilóstilos em somente uma categoria, sigmas em somente uma categoria, anisoquelas em somente duas categorias, anisoquelas-I tipicamente com forma C;
- *Mycale III* – tentativamente dividido em três subgrupos, onde:
  - *Mycale III.A* – similar à *Mycale I*, mas subtilóstilos em somente uma categoria, sigmas em duas categorias,
  - *Mycale III.B* – similar à *Mycale I*, mas subtilóstilos em somente uma categoria, sigmas em duas categorias, anisoquelas em somente duas categorias, anisoquelas-I tipicamente com forma C;



- Mycale III.C – similar à *Mycale* I, mas subtilóstilos em somente uma categoria, ráfides ausentes, sigmas em somente uma categoria, anisoquelas-II do tipo curvoquela (forma D).

Chave para identificação dos grupos definidos acima:

**1. Esqueleto coanossomal**

|                       |                     |
|-----------------------|---------------------|
| plumoso .....         | <i>Naviculina</i>   |
| reticulado .....      | <i>Arenochalina</i> |
| plumoreticulado ..... | 2                   |

**2. Megascleras**

|                                      |                  |
|--------------------------------------|------------------|
| óxeas .....                          | <i>Oxymycale</i> |
| subtilóstilos (duas categoria) ..... | <i>Mycale I</i>  |
| subtilóstilos (uma categoria) .....  | 3                |

**3. Isoquelas**

|                 |                   |
|-----------------|-------------------|
| presentes ..... | <i>Zygomycale</i> |
| ausentes .....  | 4                 |

**4. Sigmas serreadas**

|                 |                     |
|-----------------|---------------------|
| presentes ..... | <i>Paresperella</i> |
| ausentes .....  | 5                   |

**5. Exudação de muco**

|                                   |                        |
|-----------------------------------|------------------------|
| bastante acentuada .....          | <i>Aegogropila III</i> |
| ausentes ou pouco acentuada ..... | 6                      |

**6. Rafidotoxas**

|                 |                  |
|-----------------|------------------|
| presentes ..... | <i>Carmia II</i> |
| ausentes .....  | 7                |

**7. Forma da anisoquela-I**

|                        |                         |
|------------------------|-------------------------|
| A .....                | <i>Aegogropila I-II</i> |
| B .....                | <i>Carmia I</i>         |
| C .....                | 8                       |
| D (= curvoquela) ..... | 9                       |

**8. Sigmas**

|                       |                    |
|-----------------------|--------------------|
| uma categoria .....   | <i>Mycale II</i>   |
| duas categorias ..... | <i>Mycale IIIB</i> |

**9. Ráfides**

|                 |                    |
|-----------------|--------------------|
| ausentes .....  | <i>Mycale IIIC</i> |
| presentes ..... | <i>Mycale IIIA</i> |

Tabela 2.6. Comparação das características morfológicas entre os grupos de *Mycale* Gray, 1867 definidos neste trabalho.

|                               | Canais ectossomais   | Esqueleto ectossomal                         | Esqueleto coanossomal           | Exudação de muco           | Megasclera                          | Ráfides               | Toxas  |
|-------------------------------|----------------------|--|---------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|--|
| <b>Aegogropila I-II</b>       | podem estar visíveis | reticulado, na maioria, ou confuso           | plumoreticulado                 | ausente ou pouco acentuada | subtilóstilos (uma categoria)       | podem estar presentes | podem estar presentes em mais de uma categoria |
| <b>Aegogropila III</b>        | podem estar visíveis | reticulado, na maioria, ou não-especializado | plumoreticulado                 | bastante acentuada         | subtilóstilos (uma categoria)       | ausentes              | ausentes                                       |
| <b>Arenochalina</b>           | nao-visível          | não-especializado                            | reticulado                      | bastante acentuada         | subtilóstilos (uma categoria)       | ausentes              | ausentes                                       |
| <b>Carmia I</b>               | visíveis             | não-especializado                            | plumoreticulado                 | ausente                    | subtilóstilos (uma categoria)       | ausentes              | ausentes                                       |
| <b>Carmia II</b>              | visíveis             | não-especializado                            | plumoreticulado                 | ausente                    | subtilóstilos (uma categoria)       | Rafidotóxas           | ausentes                                       |
| <b>Mycale I</b>               | não-visível          | confuso                                      | plumoreticulado                 | ausente                    | subtilóstilos (duas categorias)     | presentes             | ausentes                                       |
| <b>Mycale II</b>              | não-visível          | confuso                                      | plumoreticulado                 | ausente                    | subtilóstilos (uma categoria)       | presentes             | ausentes                                       |
| <b>Mycale IIIA</b>            | não-visível          | confuso                                      | plumoreticulado                 | ausente                    | subtilóstilos (uma categoria)       | presentes             | ausentes                                       |
| <b>Mycale IIIB</b>            | não-visível          | confuso                                      | plumoreticulado                 | ausente                    | subtilóstilos (uma categoria)       | presentes             | ausentes                                       |
| <b>Mycale IIIC</b>            | não-visível          | confuso                                      | plumoreticulado                 | ausente                    | subtilóstilos (uma categoria)       | ausentes              | ausentes                                       |
| <b>Naviculina</b>             | visíveis             | reticulado                                   | plumoso                         | ausente                    | subtilóstilos (uma categoria)       | ausentes              | podem estar presentes                          |
| <b>Oxymycale Paresperella</b> | não-visível visíveis | reticulado reticulado                        | plumoreticulado plumoreticulado | ausente ausente            | óxeas subtilóstilos (uma categoria) | presentes ausentes    | ausentes uma ou mais categorias                |
| <b>Zygomycale</b>             | não-visível          | reticulado                                   | plumoreticulado                 | ausente                    | subtilóstilos (uma categoria)       | presentes             | uma categoria (toxodragmatas)                  |

Tabela 2.6. (continuação)

|                         | <b>Micróxeas</b>      | <b>Micra-cantóxeas</b> | <b>Isoquelas</b> | <b>Sigmas</b>                                   | <b>Anisoquelas</b>      | <b>Aniso-I</b> | <b>Aniso-II</b>        | <b>Aniso-III</b>             | <b>Rosetas</b>        |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|------------------|---|-------------------------|----------------|------------------------|------------------------------|-----------------------|
| <b>Aegogropila I-II</b> | ausentes              | podem estar presentes  | ausentes         | podem estar presentes em uma ou mais categorias | duas ou mais categorias | forma A        | Forma A ou B           | forma A, quando o caso       | podem estar presentes |
| <b>Aegogropila III</b>  | ausentes              | ausentes               | ausentes         | uma categoria                                   | duas ou mais categorias | forma A        | Forma A ou B           | Forma A ou B, quando o caso  | presentes             |
| <b>Arenochalina</b>     | ausentes              | ausentes               | ausentes         | uma categoria                                   | uma categoria           | forma B        | -                      | -                            | podem estar presentes |
| <b>Carmia I</b>         | ausentes              | ausentes               | ausentes         | uma categoria                                   | uma categoria           | forma B        | -                      | -                            | ausentes              |
| <b>Carmia II</b>        | podem estar presentes | ausentes               | ausentes         | duas ou mais categorias                         | três categorias         | forma B        | forma B                | forma B                      | ausentes              |
| <b>Mycale I</b>         | ausentes              | ausentes               | ausentes         | uma ou mais categorias                          | três categorias         | curvoquela     | forma A                | forma A                      | presentes             |
| <b>Mycale II</b>        | ausentes              | ausentes               | ausentes         | uma categoria                                   | duas categorias         | forma C        | forma A                | -                            | presentes             |
| <b>Mycale IIIA</b>      | ausentes              | ausentes               | ausentes         | duas categorias                                 | três categorias         | curvoquela     | forma A                | forma A                      | presentes             |
| <b>Mycale IIIB</b>      | ausentes              | ausentes               | ausentes         | duas categorias                                 | duas categorias         | forma C        | forma A                | -                            | presentes             |
| <b>Mycale IIIC</b>      | ausentes              | ausentes               | ausentes         | uma categoria                                   | três categorias         | curvoquela     | curvoquela             | forma A                      | presentes             |
| <b>Naviculina</b>       | ausentes              | ausentes               | ausentes         | duas categorias                                 | duas ou mais categorias | forma A        | naviculiquela          | naviculiquela, quando o caso | podem estar presentes |
| <b>Oxymycale</b>        | ausentes              | ausentes               | ausentes         | ausentes  | duas categorias         | forma C        | forma A                | forma A                      | ausentes              |
| <b>Paresperella</b>     | podem estar presentes | ausentes               | ausentes         | serreadas                                       | uma ou mais categorias  | forma A        | forma A, quando o caso | forma A, quando o caso       | ausentes              |
| <b>Zygomycale</b>       | ausentes              | ausentes               | presentes        | duas categorias                                 | duas categorias         | forma A        | forma A                | -                            | presentes             |

### 3 DA VARIABILIDADE POPULACIONAL DE *Mycale (Carmia) microsigmatosa* ARNDT, 1927

#### 3.1. Introdução

##### 3.1.1 Variabilidade e delimitação de espécies

A variabilidade é o intervalo de possíveis valores ou estados para qualquer característica observada em uma determinada espécie, seja ela morfológica, bioquímica, genética, comportamental ou outras. As diferenças encontradas neste intervalo, sejam elas intra- ou interpopulacionais, podem ser triviais ou importantes, transitórias ou permanentes, e normalmente descrevem o quanto uma característica tende a variar em resposta a influências ambientais e genéticas ao longo do tempo e espaço. A variabilidade é um importante fator no processo evolutivo, uma vez que afeta a resposta de um indivíduo a alterações nas condições ambientais e, assim, pode levar a sobrevivência diferencial de organismos de uma população devido à ação da seleção natural sobre as variantes com maior adaptabilidade. Em populações naturais, é um fator determinante de biodiversidade, uma vez que, sem esta, as populações se tornam mais estáticas à adaptação a mudanças no ambiente, e, por conseguinte, mais propensas à extinção (ROSE e LAUDER, 1996).

Contudo, a variabilidade inerentemente impõe uma dificuldade no processo de delimitação de espécies. Dado que as espécies são identificadas com base em seus valores ou estados de suas características, e que espécies filogeneticamente próximas tendem a apresentar similaridade entre si para os mesmos – 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, assim, impossível uma delimitação clara entre a variabilidade intraespecífica e a interespecífica.

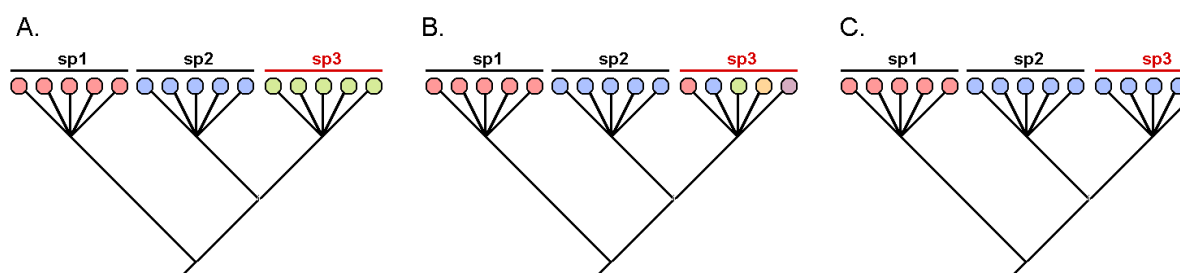


Figura 3.1. Ilustração dos efeitos da plasticidade fenotípica e da ocorrência de espécies crípticas sobre a diversidade. A. Relação evolutiva entre três espécies hipotéticas (sp1, sp2 e sp3), cada qual com uma característica diagnóstica, ilustrando um cenário sem quaisquer um dos fenômenos em questão. B. Relação evolutiva entre três espécies hipotéticas, ilustrando o fenômeno de plasticidade fenotípica, a qual ocorre em sp3, cujos os 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 que morfológicos, como moleculares, bioquímico, ecológicos, etc.

Em esponjas, o principal motivador do estudo da variabilidade se deve justamente a tentativas de impor limites à variação entre as espécies. A sistemática do grupo é altamente dependente de características morfológicas esqueléticas, que são conhecidamente plásticas, e ao mesmo tempo, o baixo número de descritores morfológicos disponíveis para a taxonomia de algumas espécies de esponjas dificulta a delimitação entre linhagens evolutivas independentes, constatadas por dados moleculares (e.g., KLAUTAU *et al.*, 1999; ZILBERBERG *et al.*, 2006; BLANQUER e URIZ, 2008; XAVIER *et al.*, 2010; DE PAULA *et al.*, 2012) 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 única espécie, enquanto que de outro, espécies crípticas decorrem de uma baixa diversidade entre espécies diferentes (Figura 3.1).

Existem várias hipóteses com diferentes graus de suporte que explicam a ocorrência destes dois fenômenos. A plasticidade fenotípica geralmente está associada a condições ambientais diversas, sejam elas físicas, químicas ou biológicas, a que uma espécie pode estar sujeita, as quais podem atuar como fatores no desenvolvimento das características morfológicas destas espécies. A literatura está repleta de exemplos de fatores ambientais que influenciam características morfológicas de esponjas. 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; BELL *et al.*, 2002; HILL e HILL, 2002; CARBALLO *et al.*, 2006). Em outros casos, a associação com microorganismos simbiotes pode influenciar a coloração das esponjas hospedeiras (e.g., CALCINAI *et al.*, 2006). E mesmo a disponibilidade de recursos podem vir a influenciar certas características, como a concentração de sílica dissolvida na água, um fator que por si só pode variar devido a temperatura e pH, que pode levar a variações na morfologia das espículas, e até mesmo, promover a síntese de novas espículas normalmente não encontradas em certas espécies (MALDONADO *et al.*, 1999). Muitas outras espécies de esponjas são reportadas apresentando um alto grau de plasticidade fenotípica. As espécies *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) se encontram entre alguns dos mais notórios casos de plasticidade no Atlântico Tropical Ocidental (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 desencadeadores desta plasticidade ainda são desconhecidos.

Por sua vez, a ocorrência de espécies crípticas ainda precisa ser melhor investigada em esponjas, e postuladamente, processos completamente diferentes podem estar envolvidos no aparecimento destas. Algumas das potenciais causas do aparecimento de espécies crípticas seriam: i) restrições no desenvolvimento de características morfológicas, e retenção de formas simplesiomórficas em linhagens para- e monofiléticas; ii) convergência evolutiva associada ao baixo número de descritores em linhagens polifiléticas; iii) cladogênese promovida por derivações em processos de isolamento populacional, tais como sinalizadores químicos e ciclos de vida, sem modificação de características taxonomicamente importantes (e.g., KNOWLTON, 1993); iv) ocorrência de polimorfismos e/ou plasticidade em características conservadas entre espécies, promovendo uma variabilidade intraespecífica maior do que interespecífica (e.g., XAVIER *et al.*, 2010; DE PAULA *et al.*, 2012); v) eventos cladogenéticos recentes a partir dos quais as linhagens segregantes ainda estão em processo de anagênese (e.g., DE PAULA *et al.*, 2012); entre outros.

### 3.1.2 Variabilidade em *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927

A espécie *Mycale (Carmia) microsigmatosa* é uma das esponjas do gênero *Mycale* mais abundantes na costa brasileira e no Atlântico Tropical Ocidental (VAN SOEST, 1984; HAJDU e RÜTZLER, 1998; MURICY e HAJDU, 2006). Esta espécie é frequentemente reportada incrustando raízes em manguezais, algas calcáreas, conchas de moluscos, substratos artificiais e em associação com espécies de octocorais, como as dos gêneros *Carijoa* e *Palythoa*, é hospedeira de uma diversa gama de invertebrados epi- e endobióticos (RIBEIRO *et al.*, 2003), além de apresentar uma alta tolerância à poluição (MURICY, 1989).

