



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

Bruno Cosme da Silva Gomes

**Filogenia de Mycalina Hajdu, van Soest & Hooper, 1994 (Poecilosclerida,
Demospongiae): dados morfológicos e moleculares**

Rio de Janeiro

2012

Bruno Cosme da Silva Gomes

**Filogenia de Mycalina Hajdu, van Soest & Hooper, 1994 (Poecilosclerida,
Demospongiae): dados morfológicos e moleculares**



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

Orientadora: Prof.^a Dra. Gisele Lôbo-Hajdu

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo C. M. Hajdu

Rio de Janeiro

2012

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

G633 Gomes, Bruno Cosme da Silva.
Filogenia de Mycalina Hajdu, van Soest &
Hooper, 1994 (Poecilosclerida, Demospongiae):
dados morfológicos e moleculares / Bruno Cosme da
Silva Gomes. - 2012.
157 f. : il.

Orientadora: Gisele Lôbo-Hajdu.
Coorientador: Eduardo C. M. Hajdu.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do
Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto
Alcântara Gomes.

1. Esponjas - Teses. I. Lôbo-Hajdu, Gisele. II.
Hajdu, Eduardo C. M. III. Universidade do Estado
do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto
Alcântara Gomes. IV. Título.

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

Assinatura

Data

Bruno Cosme da Silva Gomes

**Filogenia de Mycalina Hajdu, van Soest & Hooper, 1994 (Poecilosclerida,
Demospongiae): dados morfológicos e moleculares**

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

Aprovada em 29 de fevereiro de 2012.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Gisele Lôbo Hajdu
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Carla Zilberberg
Departamento de Zoologia - UFRJ

Prof.^a Dra. Mariana de Souza Carvalho
Departamento de Invertebrados - Museu Nacional, UFRJ

Prof. Dr. Paulo Marques Machado Brito
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Sonia Barbosa dos Santos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a três mulheres, que deixaram saudade, foram e são muito importantes para mim: Maria Gomes, Alayde Gomes e Solange Peixinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha bisavó Alayde Rosa, uma mulher forte e sábia; à minha avó Abghair, carinhosa e alegre; minha mãe Rosangela e tias Nelcy Maria, Maria Janice, Regina Maria e Arlinda Maria pelo cuidado, incentivo e grande apoio nos momentos de grande dificuldade.

À minha orientadora, Gisele Lôbo Hajdu, pelo cuidado, carinho, paciência e orientação que me deu durante estes quatro anos de trabalho árduo. Ao meu co-orientador, Eduardo Hajdu, pela orientação e direcionamento em momentos cruciais.

À Sula Salani (Sulinha) minha amiga de todas as horas, fossem elas tristes, alegres ou de farras. Solange Peixinho (Sol), minha amiga e eterna orientadora, pelas sábias palavras que tanto me ajudaram e me ajudarão. A Rodrigo Borges pelas ajuda em muitos momentos. A Lúcia Ornelas, minha professora e conselheira.

A Thiago de Paula, pelas boas discussões e conselhos valiosos. Ao Marcelo Lima pela presteza em ouvir e responder minhas dúvidas. Valéria Aguiar e Melanie Silva pela ajuda nas atividades de Bancada e a equipe do LGMar.

Aos Professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da UERJ. À FAPERJ e à CAPES pela bolsa de Doutorado.

O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.

Winston Churchill

RESUMO

COSME DA SILVA GOMES, Bruno. *Filogenia de Mycalina Hajdu, van Soest & Hooper, 1994 (Poecilosclerida, Demospongiae): dados morfológicos e moleculares*. 2012. 157f. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

No Filo Porifera a proposição de esquemas classificatórios são problemáticas, principalmente pelo baixo grau de complexidade de especialização, escassez de caracteres distintivos e a elevada plasticidade morfológica. A partir do século XIX emergiram classificações mais robustas. O que conhecemos hoje como Ordem Poecilosclerida só começou a ser delineado pela iniciativa de Zittel (1878) com o reconhecimento de “Monaxonida”, ou seja, reconhecimento de um padrão de simetria nas categorias de espículas. Ridley e Dendy (1887) apresentaram uma nova classificação para as esponjas do grupo “Monaxonida” utilizada por Topsent (1894) para criação da Família Poeciloscleridae, erigida a ordem por este último autor em 1928, enfatizando a presença das quelas como microscleras. Posteriormente, van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1988) empreenderam discussões dessa classificação com base em uma perspectiva filogenética. Uma classificação robusta e de consenso só foi conseguida a partir dos trabalhos de Hajdu e colaboradores (1994a, 1994b) e Hajdu (1994, 1995), com o estabelecimento das Subordens: Mycalina, Myxillina e Microcionina. Apesar disso, as relações internas das famílias da Subordem Mycalina permaneciam com dúvidas, principalmente no tocante à inclusão de Podospongiidae, Isodictyidae, e a relação de Poecilosclerida com a Ordem Haplosclerida. Neste trabalho foi proposto a revisão da classificação da Subordem Mycalina com base em dados morfológicos e moleculares. Foram feitas análises filogenéticas em três níveis taxonômicos, espécie, gênero e família, com base em dados morfológicos. Além disso, foi feita uma análise filogenética molecular utilizando sequências parciais da subunidade maior do RNA ribossomal (LSU do RNAr). As amostras de Mycalina foram amplificadas via PCR e posteriormente sequenciadas. Com base nestes resultados foi concluído que: as Famílias Cladorhizidae, Guitarridae, Mycalidae e Hamacanthidae são monofiléticas. Para esta última foi confirmada a série de transformação sigmancistra > cirtancistra > diâncistra > clavidisco. A posição da Família Podospongiidae dentro de Mycalina está bem corroborada, porém, precisa ser melhor estudada com dados moleculares para determinar, ou não, o seu monofiletismo. A Família Esperipsidae precisa ser melhor estudada com base em dados morfológicos e o gênero *Amphilectus* precisa ser revisado, provavelmente uma parte deste estaria melhor alocado em Haplosclerida junto com Isodictyidae. A Família Desmacellidae não é monofilética, bem como *Biemna* e *Neofibularia*, provavelmente, não são Poecilosclerida e deveriam ser transferidas para uma posição próxima de Tetractinellida. *Desmacella* provavelmente é uma Mycalina com posição basal na Subordem. Os demais gêneros precisam ser estudados com base em dados moleculares. A Ordem Haplosclerida provavelmente é o grupo irmão de Poecilosclerida e a série de transformação sigmas > quelas foi confirmada com base em dados morfológicos e moleculares. A Subordem Mycalina não é monofilética como definida em Hajdu e van Soest (2002a).

Palavras-chave: Sistemática. Porifera. Evolução.

ABSTRACT

At Phylum Porifera the proposition of classificatory schemes is troublesome, especially by the morphological low level complexity of specialization, paucity of distinctive characters and high plasticity. More robust classifications emerged since the XIXth. century. Poecilosclerida Order only began to be outlined by the initiative of Zittel (1878) with the recognition of "Monaxonida", i.e., a recognition of symmetry pattern in spicules categories. Ridley and Dendy (1887) presented a new classification of the sponges of the group "Monaxonida." Topsent (1894) created the Poeciloscleridae Family, and latter (1928) erected to Order, by emphasizing the presence of chelae as microscleras. Posteriorly, van Soest (1984) and Bergquist and Fromont (1988) undertook a discussion of this classification based on a phylogenetic perspective. A robust classification and consensus was not achieved before from the works of Hajdu *et al.* (1994a, 1994b) and Hajdu (1994, 1995), with the establishment of the Suborders: Mycalina, Myxillina and Microcionina. Nevertheless, the internal relationship of Mycalina Suborder's families remained in doubt, especially regarding the inclusion of Podospongiidae, Isodictyidae, and the relationship between Poecilosclerida and Order Haplosclerida. In this study, we proposed the revision of the classification of Mycalina Suborder based on morphological and molecular data. Phylogenetic analysis was performed in three taxonomic levels, Species, Genus and Family, based on morphological data. The molecular phylogenetic analysis was made using partial sequences of Large Subunit ribosomal RNA (LSU rRNA). Samples of Mycalina were amplified by PCR and sequenced. Based of these, I concluded that: Families Cladorhizidae, Guitarridae, Mycalidae and Hamacanthidae are monophyletic. For this last, the transformation series, sigmancistra>cyrtancistra>diancistra>clavidisc, was confirmed. The position of Family Podospongiidae within Mycalina was well supported, but need to be studied with molecular data to determine monophyletic status. Family Esperipsidae needs to be further studied based on morphological data; and *Amphilectus* Genus needs to be revised, probably it is splitted and would be transfered to Order Haplosclerida together with Family Isodictyidae. Family Desmacellidae is not monophyletic, *Biemna* and *Neofibularia* are probably not Poecilosclerida and should be transferred to a position close to Tetractinellida. *Desmacella* is probably a true Mycalina with a basal position in the Suborder. The other genera need to be studied with molecular data. Order Haplosclerida is probably the sister group of Poecilosclerida; the series of transformation sigma>chela was established based on morphological and molecular data. Suborder Mycalina is not monophyletic as defined in Hajdu and van Soest (2002a).

Keywords: Systematics. Porifera. Evolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Classificação proposta por Bowerbank (1864), figura modificada do mesmo autor.....	20
Figura 2 –	Proposta filogenética para as Famílias de Poecilosclerida apresentada em van Soest (1984).....	33
Figura 3 –	Proposta filogenética para as Famílias de Poecilosclerida apresentada em Bergquist e Fromont (1988).....	33
Figura 4 –	Hipótese filogenética das relações entre a Ordem Haplosclerida e as Famílias da Ordem Poecilosclerida, segundo van Soest (1987)	46
Figura 5 –	Cladogramas explicitando as diferentes visões a cerca do <i>status</i> sinapomórfico dos caracteres nas relações entre as Ordens Haplosclerida e Poecilosclerida como resultado da posição de <i>Isodictya</i>	47
Figura 6 –	Hipótese filogenética das relações entre as Ordens Haplosclerida e Poecilosclerida segundo Samaai e colaboradores (1999), justificando a alocação do gênero <i>Isodictya</i> na Ordem Poecilosclerida.....	49
Figura 7 –	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) exemplificando três morfotipos de quelas: (1) palmada (extraído de LOPES; HAJDU, 2004), (2) arcuada (extraído de VAN SOEST, 2011) e (3) ancorada (extraído de VACELET et al., 2009).....	53
Figura 8 –	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com a série de transformação das sigmancistras: (1) sigmancistra, (2 e 3) diancistras e (4) clavidisco. Extraído de Hajdu e colaboradores (1994b).....	58
Figura 9 –	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) exemplificando toxas. A, toxas em duas categorias: toxa-I (grande) e toxa-II (pequena); e B, toxas pequenas. Extraídas de Carballo e Barrradas (2010).....	60
Figura 10 –	Imagens de microscopia óptica (MO) e eletrônica de varredura (MEV) apresentando micalostilos, megascleras típicas da Subordem Mycalina e detalhes da base e ponta. A e B, extraídas de Carballo e Barrradas (2010) e, C e D, de Vacelet et al. (2006).....	60

Figura 11 –	Hipótese filogenética de espécies de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via máxima parcimônia (MP). Os números acima representam o número do caracter e abaixo a transformação do estado do caracter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias.....	96
Figura 12 –	Hipótese filogenética de espécies de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via análise bayesiana (BA). Os números acima representam o número do caracter e abaixo a transformação do estado do caracter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias.....	97
Figura 13 –	Hipótese filogenética de espécies de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via <i>Neighbor Joining</i> (NJ). Os números acima representam o número do caracter e abaixo a transformação do estado do caracter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias.....	98
Figura 14 –	Hipótese filogenética do gêneros de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via máxima parcimônia (MP). Os números acima representam o número do caracter e abaixo a transformação do estado do caracter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias.....	102
Figura 15 –	Hipótese filogenética do gêneros de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via análise bayesiana (BA). Os números acima representam o número do caracter e abaixo a transformação do estado do caracter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias.....	103
Figura 16 –	Hipótese filogenética do gêneros de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via <i>Neighbor Joining</i> (NJ). Os números acima representam o número do caracter e abaixo a transformação do estado do caracter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias.....	104
Figura 17 –	Hipótese filogenética das famílias de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via máxima parcimônia (MP). Os números acima representam o número do caracter e abaixo a transformação do estado do caracter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias.....	107
Figura 18 –	Hipótese filogenética das famílias de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via análise bayesiana (BA). Os números acima representam o número do caracter e abaixo a transformação do estado do caracter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias.....	108

Figura 19 –	Hipótese filogenética das famílias de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via <i>Neighbor Joining</i> (NJ). Os números acima representam o número do caracter e abaixo a transformação do estado do caracter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias.....	109
Figura 20 –	Eletroforese em gel de 0,8 % de agarose mostrando a extração de DNA genômico total de oito amostras, não tratadas com RNase. Amostras 31-33 coletadas em 2002; 29-30,35 coletadas em 2005. A = DNA de fago λ com 10 ng, B = DNA de fago λ com 50 ng. Os números com setas indicam o comprimento em pares de bases das bandas.....	110
Figura 21 –	Região central do eletroferograma da sequência em sentido senso da amostra ID 40 coletada em 2006. As cores correspondem as seguintes bases do DNA: preto, guanina(G); azul, citosina(C); vermelho, timina(T); e verde, adenina(A).....	111
Figura 22 –	Hipótese filogenética gerada a partir de dados moleculares analisados via máxima parcimônia (MP). Valores de bootstrap (1000 replicações) na parte interna dos ramos.....	113
Figura 23 –	Hipótese filogenética gerada a partir de dados moleculares analisados via bayesiana (BA). Valores de probabilidade posterior (5×10^6 gerações) apresentada nos ramos.....	114
Figura 24 –	Hipótese filogenética gerada a partir de dados moleculares analisados via <i>Neighbor Joining</i> (NJ). Valores de bootstrap (1000 replicações) apresentada nos ramos.....	115
Figura 25 –	Hipótese filogenética gerada a partir de dados moleculares analisados via máxima verossimilhança (ML). Valores de bootstrap (1000 replicações) na parte interna dos ramos.....	116
Figura 26 –	Hipótese filogenética gerada a partir de dados moleculares analisados via anevolução mínima (ME). Valores de bootstrap (1000 replicações) na parte interna dos ramos.....	117
Figura 27 –	Um pequeno segmento de uma vertente da dupla hélice do DNA com as quatro bases comuns. Os principais sítios de danos são indicados por setas. (G), guanina; (C), citosina; (T), timina; e (A), adenina. Modificado de Hofreiter e colaboradores (2001).....	137
Figura 28 –	Eletroferograma da sequência do espécime ID 263. O gráfico correspondente a sequência de bases está bem definido e não se percebe mistura de genomas, entretanto, a blast retornou identidade de 100% para um fungo. As cores correspondem as seguintes bases do DNA: preto, guanina(G); azul, citosina(C); vermelho, timina(T); e verde, adenina(A).....	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação e diagnose dos táxons (sem Hexactinellida) propostos por Carter (1875).....	18
Tabela 2 –	Proposta de classificação apresentada por Ridley e Dendy (1887)	24
Tabela 3 –	Diagnose para as Famílias de Poecilosclerida segundo a visão de van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1988).....	36
Tabela 4 –	Material utilizado na extração e amplificação de DNA. ID = identificação única para o produto da extração; [DNA] = concentração de DNA; 260/280 = relação entre OD 260 nm/ OD 280 nm; 260/230 = relação entre OD 260 nm/ OD 230 nm.....	69
Tabela 5–	Oligonucleotídeos (<i>primers</i> , em inglês) específicos utilizados neste trabalho.....	83
Tabela 6 –	Matriz utilizada na análise filogenética das espécies da Subordem Mycalina. Nas colunas estão os números dos caracteres; nas linhas espécies e presença (1), ausência (0) ou estados dos caracteres (2 ou mais).....	87
Tabela 7 –	Matriz utilizada na análise filogenética dos gêneros da Subordem Mycalina. Nas colunas estão os números dos caracteres; nas linhas espécies e presença (1), ausência (0) ou estados dos caracteres (2 ou mais).....	101
Tabela 8 –	Matriz utilizada na análise filogenética das famílias da Subordem Mycalina. Nas colunas estão os números dos caracteres; nas linhas espécies e presença (1), ausência (0) ou estados dos caracteres (2 ou mais)	105
Tabela 9 –	Táxons utilizados na análise molecular; os sem número no GenBank são sequências geradas neste trabalho.....	112
Tabela 10 –	<i>BLAST</i> dos táxons retornados na busca nas cinco primeiras posições.....	140

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA TAXONÔMICO	15
1.1	De “Monaxonida” Ridley & Dendy, 1887 à “Poeciloscleridae” Topsent, 1894 – Histórico	16
1.2	O século XX entre Poecilosclerida e as Subordens de Poecilosclerida	27
1.3	O sistema de Subordens para Poecilosclerida	44
1.4	Myalina após o Systema Porifera	59
1.5	O ponto de vista da sistemática molecular	63
2	OBJETIVOS	67
2.1	Objetivo Geral	67
2.2	Objetivos Específicos	67
3	MATERIAL E MÉTODOS	68
3.1	Material Examinado	68
3.2	Estudo das espículas	68
3.2.1	<u>Dissociação espicular em tubo de ensaio</u>	68
3.2.2	<u>Dissociação espicular em lâmina</u>	68
3.2.3	<u>Mensurações micrométricas em microscópio óptico</u>	80
3.2.4	<u>Observação do conjunto espicular em microscópio eletrônico de varredura</u>	80
3.3	Estudo da arquitetura esquelética	80
3.3.1	<u>Cortes histológicos</u>	80
3.3.2	<u>Montagem de pranchas de imagens ou desenhos de cortes histológicos</u>	81
3.4	Estudo da morfologia externa das esponjas em estéreo- microscópio	81
3.5	Filogenia morfológica	81
3.6	Estudo de marcadores moleculares	82
3.6.1	<u>Extração de DNA</u>	82
3.6.2	<u>Quantificação do DNA</u>	82
3.6.3	<u>Escolha de marcadores moleculares e amplificação</u>	82
3.6.4	<u>Purificação e sequenciamento</u>	85
3.7	Filogenia molecular	85