Os indivíduos de *M. (C.) microsigmatosa* apresentam, comumente, uma forma de crescimento incrustante, com até três centímetros (cm) de espessura (Figura 3.2.A e D), salvo se associados à simbiontes (C e E). Sua coloração varia do vermelho-carmim ao alaranjado, ou mais raramente amarelado, podendo às vezes apresentar pontos ou tons azulados. A superfície dessas esponjas é geralmente lisa e desprovida de reticulações, mas podem apresentar irregularidades sobretudo na presença de simbiontes. Os ósculos são circulares, com diâmetros de até um cm, e podem estar localizadas no topo de discretas elevações, usualmente circundados por uma membrana com bordas finas e translúcidas. A consistência destas esponjas é normalmente macia e compressível, além de ser facilmente rasgável, mas pode ser firme em decorrência da presença de simbiontes.

Esta espécie carece de especialização ectossomal do esqueleto, e algumas poucas espículas podem ser vistas tangencialmente à membrana superficial. O esqueleto coanossomal desses animais é composto por feixes ascendentes de espículas, cuja espessura e sinuosidade se mostra bastante variável, que se ramificam e anastomosam em um padrão plumoreticulado (Figura 3.2.F.i). Compostos por subtilóstilos e uma proporção variável de espongina, estes feixes divergem e se expandem em tufos próximos à superfície, os quais sustentam e perfuram levemente o ectossoma.

As megascleras em *M. (C.) microsigmatosa* se restringem a uma única categoria de subtilóstilos (Figura 3.2.F.ii), cujas dimensões apresentam uma certa variação entre populações (Tabela 3.1). As microscleras encontradas nestas esponjas são de dois tipos, sigmas e anisoquelas palmadas (Figura 3.2.F.iii e iv, respectivamente), também em uma única categoria de tamanho, sendo que as primeiras se encontram dispersas por toda a esponja, e possuem uma abundância variável, enquanto que as últimas podem ser extremamente raras em alguns indivíduos.



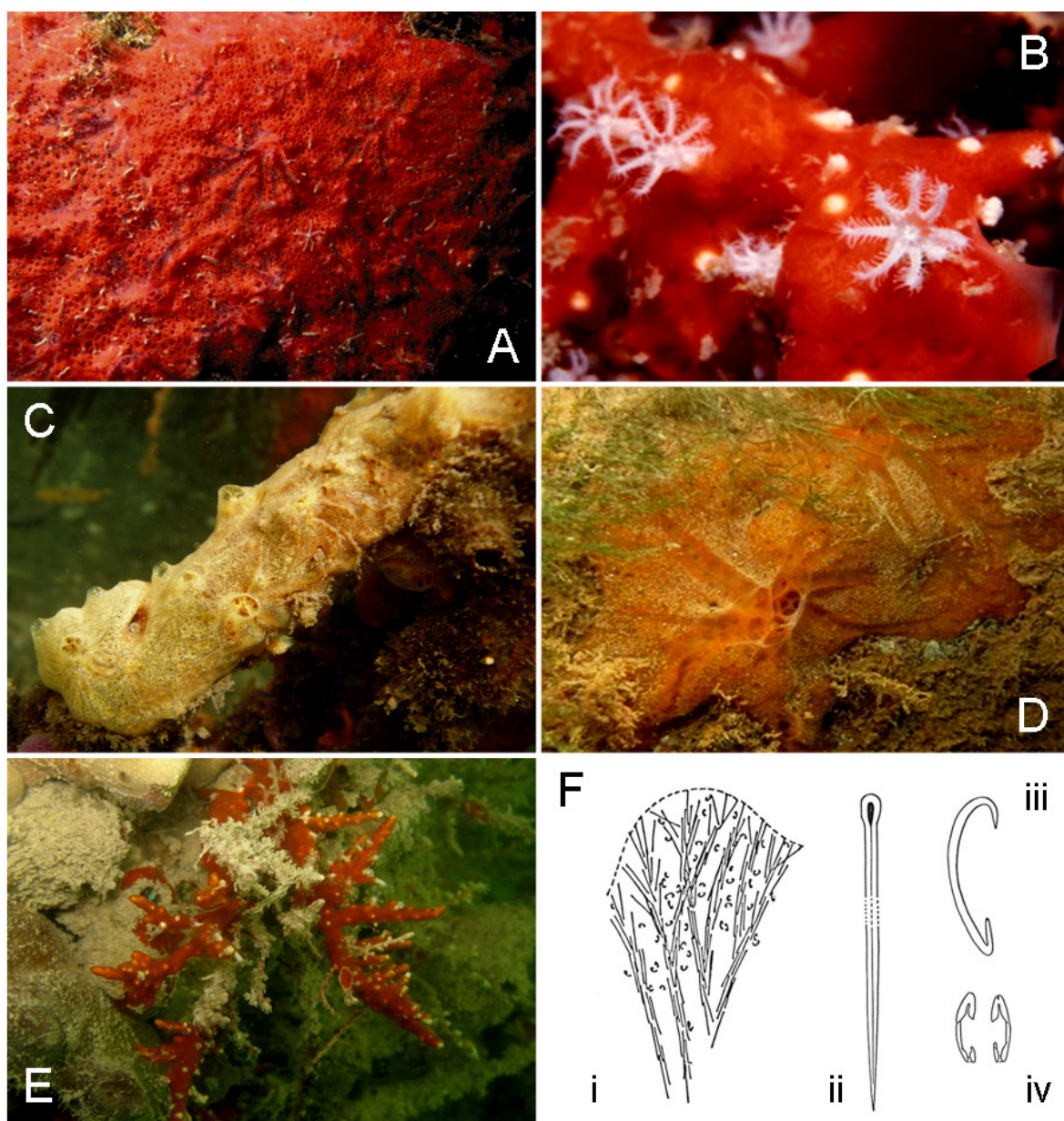


Figura 3.2. Variação morfológica, arquitetura esquelética e tipos espiculares encontrados em *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. A-E. Fotografias subaquáticas *in situ* de indivíduos de *M. (C.) microsigmatosa* expressando a variabilidade de formas de crescimento (incrustante, A e D; associados a simbioses: corais, B e E, e raízes de mangue, C) e cores (vermelho, A e B; alaranjado, D e E; amarelado, C), além de outros detalhes, como ósculos e canais subectossomais. F. Ilustrações esquemáticas da arquitetura e elementos do esqueleto de *M. (C.) microsigmatosa*. i) esqueleto plumoreticulado. ii) subtilóstilo. iii) sigma. iv) anisoquela palmada. Crédito das fotografias e ilustrações: A e D, E, Hajdu; B, J. P. Cauduro; C, R. Collins (STRI File Refer. No. #46473); E, S. Zea; F, Muricy e Hajdu (2006).

### 3.1.3 Espécies correlatas a *M. (C.) microsigmatosa* e sua variabilidade

Nos capítulos anteriores foi demonstrada a existência de um clado que agrupa *M. (C.) microsigmatosa* com outras espécies morfológicamente similares, sem qualquer resolução filogenética entre elas. Este foi proposto inicialmente corresponder a um complexo de espécies, o complexo *M. (C.) microsigmatosa*, que abarcaria, adicionalmente, as espécies *M. (C.) cecilia* de Laubenfels, 1936, *M. (C.) fistulifera* (Row, 1911) e *M. (C.) phyllophila* Hentschel, 1911 (Capítulo 1). Foi argumentado, posteriormente, que este complexo, por semelhança morfológica, poderia ainda incluir outras espécies de *Carmia*, podendo vir inclusive a ser considerado em um táxon a parte (= "*Tenuicarmia*") (Capítulo 2). Como observado na Tabela 3.2, as diferenças morfológicas entre estas espécies correlatas são sutis no que concerne as dimensões de suas espículas, sendo estas espécies praticamente idênticas em relação as demais características que apresentam.

Estas esponjas estão distribuídas ao redor de todo o globo, sendo encontradas majoritariamente em regiões tropicais. Considerando a perspectiva de que muitas espécies marinhas nos últimos anos têm apresentado uma alta dispersão por ação antrópica, levando em alguns casos a problemas graves de bioinvasão (CARLTON, 1987, 1989), uma análise da

Tabela 3.1. Comparação entre as dimensões espiculares de diferentes populações de *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. As entradas estão em ordem cronológica a partir da descrição original da espécie. As localidades das populações (Pop.) analisadas em cada trabalho estão indicadas. Os valores (em  $\mu\text{m}$ ) disponíveis na literatura mínimos (min), médios (med) e máximos (max) do comprimento de cada espícula estão listados, e, no caso dos subtilóstilos também a largura (segunda linha).

| Referência                    | Pop.    | Subtilóstilos |     |     | Sigmas |     |     | Anisoquelas |     |     |
|-------------------------------|---------|---------------|-----|-----|--------|-----|-----|-------------|-----|-----|
|                               |         | min           | med | max | min    | med | max | min         | med | max |
| Arndt, 1927                   | Curaçao | 250           | -   | 294 | 32     | -   | 38  | 8           | -   | 19  |
| van Soest, 1984               | Caribe  | 232           | 261 | 288 | 33     | 36  | 42  | 12          | 16  | 21  |
| Hajdu e Boury-Esnault, 1991   | RJ      | 180           | 215 | 252 | 23     | 28  | 34  | 11          | 12  | 15  |
| Hajdu e Rützler, 1998         | Caribe  | 213           | 250 | 288 | 25     | 35  | 45  | 14          | 16  | 24  |
| Custódio <i>et al.</i> , 2002 | SP      | 185           | -   | 246 | 23     | -   | 34  | 14          | -   | 21  |
| Muricy e Hajdu, 2006          | RJ e SP | 180           | -   | 252 | 23     | -   | 34  | 11          | -   | 15  |
| Hajdu <i>et al.</i> , 2011    | BA      | 183           | -   | 264 | 18     | -   | 43  | 8           | -   | 13  |
| Moraes, 2011                  | ES      | 206           | 233 | 254 | 22     | 29  | 32  | 15          | -   | 17  |

variabilidade de *M. (C.) microsigmatosa* deve levar em conta a possibilidade de que estas espécies próximas possam corresponder a uma única espécie cosmopolita. E as ligeiras variações morfológicas entre estas populações poderiam advir de diferenças em condições ambientais que promoveriam uma plasticidade fenotípica moderada nestas. Todavia, cada vez mais trabalhos têm demonstrado a inexistência de tais espécies amplamente distribuídas em esponjas, as quais estão dando lugar a espécies crípticas com áreas de distribuição restritas (e.g., KLAUTAU *et al.*, 1999; XAVIER *et al.*, 2010; DE PULA *et al.*, 2012).

Tabela 3.2. Comparação entre as características morfológicas de *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927 com outras espécies correlatas. As entradas estão em ordem alfabética a partir da espécie *M. (C.) microsigmatosa*. As localidades-tipo de cada espécie estão indicadas. A cor das espécies é dada segundo as abreviaturas: vermelho (V); laranja (L); amarelo (A); cinza (C); verde (Vd). Os valores (em  $\mu\text{m}$ ) disponíveis na literatura mínimos (min), médios (med) e máximos (max) do comprimento de cada espícula estão listados, e, no caso dos subtilóstilos também a largura (segunda linha). Anisoquelas postuladamente em duas categorias estão listadas em linhas diferentes.

| Espécie   | Localidade-tipo      | Cor   | Subtilóstilos |     |     | Sigmas |     |     | Anisoquelas |     |     |
|---|----------------------|-------|---------------|-----|-----|--------|-----|-----|-------------|-----|-----|
|   |                      |       | min           | med | max | min    | med | max | min         | med | max |
| <i>M. (C.) microsigmatosa</i><br>Arndt, 1927                | Curaçao              | V-L-A | 250           | -   | 294 | 32     | -   | 38  | 8           | -   | 19  |
| <i>M. (C.) cecilia</i><br>de Laubenfels, 1936               | Panamá<br>(Pacífico) | Vd    | -             | 300 | -   | -      | 30  | -   | 12          | -   | 15  |
|   |                      |       | 7             | -   | 10  | -      | -   | 22  | -           | 25  |     |
| <i>M. (C.) fistulifera</i><br>(Row, 1911)                   | Mar<br>Vermelho      | V-L   | -             | 250 | -   | 35     | -   | 40  | -           | 23  | -   |
|   |                      |       | -             | 2   | -   | -      | -   | -   | -           | -   |     |
| <i>M. (C.) hentscheli</i><br>(Bergquist &<br>Fromont, 1988) | Nova<br>Zelândia     | V-R   | 198           | -   | 270 | 21     | -   | 30  | 13          | -   | 20  |
|   |                      |       | 3             | -   | 7.5 | -      | -   | 20  | -           | 26  |     |
| <i>M. (C.) lissochela</i><br>Bergquist, 1965                | Indonésia            | -     | 221           | 252 | 275 | 19     | 34  | 40  | 13          | 16  | 20  |
|   |                      |       | 3             | 3.5 | 4.5 | -      | -   | -   | -           | -   |     |
| <i>M. (C.) phyllophila</i><br>Hentschel, 1911               | Austrália            | V-L-A | 206           | -   | 259 | 31     | -   | 40  | 11          | -   | 12  |
|   |                      |       | 4             | -   | 5   | -      | -   | 19  | -           | 20  |     |
| <i>M. (C.) sanguinea</i><br>Tsuramal, 1969                  | Israel               | V-L   | 200           | -   | 330 | 26     | -   | 45  | 12          | -   | 24  |
|   |                      |       | 2             | -   | 6.5 | -      | -   | -   | -           | -   |     |
| <i>M. (C.) senegalensis</i><br>Lévi, 1952                   | Senegal              | C     | 220           | -   | 280 | 30     | -   | 40  | 20          | -   | 22  |
|   |                      |       | -             | -   | -   | -      | -   | -   | -           | -   |     |
| <i>M. (C.) tenuispiculata</i><br>(Dendy, 1905)              | Índia                |       | -             | 72  | -   | -      | -   | -   | -           | -   | -   |
|   |                      |       | -             | 1   | -   | -      | -   | -   | -           | -   |     |

### 3.1.4 Objetivos

- Estimar a variabilidade genética do complexo *Mycale* (*Carmia*) *microsigmatosa* Arndt, 1927 por meio de análise de haplótipos do gene 16S do RNAr mitocondrial;
- E correlacionar a variabilidade morfológica deste grupo, estimada por meio de dimensões espiculares, com fatores genéticos e geográficos.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Material examinado

As amostras utilizadas para estimar a variabilidade populacional de *Mycale (C.) microsigmatosa* Arndt, 1927 estão listadas no Apêndice A.1. Geograficamente, as amostras estão distribuídas da seguinte forma: Rio de Janeiro (RJ; N = 30, sendo que destas, seis correspondem a amostras coletadas em Angra dos Reis em 1992, duas em Búzios em 1999, e as demais coletadas em Angra dos Reis em 2010), Bahia (BA; N = 4, coletadas em 1992), Alagoas (AL; N = 6, em 2010) e Panamá (Pan; N = 5, em 2012). Foram ainda incluídas amostras de *Mycale (C.) cecilia* (N = 2) e *Mycale (C.) phyllophila* (N = 1) do Havaí (Hav) por estas terem apresentado os mesmos haplótipos encontrados em *M. (C.) microsigmatosa* em análises anteriores (Capítulo 1), constituindo o que, no âmbito deste trabalho, foi determinado como complexo *M. (C.) microsigmatosa*.

### 3.2.2 Extração, amplificação, sequenciamento, edição e alinhamento de DNA

Os procedimentos para análise molecular das amostras do complexo *M. (C.) microsigmatosa* seguiram de acordo com o explicitado no Capítulo 1 deste trabalho. Brevemente: i) as amostras foram triadas e o DNA foi purificado segundo o protocolo modificado baseado em adsorção por sílica (DE PAULA, 2009); ii) foi amplificada a região 16S do DNA mitocondrial utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Lavrov e colaboradores (2008), que por sua vez foram sequenciados por serviço terceirizado na Macrogen, Inc.; iii) as sequências complementares de cada amostra foram editadas com o programa DNASTAR<sup>®</sup> SeqMan<sup>®</sup> 7.1 e alinhadas com o programa MAFFT v6.935 (KATO et al., 2002).