4	RESULTADOS	86
4.1	Filogenia Morfológica	86
4.1.1	<u>Filogenia de espécies</u>	86
4.1.2	<u>Filogenia de gêneros</u>	99
4.1.3	<u>Filogenia de famílias</u>	105
4.2	Estudo de marcadores moleculares	110
4.3	Filogenia Molecular	111
5	DISCUSSÃO	118
5.1	Filogenia Morfológica	118
5.1.1	<u>Filogenia de espécies</u>	120
5.1.2	<u>Filogenia de gêneros</u>	129
5.1.3	<u>Filogenia de famílias</u>	133
5.2	Dificuldades no uso de material biológico preservado em museus	136
5.3	Filogenia Molecular	141
6	CONCLUSÕES	145
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146

INTRODUÇÃO

1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA TAXONÔMICO

A identificação taxonômica precisa de Porifera é difícil e exige investimento de anos na formação de recursos humanos especializados. O reconhecimento de afinidades e, conseqüentemente, a proposição de esquemas classificatórios, é ainda mais complexa. Estas dificuldades estão relacionadas com a posição basal que as esponjas ocupam na classificação do reino animal, ou, em outras palavras, o baixo grau de complexidade, especialização e a escassez de caracteres distintivos. Paralelamente, a elevada plasticidade morfológica contribui para deduções precipitadas, já que duas espécies de diferentes gêneros (ou até famílias) podem assemelhar-se fortemente. A distinção de espécies de esponjas, no passado, era praticamente uma questão arbitrária em matéria de julgamento individual. As primeiras propostas de classificação baseavam-se essencialmente em caracteres morfológicos conspícuos com pouca ou nenhuma ênfase nas relações filogenéticas (ver críticas em BERGQUIST; FROMONT, 1988).

Neste universo, Poecilosclerida, a maior e mais diversificada Ordem da classe Demospongiae (aproximadamente 2600 espécies em VAN SOEST et al., 2011), representa um enorme desafio, exigindo análise comparativa detalhada de seus caracteres morfológicos, por sorte entre os mais díspares em Demospongiae. Não obstante, uma classificação filogeneticamente aceitável só foi obtida após 66 anos de debate (TOPSENT, 1928; DE LAUBENFELS, 1936; LÉVI, 1973; HARTMAN, 1982; VAN SOEST, 1984; BERGQUIST; FROMONT 1988; HAJDU et al., 1994) e adoção de novas metodologias (moleculares em sua maioria, ver BOURY-ESNAULT; SOLÉ-CAVA 2004; WÖRHEIDE et al., 2004, 2005).

Ao longo deste texto iremos apresentar um breve histórico das propostas de classificação, dos argumentos e diferentes interpretações acerca dos táxons superiores incluídos em Poecilosclerida com ênfase na Subordem Mycalina. Este texto está subdividido em quatro partes: a primeira refere-se ao período anterior a proposição da Ordem Poecilosclerida, ou seja “Monaxonida”/Halichondrina, até a criação da Família Poeciloscleridae (1849-1928). A segunda parte refere-se à criação da Ordem Poecilosclerida e às discussões sobre caracteres que permearam a

maior parte do século XX (1928-1988). A terceira parte trata do racional, uma abordagem mais sistemática e filogenética, que culminou com a proposição do sistema inicial de subordens, com base em uma reinterpretação de homologias espiculares e ênfase em congruência de perdas e ganhos evolutivos compartilhados (1988-1994). A quarta apresenta como a Subordem Mycalina é entendida hoje e o que foi alterado desde sua designação original (1994-2002).

1.1 De “Monaxonida” Ridley ; Dendy, 1887 à “Poeciloscleridae” Topsent, 1894 – Histórico

Ao longo deste tópico algumas classificações mais importantes serão apresentadas, e no decorrer do texto estas serão cada vez mais restringidas aos grupos que contribuíram para a proposição da Subordem Mycalina (Ordem Poecilosclerida, HAJDU; VAN SOEST, 2002a).

Segundo Ridley e Dendy (1887), “Monaxonida” compreendia, de longe, as esponjas mais comuns e abundantes. Estas ocorrem em maior ou menor abundância em todos os ambientes aquáticos, mas, sobretudo, em águas rasas, podendo ser coletadas inclusive no mesolitoral. Assim sendo, era, e sempre foi, fácil obter material em grande quantidade e com baixo investimento financeiro. Entretanto, o conhecimento da espongiofauna era pequeno no século XIX, frente a outros grupos zoológicos. Segundo os autores supracitados, esse estado da arte decorria do desinteresse dos naturalistas, por não terem sucesso ou se desestimularem frente à excepcional dificuldade para se produzir uma classificação minimamente satisfatória destes animais. Carter (1875) já mencionava que:

“... o assunto [classificar esponjas] é repulsivo pelas suas dificuldades.”

Esta realidade persistiu até meados do século XX. Não obstante vale uma ressalva sobre o porquê de tanta dificuldade, obviamente, contextualizada no cenário do século XIX.

Em primeiro lugar, autores como Ridley e Dendy (1887), ao contrário de Duchassaing e Michelotti (1864), consideravam impossível classificar grupos de acordo com caracteres externos. Eles argumentavam que por muitas vezes a

aparência externa de uma mesma espécie varia quase indefinidamente, e freqüentemente, duas espécies assemelham-se mutuamente, sendo impossível distinguí-las com segurança sem um exame ao microscópio. Sollas (1888) compartilhava a mesma opinião. De fato, a morfologia externa, via de regra, é fortemente influenciada pelo ambiente, e em menor grau, a morfologia interna também (MALDONADO et al., 1999; URIZ, 2006).

Em segundo lugar, muitos dos caracteres distinguíveis são diminutos e difíceis de observar. Se na atualidade, com todos os avanços da microscopia, estes ainda escapam aos olhos dos pesquisadores, no século XIX este fato era certamente mais comum. Por fim, Carballo e Hajdu (1998) valeram-se do termo “micromorfologia” ao se referirem aos caracteres que invariavelmente escapam às análises empreendidas exclusivamente ao microscópio óptico.

Carter (1875) havia elaborado uma classificação que não teve seu valor reconhecido de imediato, mas, que, subseqüentemente, mostrou ter lançado a linha mestra do reconhecimento diagnóstico da estrutura interna dos poríferos. Diversos táxons propostos por este autor, neste e em trabalhos posteriores, estão em uso no sistema classificatório corrente; viz. Aplysinidae, Axinellidae, Chondropsidae, Micriocionidae, Pachastrellidae, Phloeodictyidae e Pseudoceratidae (CARTER, 1875). A classificação proposta por Carter (1875) era como se apresenta (excluindo Hexactinellida) na Tabela 1.

Em Bowerbank (1864) é encontrada uma classificação simples, sem utilizar Família como nível hierárquico. A classificação foi baseada completamente na constituição química das espículas e uma categorização simplificada da arquitetura esquelética (Figura 1), sem nenhuma ênfase na anatomia das partes moles ou na forma das espículas (exceto como caráter específico). Os principais grupos reconhecidos por Bowerbank foram: i) Classe Porífera; ii) Ordem 1. Calcarea, espículas constituídas de carbonato; iii) Ordem 2. Silicea, espículas constituídas de sílica; e iv) Ordem 3. Keratosa, espículas (espiculóides e fibras) de material orgânico, podendo ou não possuir espículas silicosas.

Tabela 1 - Classificação e diagnose dos táxons (sem Hexactinellida) propostos por Carter (1875).

Taxon	Nome	Diagnose
Ordem	Carnosa	esponja sem esqueleto evidente
Familia	Halisarcida	sem espículas
	Gumminida	com espículas
		esqueleto de fibras coriáceas com grânulos, principalmente vazios; região central, contendo, na maior parte, material exógeno
Ordem	Ceratina	
Familia	Luffarida	fibras rígidas com grânulos brancos e opacos, centro normalmente vazio
	Aplysinida	fibras flácidas ou subrígidas, com centro amplo, granular e vazio
	Pseudocoratida	esqueleto semelhante ao de Raphidonernata, porém o material exógeno extravasa das fibras e alcança a camada dérmica
Ordem	Psammonemata	esqueleto composto por fibras sólidas, mais ou menos impregnadas por material exógeno
	Bibulida	fibras sólidas sem material exógeno no centro das fibras
	Hircinida	fibras sólidas com material exógeno no centro das fibras
	Pseudohircinida	fibras sólidas contendo material exógeno e espículas próprias no centro, ocasionalmente com suas próprias espículas equinando
		esqueleto composto por fibras córneas, impregnado por espículas próprias. A forma das espículas são principalmente aceradas, principalmente confinadas ao interior das fibras
Ordem	Raphidonernata	
Familia	Chalinida	crescimento digitiforme
	Cavochalinida	tubulares, vasiformes, ramos terminados em pontas finas (aculeated patulous), ou flabeliforme comprimido, plano frondoso ou dactiliforme
	Acervochalinida	massiva, compacta e isodictial
	Pseudochalinida	digitiforme, composta de fibras preenchidas por espículas

próprias e material exógeno

Ordem	Echinonemata	esqueleto composto de fibras coriáceas impregnadas internamente por espículas próprias e por espículas equinantes. As espículas são normalmente aceradas
Familia	Ectyonida	com espículas próprias equinantes a partir das fibras
	Axinellida	com espículas próprias equinantes projetando-se do interior das fibras
Ordem	Holoraphidota	esqueleto cujas fibras são normalmente composta por feixes de espículas próprias, unidas; espículas com formato variado
Familia	Renierida	espículas mais ou menos organizadas em forma de fibras (feixes); estrutura resiliente à pressão, como miolo de pão
	Suberitida	tecido semelhante à cortiça; espículas ligadas umas às outras como um feltro; tecido esponjoso e persistente, ou radialmente compacto e duro; espículas principalmente em forma de alfinete ou tachinha (tilóstilos ou subtilótilos), com uma terminação fina projetada através da superfície, dando uma aparência aveludada à esponja
	Pachytragida	tecido mais ou menos cortiçado, esponjoso, estrutura interna radial bem diferenciada
	Pachastrellida	sem córtex; com alta densidade espicular, tal como uma pedra dura (Lithistina); estrutura confusa, sem fibras
	Potamospongida	esponja frágil que produz corpos germinativos ou estatoblastos (gêmulas), habita águas doces

<i>Class.</i>	<i>Order.</i>	<i>Suborder.</i>	<i>Genera.</i>
PORIFERA.	I. CALCAREA		Grantia, Fleming. Leucosolenia, Bowerbank. Leuconia, Grant. Leucogypisia, Bowerbank.
	II. SILICEA.....	1. Spiculo-radiate skeletons	Geodia, Lamarck. Pachymatisma, Bowerbank. Eciomema, Bowerbank. Aleyoucellum, Quoy et Gaimard. Polymastia, Bowerbank. Halyphysema, Bowerbank. Clocalypta, Bowerbank. Tethea, Lamarck. Halicnemis, Bowerbank. Dietyocylindrus, Bowerbank. Phakellia, Bowerbank. Microciona, Bowerbank. Hymenaphia, Bowerbank. Hymedesmia, Bowerbank. Hymeniacion, Bowerbank.
		2. Spiculo-membranous skeletons	Halicbondria, Fleming.
3. Spiculo-reticulate skeletons		Hyalonema, Gray. Isodictya, Bowerbank. Spongilla, Linnaeus.	
4. Spiculo-fibrous skeletons		Desmacidon, Bowerbank. Raphyrus, Bowerbank.	
5. Compound reticulate skeletons		Diplodemia, Bowerbank.	
6. Solid siliceo-fibrous skeletons		Dactylocalyx, Stutchbury.	
7. Canaliculated siliceo-fibrous skeletons.....		Farrea, Bowerbank.	
III. KERATOSA	1. Solid non-spiculate kerato-fibrous skeletons	Spongia, Linnaeus. Spongionella, Bowerbank.	
	2. Solid semispiculate kerato-fibrous skeletons	Halispongia, Blainville.	
	3. Solid entirely spiculate kerato-fibrous skeletons	Chalina, Grant.	
	4. Simple fistulo-fibrous skeletons	Verongia, Bowerbank.	
	5. Compound fistulo-fibrous skeletons.....	Auliskia, Bowerbank.	
	6. Regular semi-areno-fibrous skeletons.....	Stematomenia, &c., Bowerbank.	
	7. Irregular and entirely areno-fibrous skeletons	Dysidea, Johnston.	

Figura 1 - Classificação proposta por Bowerbank (1864), figura modificada do mesmo autor.

Pouco tempo depois Schmidt (1870) apresentou uma proposta para a Classe Silicea, sem a proposição de ordens, apenas de famílias e espécies. A caracterização das famílias não foi bem estabelecida e o reconhecimento destas se deu através dos diversos gêneros descritos pelo autor; além disso, a língua de publicação, alemão, dificultou o seu entendimento. As famílias segundo Schmidt (1870) eram: 1. Lithistidae; 2. Halisarcinae e Gummineae; 3. Ceraospongiae; 4. Chalineae; 5. Renierinae; 6. Suberitidinae; 7. Desmacidinae; 8. Chalinopsidinae; 9. Ancorinidae e 10. Geodinidae.

Posteriormente, Gray (1872) produziu um esquema muito mais elaborado, com duas subclasses, sendo a primeira dividida em duas seções (seção A com duas subseções cada qual incluindo três ordens) e a segunda incluindo apenas três famílias. A seção A trata das esponjas marinhas, considerando inclusive a natureza ambiental como um caráter mais importante do que os elementos morfológicos, haja vista a inclusão das Hexactinellida nesta seção. A seção B compreende as esponjas dulciaquícolas. Apesar deste critério, particular, de separação de grupos, Gray (1872) foi, provavelmente, o primeiro autor a atentar para detalhes da

micromorfologia, como forma, tamanho, distribuição e organização de espinhos nas espículas.

Gray (1872) seguiu os passos de Carter (1849) e propôs o uso intensivo de caracteres da anatomia interna, notadamente das espículas, no delineamento de táxons superiores em Porifera. Apesar de seu caráter complexo e frequentemente artificial, boas características estão presentes nesta classificação, principalmente a idéia inovadora quanto ao posicionamento das Keratosa (que não possuem espículas silicosas, apenas fibras protéicas) entre as Silicea.

A classificação de Gray (1872) foi aparentemente feita de forma independente, uma vez que não há menção a Schmidt (1870). Na verdade, naquela época os taxonomistas acreditavam terem a obrigação de propor uma nova classificação. Nenhuma destas classificações sobreviveu por muito tempo da forma proposta originalmente, mas tiveram sua importância na construção do sistema aceito atualmente através do acréscimo paulatino de novas classes de características (e.g. espículas, detalhes da ornamentação, arquitetura esquelética, como as espículas se interconectam no esqueleto, presença e organização de fibras de esponjina, bem como sua interação com as espículas e etc.). Vários táxons com escopo mais ou menos fiel à proposta original, ainda são aceitos na classificação mais recente dos poríferos (HOOPER; VAN SOEST, 2002). Por exemplo, de Schmidt (1870) as famílias Ancorinidae, Desmacedidae, Halisarcidae e Suberitidae; e de Gray (1867, 1872), as famílias Chalinidae, Dysideidae, Geodiidae, Hamachantidae, Halichondriidae, Irciniidae, Placospongidae, Polymastiidae, Spongiidae e Tethyidae.

À Zittel (1878) é dado o crédito pelo reconhecimento de “Monaxonida” ou seja, reconhecimento de um padrão de simetria nas categorias de espículas, ainda que com o nome de Monactinellidae. A simetria espicular é um caráter importante, largamente empregado hoje.

Em Sollas (1882) o nome Monactinellidae foi alterado para “Monaxonidae”, visto que o radical “actin” refere-se a raios, implicando numa idéia de dominância das espículas monactinais, aquelas que são formadas por apenas um raio. Entretanto, as espículas diactinais, aquelas que possuem dois raios diametricamente opostos, eram tão freqüentes quanto às monactinais. Ambas as formas, entretanto, são “Monaxonidae”, isto quer dizer, possuem apenas um eixo, de modo que, a ligeira alteração no nome pareceu justificada. Posteriormente, foi alterada para “Monaxonida” para adequar-se à terminação empregada ao nível ordinal.