### 3.2.3 Análise de haplótipos

As sequências de 16S do complexo *M. (C.) microsigmatosa* foram colapsadas em haplótipos a partir da topologia da árvore reconstruída com o método de Agrupamento de Vizinhos (NJ, do inglês *Neighbor Joining*), usando o número de diferenças de nucleotídeos como modelo de distância, por meio do programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). O alinhamento não apresentou posições contendo intervalos a serem removidos. Os haplótipos foram nomeados com letras do alfabeto latino em ordem decrescente de frequência, tendo

sido utilizado como critério de desempate a frequência na localidade em comum com maior número de sequências.

As frequências dos haplótipos, e sua distribuição entre as localidades, foram tabuladas. A relação entre os haplótipos foi estimada a partir da genealogia das sequências de 16S por meio do método de parcimônia estatística, com 95% de confiança no limite de conexão, usando o programa TCS v1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000). Este método avalia os limites de parcimônia entre as sequências, i.e., o número de passos mutacionais que podem ser inferidos com segurança sem ter que se preocupar com substituições múltiplas, e constrói uma árvore não-enraizada a partir do conjunto de cladogramas parcimoniosos e não-parcimoniosos que é consistente com estes limites (TEMPLETON *et al.*, 1992).

Por meio de testes de qui-quadrado, foi avaliado se a frequência observada dos haplótipos diferiu dos modelos esperados: i) de igual frequência entre os haplótipos observados; e ii) dada uma distribuição igual entre todos os haplótipos. Para tal, um teste exato de probabilidade foi estimado por meio de cadeias de Markov, com 10.000 réplicas, usando o programa SYSTAT<sup>®</sup> 13. Foram estimados os valores de diversidade haplotípica (H, uma medida da unicidade de haplótipos em uma população) e nucleotídica ( $\pi$ , o número médio de diferenças de nucleotídeos por sítio entre pares de sequências em uma população) (NEI, 1987), assim como outros parâmetros de diversidade, para cada localidade, usando o programa DnaSP v5.1 (LIBRADO e ROZAS, 2009).

A fim de verificar diferenciação populacional, foi aplicado o teste de Fisher para tabelas de contingência RxC, onde cada fileira (R) representa um haplótipo e cada coluna (C) uma localidade (RAYMOND e ROUSSET, 1995). A hipótese nula ( $H_0$ ), i.e., a independência entre as variáveis nas fileiras e colunas, corresponde a uma ausência de diferenciação entre as populações. O teste exato de probabilidade foi estimado por meio de cadeias de Markov com 10.000 réplicas, usando o programa SYSTAT<sup>®</sup> 13. Também foi feito um teste de diferenciação populacional com base na estatística de haplótipos (HUDSON *et al.*, 1992), definida como:  $H_{st} = 1 - (H_s/H_t)$ , onde  $H_s$  é a média ponderada das diversidades haplotípicas estimadas nas subpopulações e  $H_t$  é a estimativa da diversidade haplotípica do total da população. A estatística de haplótipos foi estimada com 1.000 permutações usando o programa DnaSP v5.1 (LIBRADO e ROZAS, 2009). As análises de diferenciação foram feitas entre todas as populações e entre pares de localidades. Nas últimas, foi estimado o índice de fixação ( $F_{st}$ ) entre as localidades, definido como:  $F_{st} = 1 - (\pi_s/\pi_t)$  onde  $\pi_s$  e  $\pi_t$  representam o número médio de diversidade nucleotídica entre pares de sequências de

indivíduos de populações diferentes ( $\pi$ ) e da mesma população ( $\pi_s$ ) (HUDSON *et al.*, 1992). Estes valores foram utilizados para elaboração de uma matriz de distância da qual derivou um dendrograma por UPGMA usando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011).

#### 3.2.4 Variabilidade morfológica

Devido à maior parte das amostras utilizadas nesta parte do trabalho terem sido coletadas, sobretudo para fins de obtenção de dados moleculares, o que implicou em uma menor quantidade de tecido amostrado em campo, algumas amostras não apresentaram material suficiente a fim de serem utilizadas para dissociação de espículas. No total, 14 amostras não puderam ter uma caracterização morfológica detalhada, sendo destas, uma amostra de AL, quatro da BA, e nove do RJ.

A estimativa de diversidade morfológica foi feita por meio da variabilidade espicular das amostras. Para tal, foram feitas dissociações de espículas por meio da digestão do tecido de cada amostra utilizando solução de cloro 6%. Estas foram visualizadas em microscópio óptico (BIOVAL) com ocular micrometrada. No mínimo dez espículas de cada tipo para cada amostra foram mensuradas, com exceção para algumas amostras, cujas anisocelas se mostraram relativamente raras.

As medidas tomadas foram: o comprimento total do subtilóstilo (L), a largura máxima do subtilóstilo (W), a largura máxima da cabeça do subtilóstilo (T), o comprimento total da sigma (S), e o comprimento total da anisocela (A). Também foi calculada a proporção da largura máxima da cabeça do subtilóstilo em relação à largura máxima do subtilóstilo (T/W). Esta razão indica a diferente proporção de biodeposição de sílica na extremidade do subtilóstilo e na sua porção mediana. Após conversão das medidas em seus valores reais, com exceção da razão T/W, que é adimensional, estes foram utilizados como variáveis nas análises subsequentes. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa StatSoft® STATISTICA® 7. O programa Microsoft® Excel® 2003 foi utilizado na tabulação dos dados e eventualmente na geração de gráficos.

Para cada uma das amostras foi calculada a média de cada variável, assim como seu desvio-padrão, tendo como base o número de espículas medidas por indivíduos. Estes foram agrupados tanto em relação ao seu haplótipo quanto à sua localidade (ver abaixo; ver também Apêndice A). Foram feitas correlações entre os todos os parâmetros, a fim de determinar suas interações. A fim de estimar diferenças morfológicas devido a fatores genéticos e geográficos, foram feitos teste multivariados de significância (MTS, do inglês *Multivariate Tests of*

*Significance*) utilizando as variáveis descritas acima como dependentes e os haplótipos e as localidades como categóricas em separado. De forma a retirar o efeito de uma categórica da outra, a análise entre os haplótipos foi feita somente com indivíduos da mesma localidade, e as análises entre as localidades somente com indivíduos do mesmo haplótipo. Devido ao baixo número amostral de certos haplótipos e/ou localidades, somente quatro análises de MTS foram realizadas. A primeira (MTS1), entre quatro haplótipos do Rio de Janeiro, considerou apenas a variabilidade dos subtilóstilos (L, W, T e T/W) como variáveis dependentes, enquanto que a segunda (MTS2), assim como as demais, considerou todas as variáveis, porém com um haplótipo a menos. A terceira análise (MTS3) foi realizada entre três localidades do haplótipo A, e a quarta (MTS4) entre duas localidades do haplótipo B. Para cada análise foi realizado também testes univariados a fim de determinar quais variáveis dependentes apresentaram diferenças entre os grupos. Quando as variáveis categóricas apresentaram mais de dois grupos, o teste *post hoc* de Bonferroni foi empregado a fim de determinar quais destes se diferenciavam entre si.

Uma classificação entre os indivíduos com base nas suas similaridades morfológicas foi feita a partir de uma análise de agrupamento, utilizando tanto as médias quanto os desvios-padrão das variáveis. Os valores de desvios-padrão foram incluídos na análise de forma a considerar a variabilidade dos parâmetros morfológicos como informação útil. Uma análise igual foi feita desconsiderando esta informação. As análises de agrupamento foram feitas usando o algoritmo de ligação completa entre os casos e com a medida de distância  $d = 1 - r$ . Dado que diferentes algoritmos de amalgamação e medidas de distância resultam em agrupamentos diferentes, se justifica que os parâmetros de análise realizados tomam como base que: i) na ligação completa (do inglês, *Complete linkage*) as distâncias entre os grupos são determinadas pela maior distância entre quaisquer dois objetos em grupos diferentes (i.e., pelos vizinhos mais distantes). Este método apresenta bons resultados em casos onde os objetos efetivamente formam grupos distintos naturais; e que ii) a distância baseada no coeficiente de correlação de Pearson é utilizada para agrupar os objetos com base na similaridade de seus comportamentos, independente de seus valores absolutos. A classificação produzida foi contrastada com os grupos formados tanto pelos haplótipos quanto pelas localidades.



### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Análise de haplótipos

No total, foram obtidas 48 sequências de 550 nt do gene 16S do complexo *M. (C.) microsigmatosa*. Nestas, apenas cinco posições se mostraram variáveis (Tabela 3.3), determinando seis haplótipos (nomeados A - F), cujas frequências e distribuição entre as localidades podem ser vista na Tabela 3.4. O haplótipo A (N = 15), foi o que apresentou maior distribuição, não encontrado na Bahia, seguido pelo haplótipo B (N = 11), não encontrado na BA e Panamá. Os haplótipos C e D (ambos com N = 9), foram encontrados na BA e Rio de Janeiro. Já os haplótipos E (N = 3) e F (N = 1) foram somente encontrados em uma única localidade, RJ e BA, respectivamente (Figura 3.3). A análise de relação entre os haplótipos revelou que os haplótipos B – E derivam, cada um, do haplótipo A por apenas um único passo mutacional, enquanto que o haplótipo F deriva do D por também um passo mutacional, totalizando dois passos entre o haplótipo A e o F (Figura 3.4).

Embora as frequências entre os seis haplótipos encontrados no complexo *M. (C.) microsigmatosa* sejam estatisticamente diferentes ( $\chi^2 = 16.75$ ;  $df = 5$ ;  $p = 0,005$ ;  $P_{MC} = 0,006$ ), em cada localidade, as frequências dos haplótipos encontrados (Tabela 3.4) se mostraram iguais entre si, não diferindo dos valores esperados (Modelo I; Tabela 3.5). Da mesma forma, a distribuição de frequência observada dos haplótipos no Havaí, Bahia e Rio de Janeiro não foi diferente dos valores esperados caso os seis haplótipos apresentassem igual

Tabela 3.3. Resumo das posições variáveis do gene 16S do DNA mitocondrial entre os haplótipos encontrados no complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. As posições indicadas, orientadas na vertical, correspondem apenas àquelas variáveis dado o alinhamento de 550 nucleotídeos obtidos para o gene 16S. Os nucleotídeos são indicados de acordo com o código de nucleotídeos da IUPAC: A, Adenina; C, Citosina; G, Guanina; e T, Timina. Os sítios conservados em relação à sequência de referência do haplótipo A são indicado por um ponto (.). Ver texto para mais detalhes.

| Haplótipo | Posição |   |   |   |   |
|-----------|---------|---|---|---|---|
|           | 2       | 2 | 3 | 3 | 3 |
|           | 0       | 9 | 1 | 3 | 4 |
|           | 8       | 0 | 5 | 6 | 3 |
| A         | A       | T | C | A | G |
| B         | G       | . | . | . | . |
| C         | .       | . | T | . | . |
| D         | .       | . | . | G | . |
| E         | .       | . | . | . | A |
| F         | .       | A | . | G | . |

Tabela 3.4. Frequência e distribuição dos haplótipos de 16S encontrados no complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. As colunas indicam as localidades, abreviadas como: Hav, Havaí; Pan, Panamá; AL, Alagoas; BA, Bahia; e RJ, Rio de Janeiro. As fileiras indicam os haplótipos (A-F). Números reais em contagem. Os totais se referem às localidades (horizontal) e haplótipos (vertical). Ver texto para mais detalhes.

| Haplótipo | Localidade |     |    |    |    | Total |
|-----------|------------|-----|----|----|----|-------|
|           | Hav        | Pan | AL | BA | RJ |       |
| A         | 2          | 5   | 1  | 0  | 7  | 15    |
| B         | 1          | 0   | 5  | 0  | 5  | 11    |
| C         | 0          | 0   | 0  | 1  | 8  | 9     |
| D         | 0          | 0   | 0  | 2  | 7  | 9     |
| E         | 0          | 0   | 0  | 0  | 3  | 3     |
| F         | 0          | 0   | 0  | 1  | 0  | 1     |
| Total     | 3          | 5   | 6  | 4  | 30 | 48    |

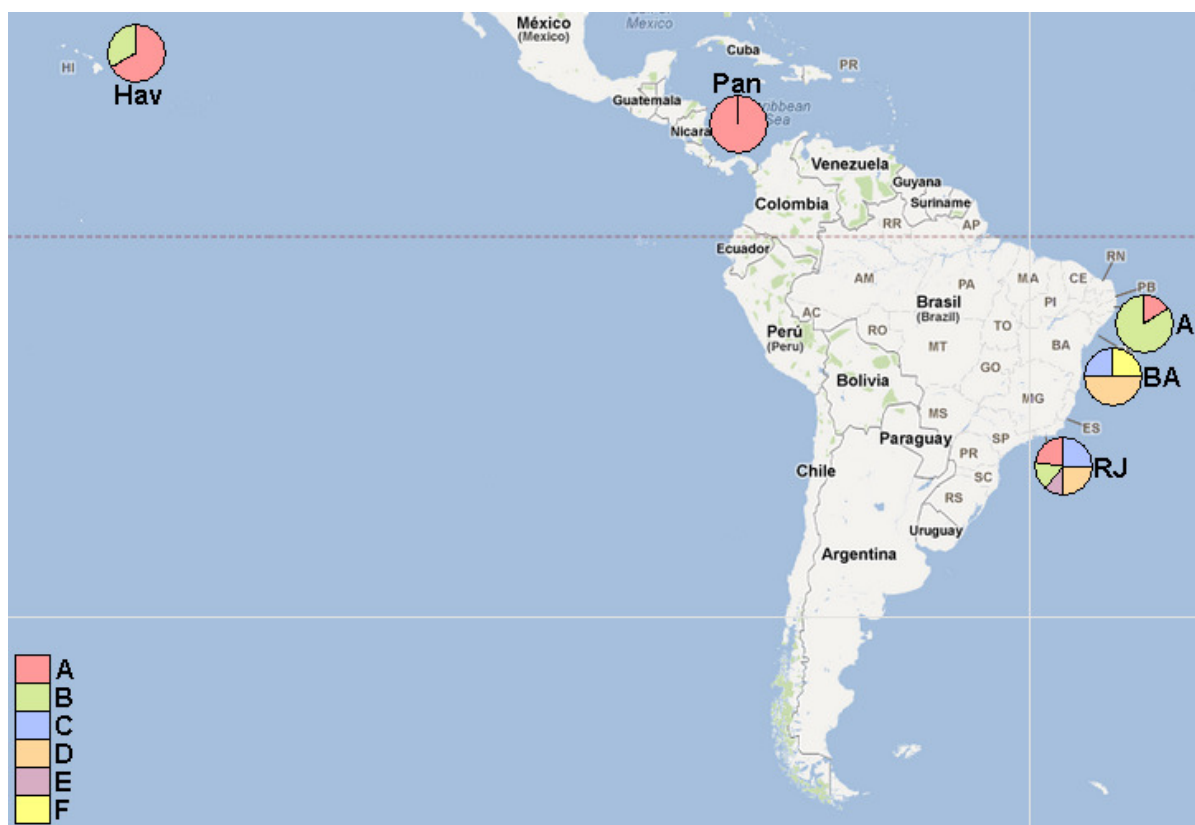


Figura 3.3. Distribuição geográfica dos haplótipos do gene 16S do DNA mitocondrial do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. A frequência dos haplótipos em cada localidade está indicada por gráficos de setores. As localidades estão abreviadas como: Hav, Havaí; Pan, Panamá; AL, Alagoas; BA, Bahia; e RJ, Rio de Janeiro. A legenda indica os haplótipos, a saber: A (vermelho), B (verde), C (azul), D (laranja), E (roxo) e F (amarelo). Ver texto para mais detalhes.