Segundo o esquema de Carter (1849) as seguintes famílias foram posteriormente consideradas “Monaxonida” sensu Zittel (1878): Chalinida, Cavochalinida, Acervochalinida, Pseudochalinida, Ectyonida, Axinellida, Reniericia, Suberitida e Potamospongida. Em seu trabalho, Bowerbank (1864) adota os níveis hierárquicos de: Ordem, Subordem e, dentro destas, uma assembléia de gêneros. “Monaxonida” eram encontradas principalmente entre as Silicea, tendo sido distribuídas em cinco Subordens. Em Schmidt (1870) os grupos: Chalineae, Renierinae, Suberitidinae, Desmacidinae e Chalinopsidinae correspondem à “Monaxonida” proposta por Zittel (1878). Em uma posterior revisão, Schmidt (1879) adota as modificações sugeridas por Zittel (1878), agrupando Chalineae e Chalinopsidinae como Monactinellida, e Ancorinidae e Geodinidae como Tetractinellida. As seguintes famílias estabelecidas por Gray (1872) pertencem às “Monaxonida” sensu Zittel (1878): Chalinidae, Clioniadae, Desmacidonidae, Esperidae, Gelliadae, Halichondriadae, Hamacanthidae, Phakelliadae, Polymastiadae, Raphiophoridae, Spongillidae, Suberitidae, Ophistospongidae, Xenospongidae e, talvez, Axidae.

Até esse momento, cada um dos sistemas, ou quase todos, foram baseados em investigações taxonômicas de coleções restritas, cada uma referente a uma fauna de um determinado local, o que em parte poderia explicar tantos equívocos e pouca congruência entre os grupos propostos.

Neste ponto, Vosmaer (1887) se destaca por utilizar não apenas os dados de “sua coleção”, mas também por estudar os sistemas anteriores aproveitando a melhor parte dos mesmos. A compilação em seguida resume a visão deste autor:

Porifera

Classe I. Porifera non-Calcareia

Ordem 1. Hyalospongiae (= Hexactinellida)

Ordem 2. Spiculispongiae

Subordem

I. Lithistina

II. Tetractina

III. Oligosilicina

IV. Pseudotetraxouia

V. Clavulina

Ordem 3. Cornacuspongiae

Subordem

I. Halichondrina

II. Ceratina

Classe II. Porifera eu-Calcareia

Ordem 1. Homocoela

Ordem 2. Heterocoela

No mesmo ano um grande trabalho foi publicado por Ridley e Dendy (1887), com base na classificação de Vosmaer (1887) e da coleção do “HMS Challenger”, navio que foi um dos protagonistas das grandes expedições do século XIX. Neste trabalho inúmeras espécies foram descritas e uma grande revisão da classificação das esponjas Monaxonida, até então conhecidas, foi proposta.

Ridley e Dendy (1887) se utilizaram da experiência taxonômica de seus antecessores e estabeleceram que, caracteres espiculares eram melhores para definições genéricas, características esqueléticas para o nível de Família e constituição química dos elementos espiculares para categorias superiores, somado a um conjunto, como eles mesmos assinalaram: “praticamente completo de todos os grupos de Porifera”. Para esses autores, era óbvia a necessidade de um esforço em identificar as estruturas das esponjas que estavam menos sujeitas às alterações ambientais e desta forma obter uma classificação mais consistente e embasada. Ainda, segundo eles, a morfologia externa deveria ser utilizada de forma muito limitada e com a máxima cautela.

Para exemplificar esse ponto de vista, compararam diferentes espécies de esponjas de profundidade, que possuem processos basais semelhantes a raízes, usadas para que a esponja não afunde na lama. Apesar de gêneros distintos apresentarem esta condição, a classificação destas espécies é distante uma das outras, o que demonstra, segundo eles, condições convergentes pelas exigências do ambiente.

Essa visão é surpreendente e extremamente importante, uma vez que a plasticidade fenotípica e o baixo número de caracteres disponíveis nas esponjas, em conjunto, são os principais responsáveis pela maioria dos equívocos taxonômicos até os dias atuais.

Ridley e Dendy (1887) desta forma apresentaram uma nova classificação para as esponjas do grupo “Monaxonida” (Tabela 2), a partir do qual viria a ser desmembrada tanto a Ordem Poecilosclerida quanto a Subordem Mycalina.

Posteriormente, Topsent (1894) discutiu a classificação como estabelecida por Ridley e Dendy (1887) (classificação sumarizada na Tabela 2); a Família Homorrhaphidae e as subfamílias de Heterorrhaphidae, Phloedictyinae e Gelliinae, foram fundidas para a criação da Família Haploscleridae. A Subfamília Tedaniinae (Heterorrhaphidae) e Desmacidonidae foram fundidas para criação da Família Poeciloscleridae (precursora “ideológica” da atual Ordem Poecilosclerida; TOPSENT, 1894).

A então Família Poeciloscleridae foi estruturada por Topsent (1894) como possuindo quatro subfamílias, duas das quais correspondentes a grupos reconhecidos por Ridley e Dendy (1887): 1) Esperellinae, para esponjas sem espículas equinantes somadas às megascleras ectossomais e coanossomais indiferenciadas; 2) Ectyoninae, para esponjas com espículas equinantes freqüentemente espinadas; 3) Dendroricinae, para esponjas sem espículas equinantes, mas possuindo distinção entre megascleras ecto- e coanossomais; e 4) Bubarinae, para esponjas com rabdóstilos.

Tabela 2 - Proposta de classificação apresentada por Ridley e Dendy (1887).

Taxon	Nome	Diagnose
Ordem	“Monaxonida”	esponja silicosa, cujas espículas possuem um único eixo

Subordem	Halichondrina	tipicamente sem córtex; esqueleto normalmente reticulado; espículas aceradas
Familia	Homorrhaphidae	megascleras todas diactinais, sejam óxeas ou estrôngilos; não possui microscleras
Subfamília	Renierinae	espículas podem ser unidas por uma pequena porção de espongina, mas nunca são completamente envelopadas por ela
Subfamília	Chalininae	com uma considerável quantidade de espongina presente, tipicamente formando uma camada espessa que envolve e une as espículas em fortes fibras
Familia	Heterorrhaphidae	megascleras de várias formas; microscleras normalmente presentes, mas nunca com quelas
Subfamília	Phloedictyinae	esponja massiva, consistindo de um corpo central, normalmente globuliforme, com processos tubuliformes (fístulas) abertos ou fechados; possui uma crosta espicular fina, bem marcada e transparente. O interior da esponja é composto por um tecido compacto, reticulado, contendo tanto espículas livres quanto espículas associadas a fibras, que se prologam pelos ramos dos sistemas de canais. As megascleras são óxeas, com pontas finas ou obtusas, ou estrôngilos, em algumas espécies. No gênero <i>Oceanapia</i> , as microscleras estão presentes na forma de sigmatas
Subfamília	Gelliinae	megascleras todas diactinais, óxeas ou estrôngilos; e microscleras presentes como sigmatas ou toxas. Sem crosta dérmica ou fístula
Subfamília	Tedaniinae	megascleras sempre de duas formas: (1) monactinal, estilos formando o esqueleto principal; (2) diactinal, tilotos ou tornotos, dermal. Microsclera sempre presente na forma de ráfide
Subfamília	Desmacellinae	com megascleras, todas, monactinais, estilotos ou

tilóstilos. As microscleras são sigmatas, tóxas ou ambas

Subfamília	Hamacanthinae	com megascleras tipo óxeas ou estilos. Sempre com grandes diancistras, às quais podem se somar outras microscleras
Família	Desmacidonidae	megascleras de várias formas, normalmente monactinais; quelas sempre presentes podendo somar-se a estas outras microscleras
Subfamília	Esperellinae	com fibras de espongina não equinadas por projeções espiculares laterais
Subfamília	Ectyoninae	com fibras de espongina equinadas por projeções espiculares laterais
Família	Axinellidae	com esqueleto tipicamente reticulado; consistindo de fibras ascendentes das quais emergem fibras secundárias que irradiam para a superfície; fibras tipicamente plumosas. Megascleras são, principalmente, estilos, às quais óxeas e/ou estrôngilos podem ser adicionados; microscleras raramente presentes, nunca quelas
Subordem	Clavulina	esponja tipicamente com crosta de espícula; esqueleto normalmente mais ou menos organizado de forma radial, com uma crosta dermal de espículas, as quais podem ser da mesma forma e tamanho das que formam o esqueleto principal ou com forma especial (espinado). Megascleras são tilóstilos; microscleras, quando presentes, pertencem ao grupo das estreladas; nunca quelas ou sigmatas. Espongina normalmente ausente
Família	Suberitidae	sem microscleras presentes
Família	Spirastrellidae	microscleras presentes; tipicamente formando uma crosta dermal mais ou menos contínua

Lundbeck (1902) também seguindo a proposta de Ridley e Dendy (1887) manteve a Família Heterorrhaphidae, mas utilizou o nome proposto por Topsent (1894), Poeciloscleridae, para o escopo da Família Desmacidonidae. Lundbeck (1905) utilizou duas subfamílias (ambas propostas por RIDLEY; DENDY, 1887): Ectyoninae e Esperellinae, renomeando esta última para Mycalinae, e subdividindo-a em Mycalea e Myxilleae. Já nesta ocasião, Lundbeck (1905), notava a artificialidade das subfamílias, sugerindo no futuro o subsequente abandono ou modificação. Topsent, em 1904, excluiu a Subfamília Bubarinae e manteve as outras três como ele havia propôsto em 1894.