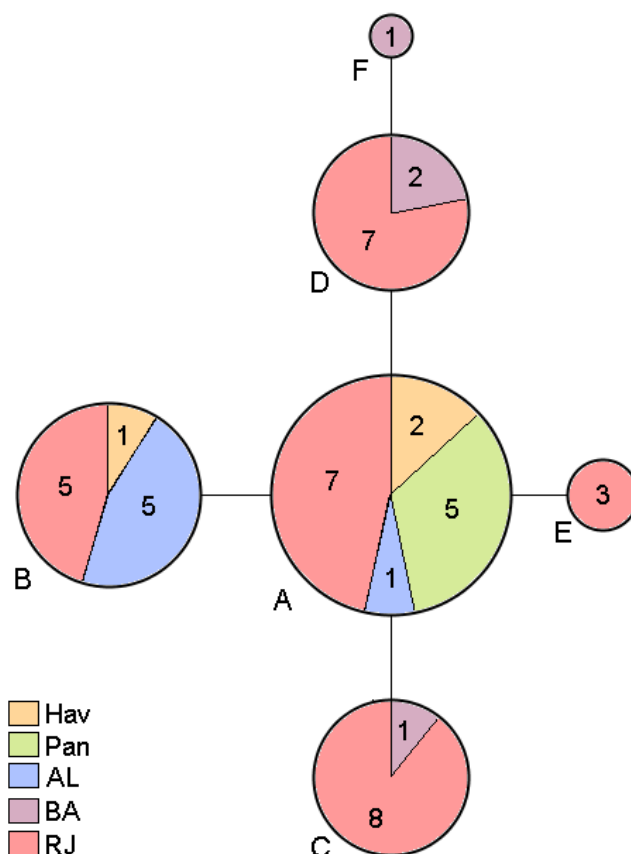


Figura 3.4. Rede de haplótipos baseada no gene 16S do DNA mitocondrial do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. Rede de haplótipos gerada a partir de 48 sequências por meio do método de parcimônia estatística, com 95% de confiança no limite de conexão, usando o programa TCS v1.21. Os haplótipos estão indicados a esquerda e abaixo de cada círculo. A frequência das localidades está indicada por gráficos de setores (valores absolutos indicados no centro). Círculos desenhados em escala de frequência. A legenda indica as localidades dos haplótipos, abreviadas como: Hav, Havaí (laranja); Pan, Panamá (verde); AL, Alagoas (azul); BA, Bahia (roxo); e RJ, Rio de Janeiro (vermelho). Ver texto para mais detalhes.

proporção em cada localidade (Modelo II; Tabela 3.5). Contudo, no Panamá e em Alagoas, as frequências observadas são significativamente diferentes de uma distribuição homogênea dos seis haplótipos ( $\chi^2_{Pan} = 25$ ;  $df_{Pan} = 5$ ;  $p_{Pan} = 0,000$ ;  $\chi^2_{AL} = 20$ ;  $df_{AL} = 5$ ;  $p_{AL} = 0,001$ ), apresentando altas frequências dos haplótipos A e B, respectivamente, e nenhuma ou muito baixa de outros.

As diversidades haplotípica ( $H$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) se mostraram bastantes divergentes entre as localidades (Tabela 3.6), onde as menores diversidades foram encontradas no Panamá ( $H = 0,000$ ;  $\pi = 0,0000$ ) e as maiores no Rio de Janeiro ( $H = 0,809$ ;  $\pi = 0,0023$ ). A diversidade haplotípica e nucleotídica total no complexo *M. (C.) microsigmatosa* foram iguais a 0,792 e 0,0021, respectivamente. Os testes de diferenciação populacional mostraram que há

Tabela 3.5. Sumário dos testes de qui-quadrado para cada localidade de ocorrência dos haplótipos de 16S do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. O teste foi feito entre a frequência observada dos haplótipos em cada localidade (Tabela 3.4) e a esperada pelos modelos: i) de igual frequência entre os haplótipos observados; e ii) dada uma distribuição igual entre todos os haplótipos encontrados no complexo. Nas colunas, os parâmetros: número total de sequências (N); número de haplótipos observados (ho); número total de haplótipos encontrados no complexo *M. (C.) microsigmatosa* (ht = 6); valores esperados para os haplótipos observados dado o modelo N/ho (Esp.I); valores esperados para os haplótipos observados dado o modelo N/ht (Esp.II); valor do qui-quadrado de Pearson ( $x^2$ ); graus de liberdade (df, do inglês *degree of freedom*); valor-p assintótico do teste de qui-quadrado (p); valor-p do teste exato de probabilidade estimado por cadeias de Markov (p<sub>MC</sub>). As localidades (Local.), abreviadas como: Hav, Havaí; Pan, Panamá; AL, Alagoas; BA, Bahia; e RJ, Rio de Janeiro. O testes com valor-p  $\leq 0.05$  estão em negrito. Ver texto para mais detalhes.

| Local. | N  | ho | Modelo I        |       |    |       |                 | Modelo II        |           |          |              |                 |
|--------|----|----|-----------------|-------|----|-------|-----------------|------------------|-----------|----------|--------------|-----------------|
|        |    |    | Esp.I<br>(N/ho) | $x^2$ | df | p     | p <sub>MC</sub> | Esp.II<br>(N/ht) | $x^2$     | df       | p            | p <sub>MC</sub> |
| Hav    | 3  | 2  | 1,5             | 0,33  | 1  | 0,564 | 1,000           | 0,5              | 7         | 5        | 0,221        | 0,448           |
| Pan    | 5  | 1  | 5               | -     | -  | -     | -               | <b>0,83</b>      | <b>25</b> | <b>5</b> | <b>0,000</b> | <b>0,001</b>    |
| AL     | 6  | 2  | 3               | 2,67  | 1  | 0,102 | 0,227           | <b>1</b>         | <b>20</b> | <b>5</b> | <b>0,001</b> | <b>0,003</b>    |
| BA     | 4  | 3  | 1,33            | 0,5   | 2  | 0,779 | 1,000           | 0,67             | 5         | 5        | 0,416        | 0,718           |
| RJ     | 30 | 5  | 6               | 2,67  | 4  | 0,615 | 0,645           | 5                | 9,2       | 5        | 0,101        | 0,111           |

uma estreita relação entre a ocorrência dos haplótipos com as localidades (Tabela 3.7), tanto por meio do teste exato de Fischer para tabelas de contingência ( $x^2 = 44,855$ ;  $df = 20$ ;  $p = 0,001$ ) quanto pela estatística de haplótipos ( $H_s = 0,693$ ;  $H_{st} = 0,125$ ;  $p_{PM} = 0,001$ ). As análises de diferenciação entre pares de localidades (Tabela 3.7) revelou que a estrutura haplotípica do Panamá e de Alagoas as diferenciam de praticamente todas as demais localidades, inclusive entre si, com a única exceção sendo o Havaí. Os demais pares de localidades se mostraram estatisticamente iguais, inclusive Havaí e Bahia, que, surpreendentemente, mesmo sem compartilhar um único haplótipo, revelou apresentar a mesma estrutura haplotípica. A topologia do dendrograma baseado na matriz de distância gerada pelos índices de fixação (Figura 3.5) mostrou uma relação próxima entre Havaí e Panamá ( $F_{st} = 0,000$ ) e entre Bahia e Rio de Janeiro ( $F_{st} = 0,104$ ), sendo Alagoas, sozinha, a área que se mostrou mais distante das demais de acordo com a matriz  $F_{st}$ . Resumidamente, as relações entre as áreas obtidas pelo dendrograma de UPGMA foi: (((Hav, Pan), (BA, RJ)), AL).

Tabela 3.6. Diversidade genética das localidades do complexo *Mycale (Carmia) microsigmata* Arndt, 1927 estimada a partir do gene 16S do DNA mitocondrial. As localidades estão abreviadas como: Hav, Havaí; Pan, Panamá; AL, Alagoas; BA, Bahia; e RJ, Rio de Janeiro. Nas colunas, os parâmetros: número de sequências (N); número de sítios segregantes (S); número de haplótipos (h); diversidade haplotípica (H); número médio de diferenças (K); e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Ver texto para mais detalhes.

| Localidade | N  | S | h | H     | K     | $\pi$  |
|------------|----|---|---|-------|-------|--------|
| Hav        | 3  | 1 | 2 | 0,667 | 0,667 | 0,0012 |
| Pan        | 5  | 0 | 1 | 0,000 | 0,000 | 0,0000 |
| AL         | 6  | 1 | 2 | 0,333 | 0,333 | 0,0006 |
| BA         | 4  | 3 | 3 | 0,833 | 1,500 | 0,0006 |
| RJ         | 30 | 4 | 5 | 0,809 | 1,248 | 0,0023 |
| Total      | 48 | 5 | 6 | 0,792 | 1,170 | 0,0021 |

Tabela 3.7. Sumário dos testes de diferenciação populacional do complexo *Mycale (Carmia) microsigmata* Arndt, 1927. As localidades estão abreviadas como: Hav, Havaí; Pan, Panamá; AL, Alagoas; BA, Bahia; e RJ, Rio de Janeiro. Nas colunas, os parâmetros: estatística do qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ); graus de liberdade (df, do inglês *degree of freedom*); valor-p assintótico do teste de qui-quadrado (p); valor-p do teste exato de probabilidade estimado por cadeias de Markov ( $p_{MC}$ ); média ponderada das diversidades haplotípicas estimadas nas subpopulações (Hs); valor da estatística de haplótipos (Hst); valor-p da estatística de haplótipos estimado por permutação ( $p_{PM}$ ); índice de fixação (Fst). As localidades estão abreviadas como: Hav, Havaí; Pan, Panamá; AL, Alagoas; BA, Bahia; e RJ, Rio de Janeiro. O testes com valor-p  $\leq 0.05$  estão em negrito. Ver texto para mais detalhes.

|         | Teste exato   |           |              |              | Estatística de haplótipos |              |              | Fst   |
|---------|---------------|-----------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|-------|
|         | $\chi^2$      | df        | p            | $p_{MC}$     | Hs                        | Hst          | $p_{PM}$     |       |
| Todas   | <b>44,855</b> | <b>20</b> | <b>0,001</b> | <b>0,002</b> | <b>0,693</b>              | <b>0,125</b> | <b>0,001</b> | -     |
| Pareado |               |           |              |              |                           |              |              |       |
| Hav-Pan | 1,905         | 1         | 0,168        | 0,383        | 0,167                     | 0,333        | 0,373        | 0,000 |
| Hav-AL  | 2,250         | 1         | 0,134        | 0,464        | 0,400                     | 0,200        | 0,231        | 0,182 |
| Hav-BA  | 7,000         | 4         | 0,136        | 0,205        | 0,778                     | 0,140        | 0,205        | 0,316 |
| Hav-RJ  | 4,094         | 4         | 0,393        | 0,489        | 0,804                     | 0,001        | 0,447        | 0,032 |
| Pan-AL  | <b>7,639</b>  | <b>1</b>  | <b>0,006</b> | <b>0,017</b> | <b>0,190</b>              | <b>0,651</b> | <b>0,011</b> | 0,800 |
| Pan-BA  | <b>9,000</b>  | <b>3</b>  | <b>0,029</b> | <b>0,009</b> | <b>0,333</b>              | <b>0,520</b> | <b>0,005</b> | 0,400 |
| Pan-RJ  | <b>11,181</b> | <b>4</b>  | <b>0,025</b> | <b>0,027</b> | <b>0,731</b>              | <b>0,069</b> | <b>0,011</b> | 0,186 |
| AL-BA   | <b>10,000</b> | <b>4</b>  | <b>0,040</b> | <b>0,014</b> | <b>0,500</b>              | <b>0,338</b> | <b>0,016</b> | 0,560 |
| AL-RJ   | <b>11,700</b> | <b>4</b>  | <b>0,020</b> | <b>0,012</b> | <b>0,750</b>              | <b>0,065</b> | <b>0,007</b> | 0,402 |
| BA-RJ   | 10,452        | 5         | 0,063        | 0,128        | 0,811                     | 0,000        | 0,461        | 0,104 |

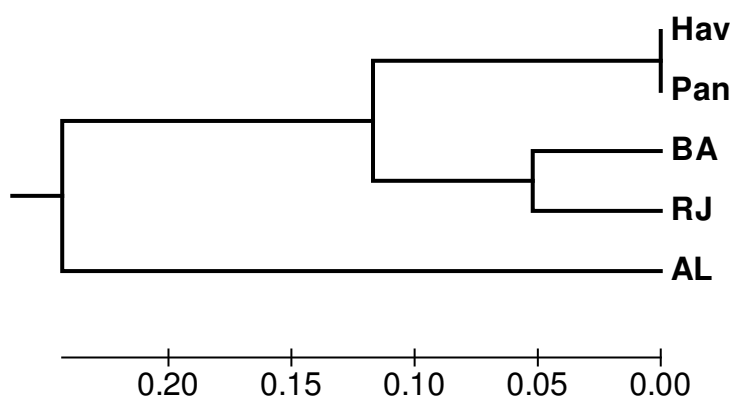


Figura 3.5. Dendrograma entre as localidades do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927 estimada a partir do gene 16S do DNA mitocondrial. Dendrograma gerado pelo método de UPGMA a partir da matriz de distância montada pelo índice de fixação (Fst) entre as localidades usando o programa MEGA5. Localidades abreviadas como: Hav, Havaí; Pan, Panamá; AL, Alagoas; BA, Bahia; e RJ, Rio de Janeiro. Ver texto para mais detalhes.

### 3.3.2 Variabilidade morfológica

Os valores das variáveis morfométricas de cada amostra, e seus respectivos haplótipos e localidades, assim como as médias por haplótipo e localidade, podem ser encontrados na Tabela 3.8. As megascleras se mostraram ser típicos substilóstilos, com a protuberância em uma das extremidades, ou cabeça, definida por uma constrição suave na largura do mesmo. O comprimento (L) máximo observado foi de 299,0  $\mu\text{m}$  e o mínimo foi de 207  $\mu\text{m}$ . A largura máxima do substilóstilo (W) e a largura máxima da cabeça do substilóstilo (T) apresentaram valores máximos e mínimos de 11,0  $\mu\text{m}$  para ambos e 3,45  $\mu\text{m}$  e 4,14  $\mu\text{m}$ , respectivamente. A proporção da largura da cabeça do substilóstilo em relação a largura máxima do mesmo (T/W) variou amplamente entre as amostras, sendo que o maior valor observado de T foi 1,47 vezes maior do que o de W, e o menor valor observado de T foi 0,69 vezes menor do que W. As sigmas encontradas se mostraram igualmente típicas, podendo ser em forma de C ou contorcidas, em forma de S, com ganchos afiados que se curvam abruptamente. A maior sigma observada mediu 46,0  $\mu\text{m}$ , e a menor, metade deste valor, 26,0  $\mu\text{m}$ . A exceção se faz as amostras pertencentes ao haplótipo D, nas quais não foi encontrada nenhuma sigma, muito embora se tenha aplicado o mesmo procedimento de dissociação de espículas que nas demais amostras, onde as sigmas foram comumente encontradas. A mesma ressalva é feita em relação às anisoquelas, as quais se mostraram igualmente ausentes nos indivíduos do haplótipo D até onde o esforço de busca permitiu avaliar. Nas demais amostras do complexo *M.*

Tabela 3.8. Médias e desvios-padrão das variáveis morfométricas das amostras do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. As amostras são listadas de acordo com seu número de coleta ou tombo no *Bishop Museum, Honolulu* (BPBM) e no Museu Nacional, Rio de Janeiro (MNRJ). Os haplótipos (Hapl.) e localidades (Local.) das amostras são indicados. As variáveis morfométricas são: o comprimento total do subtilóstilo (L), a largura máxima do subtilóstilo (W), a largura máxima da cabeça do subtilóstilo (T), a proporção da largura máxima da cabeça do subtilóstilo com a largura máxima do subtilóstilo (T/W); o comprimento total da sigma (S), e o comprimento total da anisoquela (A). Localidades abreviadas como: Hav, Havaí; Pan, Panamá; AL, Alagoas; BA, Bahia; e RJ, Rio de Janeiro. Ver texto para mais detalhes.

| Amostra   | Hapl. | Local. | L ( $\mu\text{m}$ ) | W ( $\mu\text{m}$ ) | T ( $\mu\text{m}$ ) | T/W             | S ( $\mu\text{m}$ ) | A ( $\mu\text{m}$ ) |
|-----------|-------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| BPBM550   | A     | Hav    | 255,8 $\pm$ 11,7    | 6,7 $\pm$ 1,1       | 5,6 $\pm$ 0,9       | 0,84 $\pm$ 0,09 | 38,4 $\pm$ 2,4      | 21,5 $\pm$ 3,0      |
| BPBM722   | A     | Hav    | 265,1 $\pm$ 6,7     | 7,8 $\pm$ 0,7       | 6,2 $\pm$ 0,6       | 0,80 $\pm$ 0,07 | 37,4 $\pm$ 2,5      | 19,5 $\pm$ 3,8      |
| MNRJ15644 | A     | Pan    | 249,7 $\pm$ 12,9    | 7,5 $\pm$ 1,0       | 6,3 $\pm$ 0,8       | 0,85 $\pm$ 0,05 | 37,3 $\pm$ 2,3      | 17,5 $\pm$ 3,2      |
| MNRJ15664 | A     | Pan    | 250,9 $\pm$ 8,5     | 7,3 $\pm$ 1,5       | 6,5 $\pm$ 1,3       | 0,88 $\pm$ 0,05 | 35,9 $\pm$ 3,1      | 17,0 $\pm$ 2,6      |
| MNRJ15672 | A     | Pan    | 263,8 $\pm$ 10,1    | 6,9 $\pm$ 0,9       | 5,9 $\pm$ 1,0       | 0,84 $\pm$ 0,08 | 38,9 $\pm$ 2,5      | 18,7 $\pm$ 3,5      |
| MNRJ15696 | A     | Pan    | 263,9 $\pm$ 9,9     | 6,7 $\pm$ 1,1       | 6,1 $\pm$ 0,8       | 0,92 $\pm$ 0,09 | 35,1 $\pm$ 1,8      | 15,6 $\pm$ 2,0      |
| MNRJ15716 | A     | Pan    | 251,7 $\pm$ 7,3     | 6,5 $\pm$ 0,9       | 5,5 $\pm$ 0,9       | 0,84 $\pm$ 0,07 | 40,0 $\pm$ 2,0      | 17,3 $\pm$ 3,1      |
| EH4       | A     | RJ     | 261,5 $\pm$ 11,6    | 6,0 $\pm$ 1,0       | 5,5 $\pm$ 0,7       | 0,95 $\pm$ 0,18 | 35,9 $\pm$ 1,4      | 20,1 $\pm$ 1,5      |
| EH8       | A     | RJ     | 266,6 $\pm$ 13,2    | 6,1 $\pm$ 1,1       | 5,5 $\pm$ 1,0       | 0,91 $\pm$ 0,12 | 38,8 $\pm$ 2,1      | 20,1 $\pm$ 1,7      |
| EH13      | A     | RJ     | 255,8 $\pm$ 6,1     | 6,7 $\pm$ 0,5       | 5,9 $\pm$ 0,7       | 0,88 $\pm$ 0,11 | 32,2 $\pm$ 4,7      | 18,3 $\pm$ 3,2      |
| EH14      | A     | RJ     | 258,5 $\pm$ 7,0     | 5,1 $\pm$ 0,9       | 5,4 $\pm$ 0,6       | 1,08 $\pm$ 0,13 | 35,8 $\pm$ 2,0      | 21,1 $\pm$ 0,8      |
| EH17      | A     | RJ     | 277,2 $\pm$ 13,8    | 6,7 $\pm$ 1,0       | 5,8 $\pm$ 0,5       | 0,88 $\pm$ 0,13 | 33,6 $\pm$ 2,5      | 16,2 $\pm$ 2,6      |
| EH19      | A     | RJ     | 266,3 $\pm$ 10,0    | 7,1 $\pm$ 0,5       | 7,0 $\pm$ 0,6       | 0,99 $\pm$ 0,09 | 35,8 $\pm$ 2,1      | 19,4 $\pm$ 2,7      |
| EH28      | A     | RJ     | 272,0 $\pm$ 17,2    | 6,1 $\pm$ 0,5       | 5,6 $\pm$ 0,4       | 0,92 $\pm$ 0,10 | 38,0 $\pm$ 1,7      | 19,6 $\pm$ 1,9      |
| MNRJ14288 | B     | AL     | 232,6 $\pm$ 12,8    | 4,2 $\pm$ 0,6       | 4,7 $\pm$ 0,5       | 1,11 $\pm$ 0,13 | 34,8 $\pm$ 3,4      | 18,5 $\pm$ 1,3      |
| EHUERJ002 | B     | AL     | 241,7 $\pm$ 8,6     | 4,9 $\pm$ 1,0       | 5,4 $\pm$ 0,8       | 1,12 $\pm$ 0,17 | 34,2 $\pm$ 1,3      | 17,8 $\pm$ 1,1      |
| EHUERJ003 | B     | AL     | 239,9 $\pm$ 15,0    | 4,4 $\pm$ 0,8       | 4,9 $\pm$ 0,9       | 1,11 $\pm$ 0,09 | 35,0 $\pm$ 2,1      | 17,6 $\pm$ 1,2      |
| EHUERJ007 | B     | AL     | 227,1 $\pm$ 11,3    | 4,5 $\pm$ 0,7       | 5,1 $\pm$ 0,6       | 1,14 $\pm$ 0,10 | 33,1 $\pm$ 3,8      | 17,4 $\pm$ 0,9      |
| EHUERJ008 | B     | AL     | 241,5 $\pm$ 12,2    | 4,5 $\pm$ 0,6       | 4,6 $\pm$ 0,3       | 1,05 $\pm$ 0,19 | 33,6 $\pm$ 2,7      | 19,3 $\pm$ 1,0      |
| BPBM520   | B     | Hav    | 239,3 $\pm$ 8,4     | 9,7 $\pm$ 0,7       | 10,1 $\pm$ 0,8      | 1,12 $\pm$ 0,08 | 41,0 $\pm$ 1,1      | 23,8 $\pm$ 2,0      |
| EH1       | B     | RJ     | 234,7 $\pm$ 12,7    | 5,2 $\pm$ 1,0       | 5,6 $\pm$ 0,9       | 1,10 $\pm$ 0,14 | 34,1 $\pm$ 3,0      | 20,3 $\pm$ 2,3      |
| EH15      | B     | RJ     | 233,7 $\pm$ 6,8     | 5,2 $\pm$ 0,5       | 4,9 $\pm$ 0,5       | 0,95 $\pm$ 0,10 | 35,6 $\pm$ 2,2      | 20,7 $\pm$ 1,3      |
| EH20      | B     | RJ     | 252,3 $\pm$ 9,2     | 6,0 $\pm$ 0,8       | 6,1 $\pm$ 0,8       | 1,04 $\pm$ 0,11 | 35,9 $\pm$ 2,5      | 19,5 $\pm$ 0,8      |

Tabela 3.8. (continuação)

| Amostra              | Hapl. | Local. | L ( $\mu\text{m}$ ) | W ( $\mu\text{m}$ ) | T ( $\mu\text{m}$ ) | T/W             | S ( $\mu\text{m}$ ) | A ( $\mu\text{m}$ ) |
|----------------------|-------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| AR2                  | C     | RJ     | 252,8 $\pm$ 8,4     | 8,1 $\pm$ 0,9       | 7,7 $\pm$ 0,8       | 0,96 $\pm$ 0,10 | 34,5 $\pm$ 2,0      | 16,5 $\pm$ 2,0      |
| AR3                  | C     | RJ     | 235,1 $\pm$ 8,0     | 7,0 $\pm$ 1,1       | 6,9 $\pm$ 0,8       | 0,99 $\pm$ 0,10 | 32,0 $\pm$ 1,4      | 14,8 $\pm$ 1,0      |
| AR4                  | C     | RJ     | 241,5 $\pm$ 9,3     | 7,1 $\pm$ 1,2       | 7,0 $\pm$ 0,9       | 0,98 $\pm$ 0,09 | 34,6 $\pm$ 1,2      | 15,1 $\pm$ 1,1      |
| AR5                  | C     | RJ     | 240,4 $\pm$ 6,8     | 6,4 $\pm$ 1,5       | 6,6 $\pm$ 1,1       | 1,05 $\pm$ 0,16 | 32,5 $\pm$ 1,6      | 14,8 $\pm$ 1,1      |
| AR6                  | C     | RJ     | 240,1 $\pm$ 7,5     | 7,1 $\pm$ 0,8       | 7,3 $\pm$ 0,6       | 1,04 $\pm$ 0,10 | 34,0 $\pm$ 0,9      | 14,3 $\pm$ 0,4      |
| EH12                 | D     | RJ     | 221,0 $\pm$ 12,8    | 4,9 $\pm$ 0,7       | 5,1 $\pm$ 0,6       | 1,05 $\pm$ 0,10 | -                   | -                   |
| EH25                 | D     | RJ     | 222,2 $\pm$ 4,5     | 4,9 $\pm$ 1,0       | 5,4 $\pm$ 0,6       | 1,14 $\pm$ 0,14 | -                   | -                   |
| EH30                 | D     | RJ     | 233,0 $\pm$ 10,3    | 4,2 $\pm$ 0,6       | 4,9 $\pm$ 0,5       | 1,18 $\pm$ 0,12 | -                   | -                   |
| EH32                 | D     | RJ     | 242,0 $\pm$ 10,1    | 4,9 $\pm$ 0,7       | 5,8 $\pm$ 0,7       | 1,18 $\pm$ 0,07 | -                   | -                   |
| EH34                 | D     | RJ     | 241,8 $\pm$ 6,1     | 4,8 $\pm$ 0,5       | 6,0 $\pm$ 0,6       | 1,26 $\pm$ 0,11 | -                   | -                   |
| EH37                 | D     | RJ     | 246,2 $\pm$ 7,2     | 4,5 $\pm$ 0,4       | 5,6 $\pm$ 0,7       | 1,24 $\pm$ 0,09 | -                   | -                   |
| Média por haplotipo  |       |        |                     |                     |                     |                 |                     |                     |
| A                    |       |        | 261,3 $\pm$ 8,1     | 6,7 $\pm$ 0,7       | 5,9 $\pm$ 0,5       | 0,90 $\pm$ 0,07 | 36,7 $\pm$ 2,1      | 18,7 $\pm$ 1,8      |
| B                    |       |        | 238,1 $\pm$ 7,2     | 5,4 $\pm$ 1,7       | 5,7 $\pm$ 1,7       | 1,08 $\pm$ 0,06 | 35,2 $\pm$ 2,3      | 19,4 $\pm$ 2,0      |
| C                    |       |        | 242,0 $\pm$ 6,5     | 7,2 $\pm$ 0,6       | 7,1 $\pm$ 0,4       | 1,01 $\pm$ 0,04 | 33,5 $\pm$ 1,2      | 15,1 $\pm$ 0,8      |
| D                    |       |        | 234,4 $\pm$ 10,8    | 4,7 $\pm$ 0,3       | 5,5 $\pm$ 0,4       | 1,18 $\pm$ 0,07 | -                   | -                   |
| Média por localidade |       |        |                     |                     |                     |                 |                     |                     |
| Hav                  |       |        | 253,4 $\pm$ 13,1    | 8,1 $\pm$ 1,5       | 7,3 $\pm$ 2,5       | 0,92 $\pm$ 0,17 | 38,9 $\pm$ 1,8      | 21,6 $\pm$ 2,2      |
| Pan                  |       |        | 256,0 $\pm$ 7,2     | 7,0 $\pm$ 0,4       | 6,1 $\pm$ 0,4       | 0,87 $\pm$ 0,03 | 37,4 $\pm$ 2,0      | 17,2 $\pm$ 1,1      |
| AL                   |       |        | 236,6 $\pm$ 6,5     | 4,5 $\pm$ 0,2       | 4,9 $\pm$ 0,3       | 1,11 $\pm$ 0,03 | 34,1 $\pm$ 0,8      | 18,1 $\pm$ 0,8      |
| RJ                   |       |        | 247,4 $\pm$ 15,7    | 5,9 $\pm$ 1,1       | 6,0 $\pm$ 0,8       | 1,04 $\pm$ 0,11 | 34,9 $\pm$ 1,9      | 18,1 $\pm$ 2,5      |



(*C.*) *microsigmatosa*, as anisoquelas encontradas se mostraram particularmente similares às de outras espécies de *Mycale* (*Carmia*), tendo um aspecto ligeiramente estreito em vista lateral. A maior anisoquela observada mediu 27,14  $\mu\text{m}$ , e a menor menos do que a metade da maior, 12,65  $\mu\text{m}$ .