Dendy (1905) discutiu a classificação de táxons superiores e agrupou três famílias, Haploscleridae, Desmacidonidae e Axinellidae, sob a nova Subordem Sigmatomonaxonellidae; considerando esta um táxon evolutivamente derivado da Subordem Sigmatophora (Tetractinellida), pela redução das megascleras. Este autor considerou o nome empregado por Topsent (1894), Poeciloscleridae (sensu LUNDBECK, 1902), desnecessário, pois se tratava da substituição de um nome sem a alteração na sua constituição interna. Assim sendo Poeciloscleridae seria uma sinonímia de Desmacidonidae.

1.2 O século XX entre Poecilosclerida e as Subordens de Poecilosclerida

Considerando a atual classificação de Poecilosclerida, Hentschel (1923) rendeu a mais importante contribuição até a primeira metade do século passado. Este autor construiu diagnoses robustas para os grupos existentes e criou muitas famílias, das quais algumas permanecem até o presente, por exemplo, Mycalidae e Esperipsidae.

Em 1928, revendo todo material coletado nos Açores e imediações pela expedição do Príncipe Albert de Mônaco, Topsent estabeleceu o status ordinal de Poecilosclerida, justificado pela grande diversidade de espécies e enfatizando a presença das quelas como microscleras (TOPSENT, 1928).

Topsent (1928) reservou Desmacidonidae para a Família com o gênero tipo, Desmacidon, definindo-a como uma Poecilosclerida com apenas uma categoria de megasclera. Além desta, outras famílias foram adicionadas: Anchinoidea,

Hymedesmiidae, Plocamiidae e Acarnidae e, muitas das famílias estabelecidas por Hentschel (1923), foram mantidas.

Os trabalhos subseqüentes concentraram-se na documentação faunística e descrição de táxons com pouca, ou nenhuma ênfase na revisão ordinal e nas relações entre as famílias. A classificação estabelecida por Topsent (1928) foi pouco modificada ao nível de famílias, até a década de 1990.

De Laubenfels (1936) publicou um dos mais amplos trabalhos taxonômicos, cujo objetivo primário foi a definição e classificação dos gêneros até então conhecidos para a Classe Demospongiae, estabelecida como tal em 1885 por Sollas, em resumo, a classe engloba as esponjas com fibras e/ou espículas silicosas, excluindo os grupos que possuem espículas com seis raios, hexactínias (Hexactinellida). O enfoque dado por de Laubenfels (1936), bem colocado pelo mesmo em sua introdução, foi puramente simplificar a organização do Filo Porifera (Grant, 1836), com pouco cuidado no que tange às relações filogenéticas.

Segundo de Laubenfels (1936), a Família Desmacionidae estaria melhor definida dentro da Ordem Haplosclerida, com base na presença de espículas diactinas; ele considerou que Desmacionidae estava mais relacionada às esponjas de água doce e ao gênero Haliclona Grant, 1836. Além disso, ele incluiu, em Desmacionidae, as famílias Adociidae, Agelasidae, Raspailiidae e muitas famílias de Lithistida (DE LAUBENFELS, 1936). Atualmente a maior parte destas famílias está alocada em outras ordens.

Lévi (1955) propôs divisões na Classe Demospongiae em três Subclasses: Ceractinomorpha, Homoscleromorpha e Tetractinomorpha, definidas com base em caracteres reprodutivos. Contudo, essa divisão não é mais universalmente aceita (para uma revisão ver HOOPER; VAN SOEST, 2002), e não será detalhada aqui.

Quanto às inter-relações entre as ordens da Classe Demospongiae, van Soest (1984) notou que havia forte correlação filogenética entre Poecilosclerida e Axinellida, justificada com base na posse de megascleras acantosas. Existem, também, algumas semelhanças na organização esquelética entre membros de ambas as ordens supracitadas. Por exemplo, Clathriidae, com esqueleto fibroso, é comparável a alguns gêneros de Axinellidae. Este paralelo em particular foi observado repetidamente na literatura (RIDLEY; DENDY, 1887; LÉVI, 1956; BERGQUIST, 1978, 1980). Contudo, a proximidade de Poecilosclerida e Axinellida conflitava com a divisão em subclasses (LÉVI, 1955) vigente à época da publicação

de van Soest (1984), já que Axinellida seria uma Tetractinomorpha e Poecilosclerida, uma Ceractinomorpha. Vale ressaltar que Axinellida é hoje aceita como uma Halichondrida; e as subclasses não são mais consideradas válidas, dada a inconsistência da distribuição, principalmente, dos caracteres reprodutivos, pressuposto sustentáculo destas.

Burton (1932, 1934, 1959) descreveu muitas espécies, e, segundo Bergquist e Fromont (1988), em todos os trabalhos daquele autor, houve uma tendência a reduzir Poecilosclerida ao que hoje é entendido como a Subordem Myxillina; sendo esta abordagem não seguida pelos autores subseqüentes.

Lévi (1973) e Bergquist (1978) em suas respectivas revisões seguiram a proposta de Topsent (1928) quanto ao status ordinal de Poecilosclerida e consideraram algumas famílias estabelecidas por Hentschel (1923), entretanto, nenhum destes autores reconheceu a validade dos subgrupos artificiais Esperellinae e Ectyoninae (LÉVI, 1973; BERGQUIST, 1978).

Van Soest (1984) publicou uma monografia onde discutiu relações e afinidades das famílias da Ordem Poecilosclerida, bem como desta com as demais ordens da Classe Demospongiae. Segundo Bergquist e Fromont (1988), as famílias foram ordenadas de acordo com o incremento da complexidade estrutural do esqueleto e não segundo uma progressão filogenética; mesmo após van Soest (1984) ter apresentado uma discussão dos agrupamentos e hipóteses de afinidade segundo o paradigma filogenético. Note que van Soest (1984) apresentou uma hipótese filogenética, sem a utilização de uma matriz formal, organizando as famílias num cladograma e apresentando uma discussão cladística.

Bergquist e Fromont (1988) apresentaram uma discussão sobre a classificação de Poecilosclerida e uma reanálise segundo o próprio ponto de vista no que tange à proposta de agrupamento de van Soest (1984). Segundo as autoras, as primeiras quatro famílias agrupadas por van Soest, foram Mycalidae, Cladorhizidae, Biemnidae e Desmacididae, todas sem megascleras ectossomais especiais, sem diferenciação regional do esqueleto e com apenas uma categoria de megasclera (BERGQUIST; FROMONT, 1988). Mycalidae possui estilotos, esqueleto coanossomal plumoreticulado e quelas em seu conjunto de microscleras. Cladorhizidae possui, também, uma categoria de megascleras monoactinais, as espécies são restritas às águas profundas, com hábito estipitado cujo esqueleto possui orientação axial comprimido e quelas. Segundo van Soest (1984), Biemnidae

é agrupada com Mycalidae e Cladorhizidae, sob ausência de diferenciação regional no esqueleto mais a presença de categoria única de microscleras monoactinais. Entretanto, Biemnidae apesar de não possuir quelas; apresenta sigmas, toxas, comas e esferas abundantes. Nenhuma destas quatro últimas microscleras citadas é restrita ao grupo de Poecilosclerida (BERGQUIST; FROMONT, 1988).

O gênero *Biemna* Gray, 1867 (Familia Biemnidae) possui esqueleto axial reticulado, caráter previamente estabelecido para indicar afinidade com esponjas da Ordem Lithistida (BERGQUIST, 1970; HOOPER, 1984). Segundo Bergquist e Fromont (1988) uma observação mais detalhada da organização do esqueleto tem-se revelado informativo a este respeito; demonstrando ser o esqueleto “axial” apenas uma reticulação condensada. Assim, não restando dúvida de que este era um caráter de Poecilosclerida presente no gênero *Biemna* (BERGQUIST; FROMONT, 1988).

Ainda segundo Bergquist e Fromont (op. cit.), o gênero *Biemna* é fortemente correlato a *Neofibularia* Hechtel, 1965 (Familia Desmacellidae) segundo a composição esquelética, também possui um esqueleto reticulado, que não é considerado “axinelideo”. *Neofibularia* possui muco copioso e caracteres histológicos, os quais são raros entre as esponjas da Familia Axinellidae, mas, comuns entre as Poecilosclerida (BERGQUIST; FROMONT, 1988). É importante salientar que segundo estas autoras fazia-se necessário reunir mais informações de fontes diversas para embasar ou questionar a classificação defendida por elas, insinuando que toda informação dos caracteres morfológicos já havia sido extraída.