As análises de correlação entre os pares de variáveis morfométricas mostram que das potenciais correlações possíveis entre estas, somente algumas poucas apresentam significância estatística (Tabela 3.9; Figura 3.6). Uma destas indica que subtilóstilos mais longos tendem a apresentar menor relação entre as larguras de sua cabeça e do eixo (L, T/W:  $R = -0,661$ ;  $R^2 = 0,437$ ;  $p = 0,000$ ). A largura máxima do subtilótilo apresenta uma correlação significativa com a maior parte das demais variáveis. Estes resultados mostram que a indivíduos que possuem subtilóstilos mais largos tendem a apresentar também subtilóstilos com cabeças maiores em largura (W, T:  $R = 0,876$ ;  $R^2 = 0,768$ ;  $p = 0,000$ ), menor relação entre largura da cabeça e eixo (W, T/W:  $R = -0,453$ ;  $R^2 = 0,205$ ;  $p = 0,016$ ) e sigmas maiores (W, S:  $R = 0,392$ ;  $R^2 = 0,154$ ;  $p = 0,039$ ). Uma maior relação entre largura da cabeça e do eixo aparece correlacionada com a ocorrência de sigmas menores, muito embora essa

Tabela 3.9. Correlações entre as variáveis morfométricas do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. As correlações entre as variáveis (X, Y) são dadas. Nas colunas, os parâmetros: coeficientes de correlação (R); coeficientes de determinação ( $R^2$ ); valor-p da regressão (p); coeficiente linear (b) e angular (a) dependente do parâmetro Y e X. Os testes em negrito são significativas com valor-p  $\leq 0,05$ . Os casos com dados faltosos não foram incluídos nas análises (N=28). Para abreviatura das variáveis, vide o texto.

| X          | Y          | R(X,Y)        | $R^2$        | p            | b(Y)          | a(Y)          | b(X)           | a(X)           |
|------------|------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| L          | W          | 0,315         | 0,099        | 0,103        | -1,148        | 0,030         | 229,370        | 3,320          |
| L          | T          | 0,002         | 0,000        | 0,990        | 6,007         | 0,000         | 250,233        | 0,029          |
| <b>L</b>   | <b>T/W</b> | <b>-0,661</b> | <b>0,437</b> | <b>0,000</b> | <b>2,253</b>  | <b>-0,005</b> | <b>334,239</b> | <b>-85,797</b> |
| L          | S          | 0,366         | 0,134        | 0,056        | 19,677        | 0,064         | 175,651        | 2,098          |
| L          | A          | 0,129         | 0,017        | 0,514        | 12,761        | 0,022         | 236,694        | 0,749          |
| <b>W</b>   | <b>T</b>   | <b>0,876</b>  | <b>0,768</b> | <b>0,000</b> | <b>1,130</b>  | <b>0,778</b>  | <b>0,357</b>   | <b>0,987</b>   |
| <b>W</b>   | <b>T/W</b> | <b>-0,453</b> | <b>0,205</b> | <b>0,016</b> | <b>1,210</b>  | <b>-0,037</b> | <b>11,787</b>  | <b>-5,578</b>  |
| <b>W</b>   | <b>S</b>   | <b>0,392</b>  | <b>0,154</b> | <b>0,039</b> | <b>31,074</b> | <b>0,721</b>  | <b>-1,271</b>  | <b>0,213</b>   |
| W          | A          | -0,027        | 0,001        | 0,890        | 18,616        | -0,050        | 6,615          | -0,015         |
| T          | T/W        | 0,027         | 0,001        | 0,890        | 0,962         | 0,002         | 5,767          | 0,298          |
| T          | S          | 0,229         | 0,052        | 0,242        | 32,774        | 0,473         | 2,121          | 0,110          |
| T          | A          | -0,014        | 0,000        | 0,942        | 18,480        | -0,029        | 6,188          | -0,007         |
| <b>T/W</b> | <b>S</b>   | <b>-0,380</b> | <b>0,144</b> | <b>0,046</b> | <b>44,037</b> | <b>-8,593</b> | <b>1,575</b>   | <b>-0,017</b>  |
| T/W        | A          | 0,055         | 0,003        | 0,781        | 17,101        | 1,228         | 0,932          | 0,002          |
| <b>S</b>   | <b>A</b>   | <b>0,593</b>  | <b>0,352</b> | <b>0,001</b> | <b>-2,531</b> | <b>0,585</b>  | <b>24,627</b>  | <b>0,602</b>   |

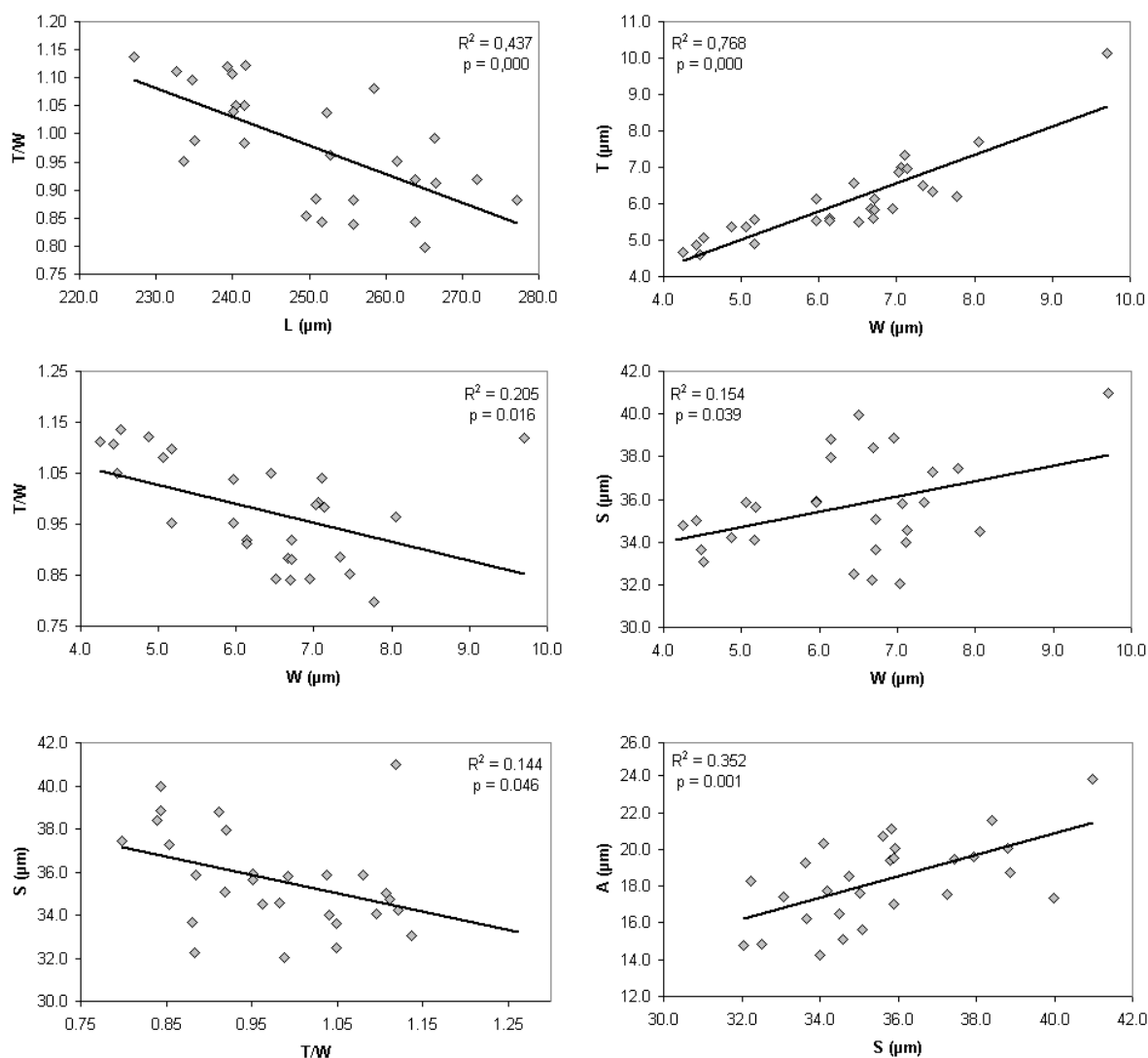


Figura 3.6. Correlações entre os parâmetros morfométricos do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. Somente as correlações significativas com valor- $p \leq 0,05$  são mostradas. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o valor- $p$  de cada análise é mostrado. Para abreviatura das variáveis, vide o texto.

correlação presente baixa determinação (T/W, S:  $R = -0,380$ ;  $R^2 = 0,144$ ;  $p = 0,046$ ). Por fim, indivíduos que apresentaram sigmas maiores tenderam a apresentar também anisoqueles maiores ( $R = 0,593$ ;  $R^2 = 0,352$ ;  $p = 0,001$ ).

Os resultados dos testes multivariados de significância (MTS) podem ser vistos na Tabela 3.10 (ver também Apêndice G). As Figuras 3.7 a 3.9 ilustram as diferenças nas variáveis morfométricas entre os haplótipos do Rio de Janeiro (Figura 3.7) e entre as localidades dos haplótipos A (Figura 3.8) e B (Figura 3.9). Os haplótipos do Rio de Janeiro apresentaram diferenças significativas nas suas variáveis morfométricas, tanto considerando

Tabela 3.10. Sumário dos Testes Multivariados de Significância (MTS) entre os haplótipos e localidades do complexo de *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. Os testes onde os haplótipos foram usados como variáveis independentes (1. haplótipos A-D; 2. haplótipos A-C) foram restritos a uma única localidade (1-2. RJ). Os testes onde as localidades foram usadas como variáveis independentes (3. localidades Hav, Pan e RJ; 4. AL e RJ) foram restritos a um único haplótipo (3. A; 4. B). As variáveis dependentes (VD) do são descritas na seção 3.2.4. Abreviaturas dadas como: valor do lambda de Wilks ( $\lambda$ ); valor de F (F); graus de liberdade (df, do inglês *degree of freedom*) dado o conjunto de dados; valor-p do teste (p); soma dos quadrados (SS); médias quadráticas (MS). Os testes com valor-p  $\leq 0.05$  estão em negrito. Os testes univariados, assim como os testes *post-hoc* de Bonferoni, são apresentados no Apêndice X. Ver texto para mais detalhes.

|      | $\lambda$    | F             | df <sub>Efeito</sub> | df <sub>Erro</sub> | p            |
|------|--------------|---------------|----------------------|--------------------|--------------|
| MTS1 | <b>0,018</b> | <b>11,018</b> | <b>12</b>            | <b>37,332</b>      | <b>0,000</b> |
| MTS2 | 0.011        | 9.876         | 12                   | 14                 | <b>0,000</b> |
| MTS3 | 0,034        | 4,386         | 12                   | 12                 | <b>0,008</b> |
| MTS4 | 0,001        | 218,380       | 6                    | 1                  | 0,052        |

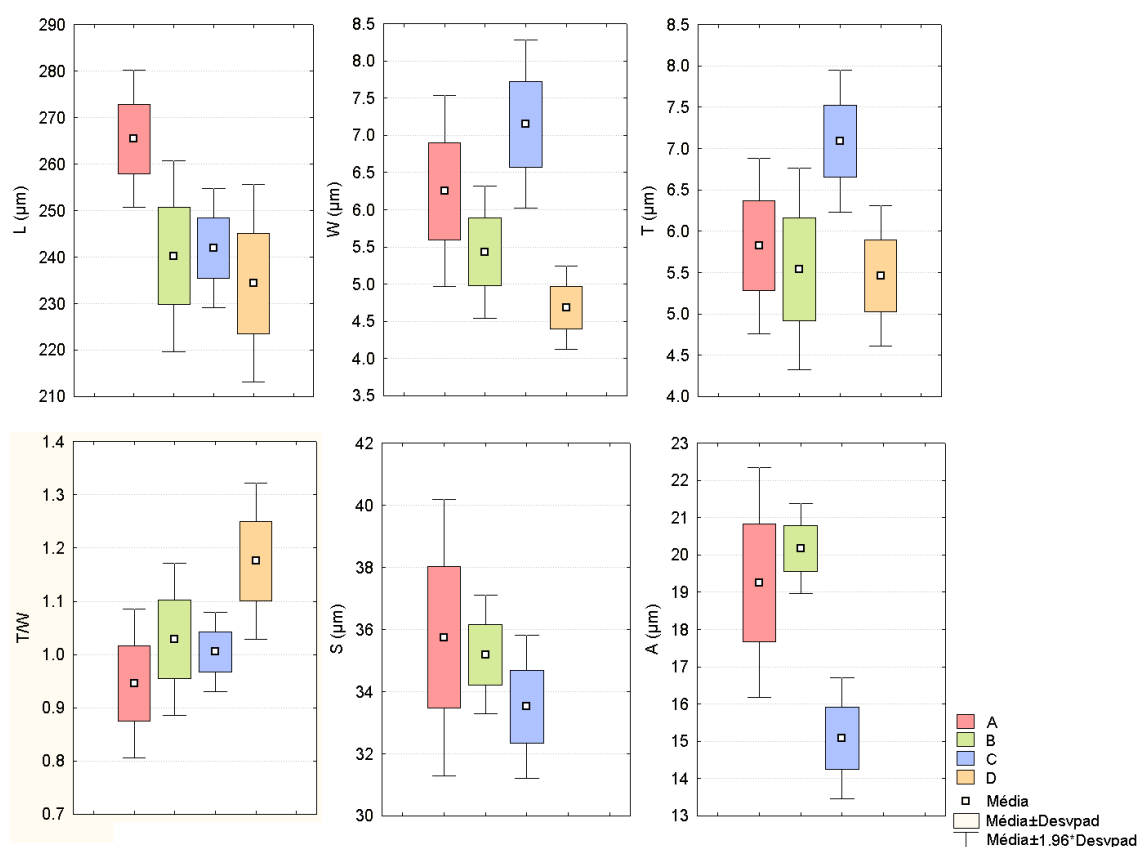


Figura 3.7. Variabilidade morfológica entre os haplótipos do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927 encontrados no Rio de Janeiro. Os gráficos do tipo Box e Whisker ilustram as médias e desvios-padrão de cada variável morfométrica conforme legenda. Em cores, os haplótipos conforme legenda, a saber: A (vermelho), B (verde), C (azul) e D (laranja). Ver texto para mais detalhes.

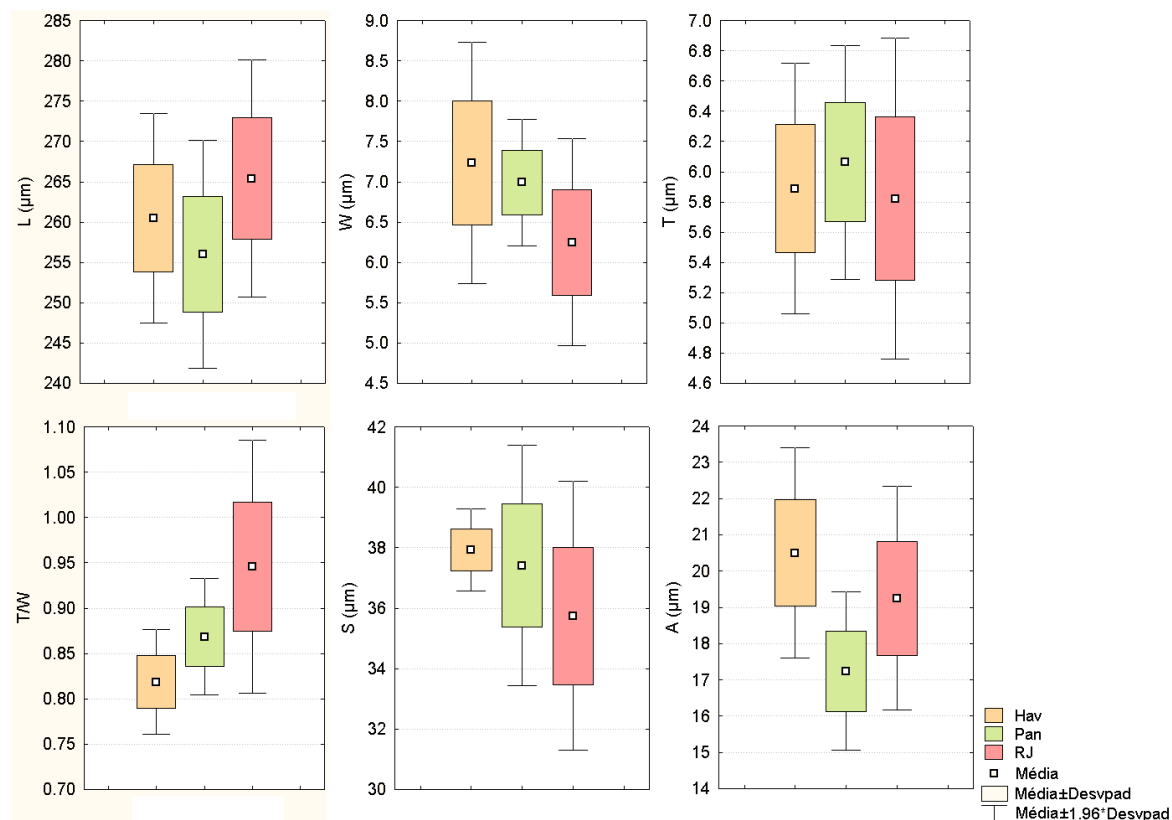


Figura 3.8. Variabilidade morfológica entre as localidades do haplótipo A do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. Os gráficos do tipo Box e Whisker ilustram as médias e desvios-padrão de cada variável morfométrica conforme legenda. Em cores, as localidades conforme legenda, a saber: Havaí, Hav (laranja), Panamá, Pan (verde), e Rio de Janeiro, RJ (vermelho). Ver texto para mais detalhes.

apenas a variabilidade morfométrica do substilóstilo entre os haplótipos A – D, dado a ausência de microscleras no haplótipo D (MTS1:  $F = 11,018$ ;  $df = 12$ ;  $p = 0,000$ ), quanto considerando todas as variáveis entre os haplótipos A – C (MTS2:  $F = 9,876$ ;  $df = 12$ ;  $p = 0,000$ ). Nas análises univariadas, somente a variável S não diferiu entre os haplótipos no MTS2 (Apêndice G, Tabela G2), e nas duas análises (MTS1 e MTS2) os haplótipos se diferenciaram entre si por uma a três variáveis nos testes *post-hoc* de Bonferroni (Apêndice G, Tabelas G1 e G2). Por outro lado, as análises multivariadas de significância entre as localidades (MTS3 e MTS4) apresentaram pouca a nenhuma diferenciação entre as localidades. Embora o MTS entre as três localidades (Hav, Pan e RJ) testadas do haplótipo A tenha sido significativo (MTS3:  $F = 4,386$ ;  $df = 12$ ;  $p = 0,008$ ), nos testes univariados, somente duas variáveis (T/W e A) diferiram entre os grupos; e as localidades não apresentaram diferenciação nos testes *post-hoc* (Apêndice G, Tabela G3). Da mesma forma, as duas localidades (AL e RJ) testadas do haplótipo B não mostraram diferenças significativas

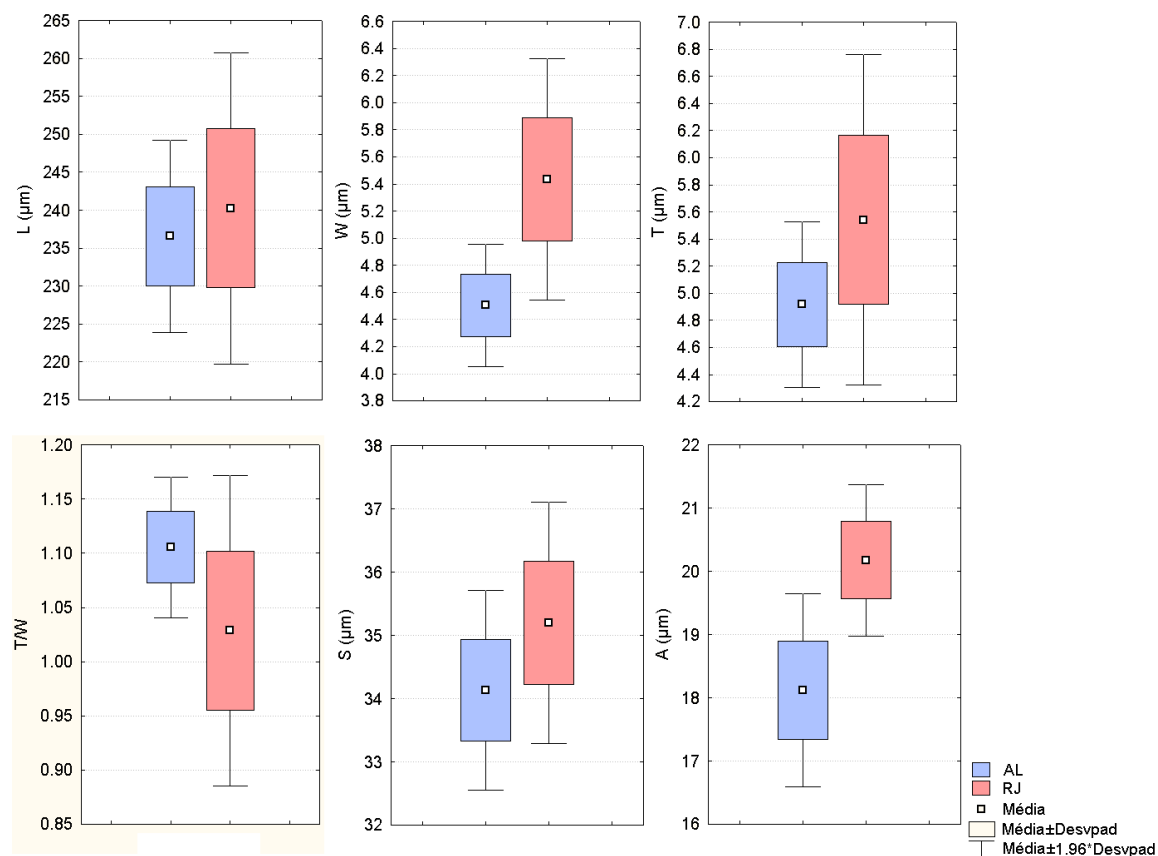


Figura 3.9. Variabilidade morfológica entre as localidades do haplótipo B do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. Os gráficos do tipo Box e Whisker ilustram as médias e desvios-padrão de cada variável morfométrica conforme legenda. Em cores, as localidades conforme legenda, a saber: Alagoas, AL (azul) e Rio de Janeiro, RJ (vermelho). Ver texto para mais detalhes.

no teste multivariado (MTS4:  $F = 218,380$ ;  $df = 6$ ;  $p = 0,052$ ), mesmo tendo as variáveis W e A diferido entre as mesmas (Apêndice G, Tabela G4).

### 3.4 Discussão

#### 3.4.1 16S como marcador populacional

A variabilidade genética encontrada no complexo *M. (C.) microsigmatosa* por meio do fragmento do gene 16S do RNAr mitocondrial decorreu de uma alta diversidade haplotípica ( $H = 0,792$ ), com seis haplótipos distintos. Contudo, estes divergiram entre si por um único passo mutacional, resultando em uma baixa diversidade nucleotídica ( $\pi = 0,0021$ ). Os seis haplótipos encontrados no complexo apresentaram frequências estatisticamente diferentes, onde os dois haplótipos mais frequentes estiveram presentes em 54 % dos indivíduos e os dois mais raros em somente 8 %. Todavia, a frequências destes haplótipos em cada localidade não apresentou diferenças estatísticas. Enquanto que no Havaí, Bahía e Rio de Janeiro, a ocorrência dos haplótipos observados não difere de uma distribuição aleatória, sendo RJ a área com maior número de haplótipos, no Panamá e Alagoas os haplótipos A e B, respectivamente, se mostraram estatisticamente predominantes.

O uso do 16S como marcador molecular em Porifera é recente na literatura, com poucos trabalhos publicados até o presente momento. Dos quatro trabalhos utilizando este marcador, dois o aplicaram para estudos filogenéticos (DOHRMANN *et al.*, 2008, 2009), cujos resultados nada contribuem para comparar seu desempenho em estudos populacionais. Dos dois trabalhos restantes, um o utilizou como marcador para separação de espécies. Neste trabalho (HEIM *et al.*, 2007), os autores compararam o desempenho de cinco marcadores moleculares na identificação de espécies do gênero *Aplysina* Nardo, 1834, sendo que o marcador 16S foi incapaz de separar as três espécies analisadas, resultando em um único haplótipo. Por fim, o quarto trabalho (LÓPEZ-LEGENTIL *et al.*, 2010) objetivou a separação molecular – por meio dos marcadores 18S, 28S e *cox1*, além do 16S – de morfotipos da espécie *Callyspongia vaginalis* (Lamarck 1814), cuja variabilidade morfológica é postuladamente um efeito de plasticidade fenotípica. Embora os autores não tenham encontrado evidências genéticas para uma separação dos morfotipos em espécies distintas, eles apontaram o marcador 16S como o mais variável, apresentando uma diversidade nucleotídica ( $\pi = 0,024$ ) maior do que a encontrada em *cox1*. Contudo, dos seis haplótipos encontrados pelos autores, dois corresponderam a outras espécies de *Callyspongia*, *C. fallax* Duchassaing e Michelotti, 1864 e *C. plicifera* (Lamarck, 1814).

Estes resultados sugerem uma alta conservatividade do gene 16S entre espécies próximas. A diversidade encontrada em outras espécies analisadas neste trabalho (Capítulo 1)

corroborar esta afirmação. Por exemplo, *M. (Z.) angulosa*, amostrada em três localidades distintas (RJ, SP e Panamá), apresentou o mesmo haplótipo em todas as 18 sequências obtidas para esta espécie. Além disso, as duas sequências obtidas da espécie aparentada *M. (Z.) parishi* apresentaram o mesmo haplótipo que a espécie anterior. Desta forma, a alta variabilidade encontrada no complexo *M. (C.) microsigmatosa* aponta em direção a duas hipóteses conflitantes. A primeira implica que a taxa de evolução deste gene se encontra aumentada em comparação com outras espécies, permitindo o surgimento de vários haplótipos nesta linhagem. Contudo, mesmo espécies que apresentam claramente taxas evolutivas elevadas para este marcador, como *M. (M.) laevis* – como se conclui a partir do comprimento dos ramos desta espécie nas filogenias do Capítulo 1 com este marcador – apresentam variabilidades intra-específicas nulas, sendo observados somente um único haplótipo nestas linhagens. Na segunda hipótese conclui-se que estes diferentes haplótipos correspondem a linhagens próximas, mas evolutivamente distintas, ou em vias de separação, e devido à baixa variabilidade deste marcador, onde as sequências destas diferem por poucos passos mutacionais, não é possível identificá-las por métodos filogenéticos.

Uma possibilidade para resolver esta questão consistiria em uma re-avaliação da diversidade genética deste complexo por meio de marcadores moleculares mais variáveis. Contudo, uma problemática advém desta alternativa. A literatura aponta poucos marcadores disponíveis para análises nesta escala, sendo *cox1* o mais utilizado (e.g., DURAN *et al.*, 2004a; WÖRHEIDE, 2006; LÓPEZ-LEGENTIL e PAWLIK, 2009). Todavia, este marcador, além de apresentar dubiedade na variabilidade encontrada ao longo de sua sequência – onde é postulado que uma região menos consensual na literatura seria mais variável (ERPENBECK *et al.*, 2006), mas que, entretanto, pode ser mais conservada para certos grupos (e.g., DE PAULA *et al.*, 2012) – apresenta grandes dificuldades técnicas na sua amplificação por PCR (VARGAS *et al.*, 2012), não tendo sido possível, neste trabalho, amplificar este marcador a partir de amostras deste grupo (Apêndice D). Um outro marcador amplamente utilizado para fins populacionais em esponjas são os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) dos genes do RNAr nuclear. Por consistir em sequências não funcionais, sua taxa evolutiva é consideravelmente maior do que regiões codificantes ou estruturais (RNAr). Contudo, estas regiões são conhecidamente capazes de sofrer variação intra-genômica (WÖRHEIDE *et al.*, 2004), e, sendo assim, pouco confiáveis para estudos filogenéticos, principalmente sem que tal variabilidade seja estimada. Outra possibilidade seria a utilização de marcadores de repetição de sequências simples, como microssatélites. A utilidade destes marcadores para



estudos deste tipo é comprovada por diversos trabalhos (e.g., DURAN *et al.*, 2002; DURAN *et al.*, 2004b; HOSHINO e FUJITA, 2006), mas por se tratar de marcadores espécie-específicos, além de terem um alto custo de desenvolvimento, têm sua aplicabilidade proporcionalmente diminuída quando utilizados em espécies distantes, podendo não ser adequados em estudos de complexos de espécies.

#### 3.4.2 Plasticidade versus Cripticismo

As duas hipóteses levantadas acima decorrentes da diversidade molecular observada no complexo *M. (C.) microsigmatosa* remontam a fenômenos distintos para explicar a variabilidade morfológica encontrada. Na primeira, esta derivaria da plasticidade fenotípica, e, por conseguinte, seria esperado que indivíduos de localidades diferentes apresentassem uma maior divergência morfológica do que indivíduos de uma mesma localidade, uma vez que, potencialmente, o número de diferenças ambientais entre duas localidades é maior do que dentro de cada uma destas. Na segunda hipótese, a variabilidade morfológica resulta de diferenças intrínsecas entre linhagens evolutivas independentes, estas diferenças entre espécies ou linhagens crípticas estariam associadas mais a fatores genéticos e do que ambientais.

Contudo, da mesma forma que a primeira hipótese encontra evidências contrárias a partir dos resultados moleculares obtidos em outras espécies de *Mycale*, e mesmo em outros trabalhos com foco em outras espécies de esponjas, esta também parece ser refutada a partir da análise morfológica do complexo *M. (C.) microsigmatosa*. Nas análises de MTS entre haplótipos de uma mesma localidade, foi possível observar que indivíduos haploticamente distintos e teoricamente sob as mesmas influências ambientais – visto que estes se distanciavam em, alguns muitos casos, menos de um metro entre si – apresentavam diferenças morfológicas significativas (MTS1 e MTS2). Estas diferenças se deram tanto em relação ao somatório total da diversidade morfológica, quanto considerando individualmente os parâmetros morfométricos (Apêndice X, Tabelas X.1 e X.2). E mesmo quando um dos haplótipos (D) se diferenciou qualitativamente dos demais, não sendo neste observada a ocorrência de microscleras (ver abaixo), as diferenças morfométricas unicamente dos subtilóstilos se mostraram significativas entre os haplótipos (MTS1). Por outro lado, as análises de TMS entre localidades de um mesmo haplótipo falharam em diferenciar os indivíduos de localidades distintas relacionados geneticamente (MTS3 e MTS4). Embora as análises entre localidades dos indivíduos do haplótipo A (MTS3) tenha apresentado resultados

significativos, os testes de probabilidade posterior falharam em encontrar diferenças significativas entre as localidades (Apêndice G, Tabelas G.3), refutando que as diferenças entre as localidades sejam significativas.

Se indivíduos geneticamente próximos de localidades diferentes tendem a apresentar maior similaridade morfológica do que indivíduos geneticamente distintos de uma mesma localidade, é de se supor que a variabilidade morfológica encontrada no complexo *M. (C.) microsigmatosa* está mais associada a fatores genéticos do que geográficos, sugerindo que esta seria um resultado de diferenças intrínsecas entre linhagens evolutivas e não de uma diversificação entre populações sob a influência de fatores ambientais diferentes. Seja como for, a variabilidade morfológica encontrada no complexo *M. (C.) microsigmatosa* é condizente com a observada entre espécies correlatas (Tabela 3.2). Mas uma vez que os trabalhos de descrição destas espécies – e outros que porventura venham a descrever populações destas – não reportam valores estatisticamente comparativos das dimensões de suas espículas (*i.e.*, média e desvio-padrão), limitando-se a apresentar somente valores mínimos e máximos (ou seja, extremos da distribuição), é difícil de avaliar o quanto os haplótipos ou populações analisadas neste trabalho variam em relação ao restante das espécies.

### 3.4.3 Distribuição geográfica dos haplótipos

Se considerarmos a hipótese de que os haplótipos encontrados no complexo *M. (C.) microsigmatosa* correspondam, de fato, a linhagens isoladas, *i.e.*, espécies distintas ou em vias de separação, teríamos que configurar um cenário de ampla distribuição geográfica para estas linhagens. Por outro lado, na perspectiva de que estes corresponderiam a linhagens de uma única espécie, seria necessário determinar rotas de dispersão que permitissem um fluxo gênico transoceânico.

Por exemplo, o haplótipo mais frequente (A) ocorre em todas as localidades amostradas, com exceção da Bahía. A ausência deste haplótipo nesta localidade poderia ser fruto de um artefato promovido por amostragem – como suportado pelas análises estatísticas – mas também poderia corresponder a uma ausência real – embora pouco provável – que levaria a uma distribuição disjunta desta linhagem. Contudo, se este haplótipo correspondesse a uma espécie própria, esta estaria distribuída desde o Pacífico Tropical Oriental, passando pelo Atlântico Tropical, até a América do Sul Temperada.

Algo similar ocorreria em relação ao haplótipo B, também encontrado no Havaí, Alagoas e Rio de Janeiro. A ausência deste haplótipo no Panamá é corroborada por análises estatísticas – ao contrário do que ocorre com o haplótipo A na Bahía – e neste caso, um possível fluxo gênico que unisse a população do Havaí com as do Brasil não poderia estar conectado com o Caribe. Desta forma, uma possível rota de dispersão deveria contornar o continente Sul-Americano. Mas, tal conectividade é pouco provável dado que esta espécie não ocorre no Cone Sul do continente.