O gênero *Desmacella* Schmidt, 1870 foi sempre considerado um tanto anômalo dentro de Poecilosclerida, porque, algumas espécies, possuem tilóstilos como megascleras, com tilos bem formados e com microscleras sigmas típicas, ocasionalmente acompanhadas por ráfides ou toxas. Então, onde agrupar *Desmacella*? Se considerarmos a forma clássica destas sigmas é improvável confundi-las com as “sigmas” da Ordem Spirophorida (que são na verdade sigmaspiras). Sigmas ocorrem dentro de outras ordens da Subclasse Ceractinomorpha (sensu LÉVI, 1955) e Axinellidae, mas nunca em Hadromerida (Subclasse Tetractinomorpha, sensu LÉVI, 1955), onde os tilóstilos, como megascleras preponderantes, são o caráter diagnóstico mais conspícuo. Ráfides dispostas em microdragmas, uma organização a qual requer uma morfogênese muito distinta, ocorrem nas ordens Poecilosclerida e Axinellida, mas não em

Hadromerida. A questão “onde classificar esponjas que possuem tilóstilos (com tilo bem formado) e sigmas ou, que possuem tilóstilos e tricodragmas”? é realmente difícil de responder, quando a decisão sistemática é tomada com uma ênfase excessiva em caracteres espiculares. Claramente dados bioquímicos e reprodutivos permitiriam a comparação de *Desmacella* com gêneros típicos da Ordem Hadromerida a fim de avaliar a posição ordinal deste gênero (BERGQUIST; FROMONT, 1988).

Num tópico posterior, questões como a de *Desmacella* serão abordadas segundo uma visão mais moderna, com base em novos dados e interpretações de seus caracteres. As figuras 2 e 3 resumem as propostas de afinidades filogenéticas das famílias da Ordem Poecilosclerida, respectivamente segundo van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1988). Estas últimas autoras afirmaram que a topologia que propuseram baseava-se em suas conveniências apenas.

A Família Desmacidonidae foi usada previamente para acomodar muitas espécies cuja afinidade era duvidosa. Para Bergquist e Fromont (1988) a Família era definida como possuindo esqueleto plumoreticulado, com completa ausência de diferenciação regional. As megascleras são em categoria única, exceto no gênero *Echinostylinos* Topsent, 1927, mas as espículas podem ser mono ou diactinais. Todos os gêneros na Família possuíam quelas, exceto *Chondropsis* Carter, 1886, onde o esqueleto espicular é reduzido em favor da incorporação de material exógeno e muitas espécies não possuíam quela.

Outras duas famílias, Família Coelosphaeridae e Cornulidae, possuíam, segundo Bergquist e Fromont (1988), categoria única de megascleras, mas o esqueleto apresentava diferenciação regional, freqüentemente possuindo megascleras menores ocorrendo no ectossoma.

Cornulidae foi estabelecida por Lévi e Lévi (1983) para esponjas anteriormente alocadas na Família Coelosphaeridae, com isoquelas palmadas como microscleras. Em ambas as famílias, as quelas estão presentes dentre as microscleras e todos os gêneros possuem fístulas como estruturas inalantes e exalantes. Segundo Bergquist e Fromont (1988), deve-se salientar que uma superfície fistulosa não deve ser considerada um discriminador primário, mas, sim a organização esquelética em conjunção com a ocorrência de fístulas e áreas especializadas de poros. As famílias são bem definidas segundo estas últimas autoras, desta forma não apenas “sugestivamente” (BERGQUIST; FROMONT, 1988) como definido por van Soest (1984). Não há relação, ou não necessariamente, com Tedaniidae, como insistiu

este último autor. Bergquist e Fromont (1988) possuíam uma visão distinta da apresentada por van Soest (1984), não apenas quanto à afinidade das famílias de Poecilosclerida (Figuras 2 e 3), mas, em menor grau, também quanto à definição das mesmas.

Tedaniidae é uma Família distinta dentro de Poecilosclerida, esta Família não possui quelas, ao invés disso, possui oniquetas como microscleras. Estas são finas, microspinadas, oxiformes e não são encontradas em nenhum outro grupo dentro da Classe Demospongiae. Tedaniidae adicionalmente possui duas categorias de megascleras diferenciadas quanto à forma, além de possuir diferenciação regional no esqueleto. Dentre as famílias de Poecilosclerida, Tedaniidae está mais relacionada a Hymedesmiidae e Phorbasidae, uma vez que todas as três famílias são caracterizadas por possuírem duas categorias de megascleras e ausência de espículas equinantes. Não obstante, os caracteres apresentados são considerados fracos e Tedaniidae fica isolada, não possuindo relação clara com as outras famílias dentro de Poecilosclerida (BERGQUIST; FROMONT, 1988).

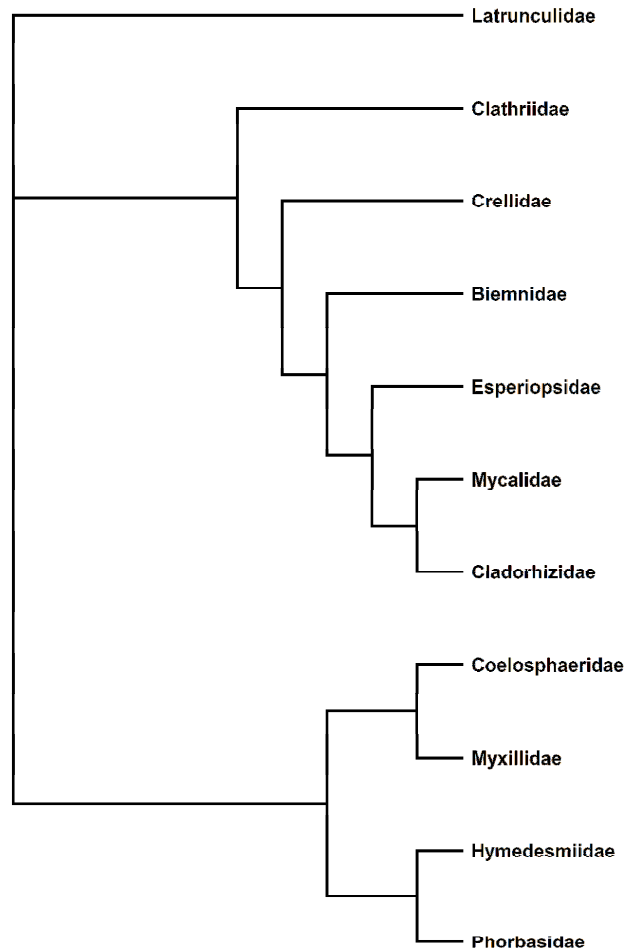


Figura 2 - Proposta filogenética para as Famílias de Poecilosclerida apresentada em van Soest (1984).

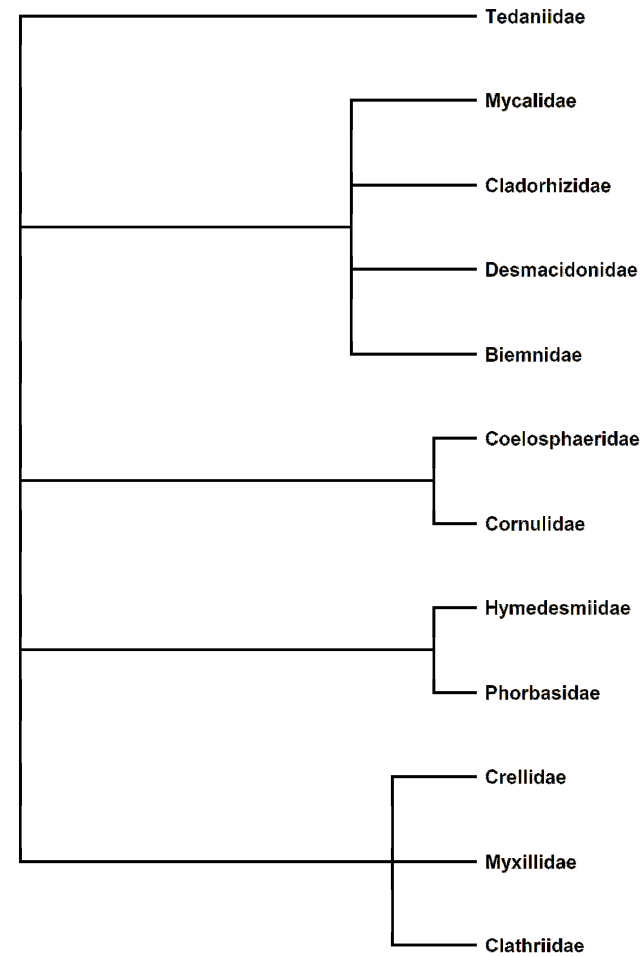


Figura 3 - Proposta filogenética para as Famílias de Poecilosclerida apresentada em Bergquist e Fromont (1988).

Hymedesmiidae e Phorbasidae são fortemente relacionadas. Ambas possuem megascleras diactinais no ectossoma, megascleras coanossomais monactinais, acantóstilos basais sendo freqüentemente encontrados eretos no substrato, e o elenco de microscleras inclui quelas. Ambas as famílias são adicionalmente caracterizadas por áreas porais areoladas na superfície e esqueleto plumoso (BERGQUIST; FROMONT, 1988).