A inexistência de mecanismos dispersivos que promovam uma conectividade entre as áreas em questão impõe dificuldades para explicar a distribuição destes haplótipos como linhagens de uma única espécie, uma vez que não permitem um fluxo gênico contínuo. Por exemplo, nas análises de diferenciação populacional foi possível observar uma alta similaridade genética entre Panamá e Havaí. Contudo, entre estas áreas há uma grande barreira física, o Istmo do Panamá, que dificilmente permitiria uma dispersão do Caribe para o Pacífico, e vice-versa. Por outro lado, áreas contínuas como Alagoas e Bahía, para as quais a Corrente do Brasil permitiria um fluxo gênico entre elas, apresentam uma divergência genética significativa.

Contrariamente, a distribuição disjunta destas linhagens poderia ser decorrente da introdução de espécies exóticas por ação antrópica, sobretudo se associados com embarcações marítimas, capazes de transportar estes organismos através de barreiras naturais – seja diretamente, incrustados em cascos de navios e plataformas, ou em estágios larvais, em água de lastro (CARLTON, 1987, 1989). Esta suposição encontra suporte em duas evidências distintas. A primeira é que a área com menor número de Haplótipos, Panamá ( $h = 1$ ), teve seus espécimes coletados em uma área conservada, sendo que todas as demais áreas foram amostradas em regiões portuárias. No caso mais extremo, Rio de Janeiro ( $h = 5$ ), as coletas ocorreram na Baía de Sepetiba, uma área com intensa atividade portuária, a qual é referida como área inicial de bioinvasão de muitas espécies marinhas, como, por exemplo, o cnidário azooxantelado *Tubastraea* (DE PAULA e CREED, 2005). A segunda consiste em uma divergência temporal na frequência dos haplótipos encontrados no Rio de Janeiro. Se compararmos a diversidade genética entre as amostras coletadas no ano de 1992 ( $N = 6$ ;  $h = 2$ ;  $H = 0,333$ ;  $\pi = 0,00121$ ) e as amostras coletadas a partir de 2010 ( $N = 22$ ;  $h = 5$ ;  $H = 0,779$ ;  $\pi = 0,00201$ ), é possível observar diferenças significativas entre estas ( $\chi^2 = 18,299$ ;  $df = 4$ ;  $p = 0,001$ ). Embora mais amostras anteriores a 2010 devam ser analisadas a fim fornecer maiores evidências, estes resultados sugerem a chegada de novos haplótipos a esta localidade. A

literatura também parece fornecer evidências que suportam a idéia de uma introdução destas espécies. Coles e colaboradores (1999) apontam *Mycale grandis* como uma espécie introduzida no Havaí. Tal descoberta implica que espécies do gênero *Mycale* possam apresentar características que permitem a ocorrência de sua introdução em novas áreas, como, por exemplo, tolerância a diferentes condições ambientais, uma característica que também poderia ser associada à *M. (C.) microsigmatosa* dada sua alta tolerância à poluição (MURICY, 1989). Coles e colaboradores (1999) reportam ainda outras 300 espécies postuladamente introduzidas na região, além de mais de 100 espécies criptogênicas, e considerando a expressividade destes números em termos de diversidade introduzida, pode-se imaginar que uma grande parcela de espécies possam ainda adicionar a estes números. Uma hipótese interessante é traçada por Calcinaï e colaboradores (*in press*), a qual envolve associações de espécies de esponjas com octocorais do gênero *Carijoa*. A recente descoberta de que estes cnidários são nativos do Indo-Pacífico, implica na sua introdução em muitas outras regiões, inclusive o Caribe (CONCEPCION *et al.*, 2010). Desta forma, Calcinaï e colaboradores (*in press*) sugerem que espécies de esponjas associadas a estes corais possam ser igualmente introduzidas nas novas localidades colonizadas por estes. E uma vez que *M. (C.) microsigmatosa*, e outras espécies correlatas, são frequentemente reportadas associadas a espécies de *Carijoa*, a suspeita da existência de espécies crípticas introduzidas no complexo provê ainda mais suporte à hipótese de Calcinaï e colaboradores (*in press*). Contudo, esta deveria ser aprofundada com o exame de outras espécies associadas à *Carijoa*, como, por exemplo, *Desmapsamma*, grupo para o qual tal hipótese é sugerida.

De todo modo, até que novos resultados sejam gerados – sobretudo com a utilização de marcadores moleculares mais variáveis que permitam uma melhor avaliação da diversidade genética do complexo *M. (C.) microsigmatosa* – há fortes evidências contrárias a existência de um fluxo gênico contínuo entre estas áreas, e a distribuição destes haplótipos é melhor explicada se considerarmos estes como linhagens geneticamente isoladas dispersadas por eventos antrópicos.

#### 3.4.4 *Mycale* sem microscleras

Um dos achados mais proeminentes da análise da variabilidade morfológica do complexo *M. (C.) microsigmatosa* foi a existência de indivíduos com ausência completa de microscleras, ou, pelo menos, em uma frequência tão rara que o esforço amostral empregado na busca destas a partir das dissociações de espículas as relega a um estado de praticamente

ausentes. A ocorrência destes indivíduos na mesma localidade de outros com microscleras presentes em abundância, alguns com menos de um metro de espaçamento entre si, leva a crer que dificilmente fatores ambientais possam estar associados à ausência destas espículas, a não ser que se pretenda advogar uma hipótese *ad hoc* que inclua fatores micro-ambientais. Por outro lado, todos os indivíduos que apresentaram ausência de sigmas e anisoquelas pertencem a um único haplótipo, diferente dos demais, que abrangiam os indivíduos com estas microscleras, o que sugere que a ausência de microscleras esteja associada a fatores genéticos.

Até o presente momento, nenhuma espécie de *Mycale* foi descrita com ausência total de microscleras. Embora haja exemplos raros de espécies que careçam de sigmas, como *M. (Aeg.) magellanica* e *M. (O.) acerata*, a ausência de anisoquelas é uma exceção à diversidade do gênero. O mais próximo disto foi proposto por van Soest (1984), envolvendo especificamente *M. (C.) microsigmatosa*. O autor sugeriu uma co-especificidade entre esta espécie e *Desmacella meliorata* Wiedenmayer, 1977; uma vez que a maior parte de suas características morfológicas (*i.e.*, forma, consistência, cor, arquitetura esquelética, tamanho e forma das megascleras, e tamanho das sigmas) se mostraram bem similares. A única grande diferença entre estas seria a presença de anisoquelas na espécie de *Mycale*. Contudo, uma vez que em alguns indivíduos de *M. (C.) microsigmatosa* o autor observou que as anisoquelas eram extremamente raras, este implicitamente concluiu que estas microscleras ou foram negligenciadas na descrição de *D. meliorata*, ou que estas poderiam ter sido perdidas na população em questão. Redmond e colaboradores (*in press*), em sua reconstrução filogenética das demosponjas por meio do marcador 18S, recuperaram uma relação de parentesco entre *M. (C.) microsigmatosa* e *Desmacella lampra* de Laubenfels, 1954, a qual é morfológicamente similar a *D. meliorata*. Este resultado reforça a suposição de van Soest (1984) de que poderia haver uma espécie de *Mycale* na qual as anisoquelas seriam praticamente ausentes ou muito raras.

Se consideramos que a evolução destas características morfológicas, onde a perda e ganho de categorias de microscleras é um fenômeno relativamente frequente entre espécies aparentadas (Capítulo 2), é possível imaginar que uma linhagem poderia levar este processo a um nível mais extremo, perdendo todas as categorias dessas espículas. As evidências apresentadas acima estabelecem a potencialidade da perda – mesmo que independente – de sigmas e anisoquelas em espécies de *Mycale*. Contudo, parece haver, por parte dos autores, certa resistência na descrição de tais espécies, mesmo quando há indícios para tal:

Specimen MCZ 7073 (from West Indies) is a piece of a tubular sponge 6 cm in diameter, with an apical pseudoscule 2.5 cm wide. The reticulation, with meshes up to 3 mm wide, is closer

and more regular than in MCZ 7008, devoid of the orientation toward the surface shown by MCZ 7071. The fibres of amber-coloured spongin contain subtylostyles less densely arranged than in the other two specimens. These spicules, straight, with elongated narrow tyle, measuring 260-290 x 3-3.5  $\mu\text{m}$  are of the common *Mycale* type. No microscleres have been found in my preparations. I consider this specimen as a *Mycale* not specifically definable at the moment.

(Pullitzer-Finalli, 1986, p. 129)

A possibilidade de perda destas microscleras em *Mycale* deve ser reavaliada pelos autores, e considerada como uma potencialidade no processo evolutivo destas espécies, ao invés de creditar a estas espículas *conditio sine qua non* para a existência do grupo. O papel funcional destas espículas é totalmente obscuro – com exceção de uns poucos exemplos que não se aplicam ao caso (e.g., VACELET e BOURY-ESNAULT, 1995) – e as funcionalidades postuladas para estas na organização do esqueleto poderiam facilmente ser realizadas por megascleras modificadas. Muitos autores consideram as microscleras como características não-adaptativas (e.g., RIDLEY e DENDY, 1887; DENDY, 1921; HAJDU *et al.*, 1994). Desta forma, estas espículas seriam livres para evoluir, não apresentando restrições adaptativas tais como características cujas funções no organismo poderiam vir a ser perdidas caso estas fossem modificadas – como no caso da perda de megascleras, a qual poderia levar ao colapso do corpo da esponja uma vez que esta espícula está intrinsecamente associada à sustentação do seu esqueleto. Os mecanismos de regulação de expressão de características, que postuladamente permitem o aparecimento intermitente destas características, creditados a operarem na evolução de perdas e ganhos de características morfológicas em *Mycale* (e.g., CARBALLO e HAJDU, 1998, 2001), seriam tão igualmente cabíveis na perda completa de microscleras quanto são na perda parcial.

Se, de fato, há um predomínio da ideia de que estas espículas não apresentam papel estrutural relevante na morfologia destas esponjas, esta deve vir associada à de que a ocorrência de microscleras é neutra no processo evolutivo. Por conseguinte, o número de tipos e categorias destas espículas poderia operar como características de evolução estocástica, estando condicionados somente pela contingência histórica das linhagens das espécies em que são encontradas. E se nestas a perda revelou-se predominante ao ganho, a ausência completa de microscleras seria mais uma questão de improbabilidade do que de impossibilidade.

O *status* específico destes indivíduos sem microscleras e restritos a um único haplótipo – da mesma forma como nos demais (ver acima) – permanece incerto. Embora haja diferenças marcantes na composição espicular destes espécimes em comparação com outros da mesma localidade, uma análise mais abrangente da sua morfologia – que, por exemplo,

incluiria uma comparação de sua arquitetura esquelética – ainda é necessária a fim de que seja proposta uma nova espécie. Adicionalmente, marcadores moleculares mais variáveis deveriam ser utilizados para que se possa inferir relações evolutivas com maior resolução de forma a melhor avaliar a independência de sua linhagem evolutiva. Além disso, a inclusão das espécies de *Desmacella* apresentadas acima – as quais postuladamente estariam relacionadas ao complexo *M. (C.) microsigmatosa* – nestas novas análises permitiria não só averiguar a questão da evolução das perdas de microscleras, como também estabelecer uma comparação com potenciais táxons co-específicos.

#### 3.4.5 Correlações morfométricas

As análises de correlação entre os parâmetros morfométricos das espículas do complexo *M. microsigmatosa* mostraram um número razoável de correlações significativas entre os mesmos (6 de 15). Estas análises indicam que as dimensões destas espículas estão sujeitas a fatores basais em comum. Esta concepção se torna mais evidente ao serem encontradas correlações entre parâmetros de espículas diferentes, uma vez que estas são sintetizadas independentemente (CUSTÓDIO *et al.*, 2002), pois somente a subjacência a processos espiculogénéticos básicos poderia determinar alterações concomitantes entre estas.

O parâmetro que apresentou o maior número de correlações significativas foi a largura máxima do subtilóstilo-I (W), o qual esteve correlacionado com a largura da cabeça do subtilóstilo-I (T), com a razão T/W e com o comprimento da sigma-I (S). Embora a largura do subtilóstilo seja uma medida linear, por se tratar de uma estrutura cilíndrica, esta medida reflete uma escala bi-dimensional (quadrática). E sendo assim, remonta ao processo espiculogénético básico de biodeposição de sílica, uma vez que quanto maior esta biodeposição, maior será a largura da espícula. Se esta relação entre biodeposição e largura é, de fato, realidade – como teoricamente se imagina ser – é possível então que os parâmetros correlacionados com a largura o sejam devido a este processo. E desta forma, os parâmetros T, T/W e S seriam altamente dependentes do grau de biodeposição de sílica nas espículas. Este argumento faz maior sentido em alguns casos, como, por exemplo, na relação W x T, onde a mesma lógica em relação à largura do subtilóstilo se aplica à largura da cabeça do subtilóstilo, e sendo assim, os dois parâmetros estariam estimando o mesmo processo, a biodeposição de sílica, e logo estariam significativamente correlacionados. Contudo, a correlação entre W e T/W é contraintuitiva, pois se observa uma correlação negativa entre estes dois parâmetros, mas que pode ser explicada por diferenças na taxa de biodeposição ao

longo do eixo da espícula, sendo esta maior na porção mediana do que nas extremidades. Por outro lado, não há muita lógica na significância da correlação entre W e S, exceto que de, possivelmente, a alta biodisponibilidade de sílica ou de biodeposição podem influenciar a síntese destas espículas, levando a sigmas maiores.

Um outro parâmetro que também apresentou correlações significativas com outros parâmetros foi a razão T/W. Além da correlação com a largura (ver acima), este também se mostrou estar correlacionado com o comprimento do subtilóstilo-I (L) e da sigma-I (S). A correlação entre L e T/W é surpreendente, pois T não apresenta correlações significativas com W ou T. Isto implica que, embora a quantidade de sílica depositada em torno da espícula esteja pouco relacionada com o comprimento do subtilóstilo, de alguma forma, espículas maiores tendem a apresentar uma taxa de biodeposição maior em torno de suas porções medianas, reforçando a existência de uma taxa de biodeposição diferencial ao longo da espícula. Por outro lado, esponjas cujo subtilóstilo apresentam maior razão T/W tenderiam a apresentar sigmas maiores. Mas, uma vez que W e S estão correlacionados, assim como W e T/W também estão, é difícil avaliar se a correlação entre T/W e S seja devido à algum mecanismo específico ou simplesmente um subproduto da correlação entre os parâmetros com um terceiro em comum (W).

Por fim, o comprimento da sigma (S) foi observado estar relacionado positivamente com o comprimento da anisoquela (A), uma relação que implica que esponjas que apresentam sigmas comparativamente grandes tendem a apresentar também anisoquelas maiores. Como já argumentado acima, o comprimento da sigma se mostrou correlacionado com W, sugerindo que de alguma forma a taxa ou disponibilidade de sílica possa influenciar a síntese destas espículas. A relação entre biodisponibilidade de sílica e síntese de espícula foi estimada experimentalmente por Maldonado e colaboradores (1999), no qual os autores demonstraram que um aumento na concentração de sílica dissolvida no ambiente permitiu, além da síntese de um maior número de categorias de espículas – *i.e.*, uma relação quantitativa – a síntese de tipos espiculares não encontrados usualmente na espécie estudada – uma relação qualitativa. A correlação significativa entre W e S sugere uma afinidade com o encontrado pelos autores, uma relação na qual uma maior disponibilidade de sílica levaria a formação de megascleras mais largas e microscleras maiores. Todavia, o parâmetro A não apresentou correlação com nenhum outro parâmetro, o que sugere que a correlação entre S e A provavelmente deriva de um mecanismo mais específico da espiculogênese de microscleras.