Em Hymedesmiidae e Phorbasidae, segundo a classificação de Bergquist e Fromont (1988), aparece pela primeira vez uma espícula espinada verdadeira. É interessante como espículas espinadas são freqüentemente reportadas para Poecilosclerida, apesar desta característica estar ausente em sete das doze famílias reconhecidas por estas autoras. Apesar das semelhanças entre estas famílias, elas foram mantidas separadas porque Phorbasidae apresenta o desenvolvimento de um esqueleto com fibras anastomosadas, sinalizando um maior avanço no nível estrutural do esqueleto (BERGQUIST; FROMONT, 1988).

Crellidae tem um arranjo esquelético mais complexo que as famílias já discutidas e o esqueleto primário é plumoreticulado a reticulado. Existem três categorias de megascleras presentes e distribuídas entre os tratos primários do coanossoma, no ectossoma e como espículas equinantes ao longo dos tratos primários. Esta Família possui quelas no conjunto de microscleras tais como as duas famílias restantes, Myxillidae e Clathriidae, mas a Família Crellidae se distingue pela presença de espículas microespinada ectossomais. Um arranjo similar é, entretanto, encontrado em outro gênero "Ectyomyxilla" Hentschel, 1914 (Myxillidae; BERGQUIST; FROMONT, 1988).

Myxillidae era caracterizada por possuir uma reticulação coanossomal isodictial, pela presença de três categorias de megascleras, e pela diferenciação regional do esqueleto. Os gêneros desta Família possuem megascleras monactinais coanossomais e espículas monactinais equinantes. Myxillidae previamente incluía somente esponjas com megascleras ectossomais diactinais. Bergquist e Fromont (1988) transferiram "Allocia" Hallmann, 1920 e Antho Gray, 1867, geralmente associados a Clathriidae, devido à presença de isoquelas palmadas e espículas monactinais ectossomais, para Myxillidae e a diagnose da Família foi estendida para incluir megascleras monactinais ectossomais (BERGQUIST; FROMONT, 1988).

Myxillidae foi uma Família bem definida, com reticulação isodictial do esqueleto, até três categorias de megascleras incluindo espículas equinantes, e diferenciação regional no esqueleto das megascleras, constituindo uma combinação de caracteres não encontrados em qualquer outra Família (BERGQUIST; FROMONT, 1988).

Clathriidae foi caracterizada primariamente pela presença de um esqueleto plumoreticulado ou reticulado, geralmente com espículas equinantes e megascleras monactinais. As microscleras são também características, incluindo isoquelas palmadas e toxas, mas nunca sigmas. Estas microscleras são encontradas em outras famílias, mas em conjunção com o esqueleto “clatroíde” e o conjunto espicular, são diagnósticos para Clathriidae (BERGQUIST; FROMONT, 1988).

Apesar das críticas e diferenças, Bergquist e Fromont (op. cit.) concordam quanto ao delineamento proposto por van Soest (1984) para: (1) as famílias Hymedesmiidae e Phorbasidae como fortemente correlatas, e que Crellidae pode ser distinguida pela presença de espículas ectossomais microespinadas (acantosas); (2) o agrupamento de Mycalidae, Espereopsidae e Cladorhizidae, com base na ausência de uma categoria especial de megascleras ectossomais; e (3) Biemnidae como um grupo correlato às três últimas famílias citadas.

Entretanto, discordam quanto à sugestão adicional de van Soest (1984), de que as famílias Hamacanthidae e Biemnidae são distinguíveis unicamente pela presença de diancistras. Discordam também quanto à transferência do gênero *Tedania* Gray, 1867 para Myxillidae por van Soest (op. cit.). A tabela 3 sumariza a visão destes autores.

Finalmente, van Soest (1984) incorporou Latrunculidae como uma Poecilosclerida incertae sedis, mas Bergquist e Fromont (1988) preferiram mantê-la na Ordem Hadromerida. Atualmente, Latrunculidae é classificada em Poecilosclerida, o que será discutido mais adiante.

Tabela 3 - Diagnose para as famílias de Poecilosclerida segundo a visão de van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1988).

Táxon	van Soest (1984)	Bergquist e Fromont (1988)
		Poecilosclerida com esqueleto coanossomal formado por megascleras mono- e/ou diactinais, organizadas numa arquitetura plumosa ou plumoreticulada. O esqueleto "Tedaniopsis" Dendy, 1924 ectossomal consiste de como sinonímia de megascleras diactinais, as quais Hemitedania Hallmann, 1914 podem ser distinguidas das e junto com Tedania nos megascleras coanossomais pela gêneros de Myxillidae. forma ou tamanho. Microscleras Bergquist e Fromont (1988) são oniquetas, as quais são separam Tedaniopsis e longas, finas, oxeoformes e microespinadas.
Tedaniidae	Tedania em Tedaniidae.	
	Poecilosclerida com esqueleto coanossomal plumoso ou plumoreticulado de megascleras subtililóstilos ou oxeoformes e megascleras ectossomais, se presentes, da mesma forma que as encontradas no coanossoma. O elenco de microscleras é frequentemente diverso, mas sempre incluye anisoquelas	Poecilosclerida com esqueleto coanossoma plumoso ou plumoreticulado. Megascleras monactinais, frequentemente estilos ou subtilóstilos. Esqueleto ectossomal, se presente, é formado pelas mesmas espículas que compõem o coanossoma. O elenco de microscleras sempre inclui anisoquelas ou isoquelas podendo conter também tóxas, sigmas e ráfides.
Mycalidae		

		Poecilosclerida de mar profundo, com forte esqueleto silicoso bem desenvolvido do qual feixes radiais divergem a partir de um esqueleto radial ou axial de axial. As esponjas são pequenas megascleras monactinais, com corpo simétrico, espécies pequenas, frequentemente estiptado. As frequentemente estiptadas megascleras são monactinais e as microscleras são quelas e sigmas.
Cladorhizidae (LEVI, 1973)	Poecilosclerida com esqueleto coanossomal reticulado ou plumoreticulado formado por megascleras monactinais ou diactinais. Esqueleto ectossomático ausente (mas, uma "derme" orgânica ou de material exógeno, frequentemente bem desenvolvida pode estar presente). O elenco de microscleras incluem quelas palmadas, ancoradas ou isoquelas unguiferadas e, as vezes, sigmatas.	Poecilosclerida com esqueleto plumosos, plumoreticulado ou reticulado, frequentemente apresenta o desenvolvimento de fibras. Esqueleto ectossomático em leque. As megascleras são monactinais ou diactinais, frequentemente de um único tamanho, ocasionalmente as megascleras do ectossoma são de tamanhos diferentes. Microscleras abundantes e diversas, podem incluir isoquelas e sigmas típicas ou variantes destas.
Desmacionidae sensu Bergquist e Fromont (1988)		
Esperiopsidae sensu van Soest (1984)		

Biemnidae	<p>Poecilosclerida com esqueleto plumoso, plumoreticulado ou reticulado de monactinais ou diactinais</p>	<p>Poecilosclerida com organização lisas; sem megasclera esquelética irregular, plumosa ou ectossomal especial. O plumoreticulado. Megascleras elenco de microscleras pode monactinais, frequentemente de incluir sigmatas, rafidiformes, um tipo. Microscleras abundantes, sigmancistras e seus incluem sigmas, micróxeas, toxas, comas e microestilos.</p>
Coelosphaeridae	<p>Poecilosclerida com hábito fistuloso oco, ectossoma formado por uma crosta de megascleras diactinais; esqueleto coanossomal, se presente, consistindo das mesmas megascleras diactinais. O elenco de microscleras pode incluir isoquelas arcuadas e palmadas, anisoquelas palmadas, sigmatas, toxas e ráfides.</p>	<p>Poecilosclerida massiva ou incrustante, frequentemente esférica, sempre com tubo oscular especializado e fístulas porais. Esqueleto coanossomal e ectossomal claramente diferenciado. Ectossoma formado por uma densa camada de megascleras tangenciais facilmente destacável. A mesma megasclera, frequentemente diactinal, ocorre no coanossoma. Em alguns gêneros ocorrem megascleras em mais de um tipo e tamanho. A estrutura coanossomal tende a colapsar quando retirada da água, descrita como flácida. In vivo consiste de feixes frouxos com espículas espaçadas. As microscleras, se presentes, incluem isoquelas arcuadas, birrótulas, sigmas, micróxeas e toxas.</p>

Poecilosclerida de crescimento incrustante ou maciço ou incrustante com fístulas eretas. O esqueleto ectossomal resume-se a um córtex de espículas tangenciais, o coanossoma consiste de feixes de megascleras e espículas esparsas no interstício. As megascleras são monactinais ou diactinais, podem ser acantosas com mais de uma categoria de tamanho ou tipo. Microscleras são

Cornulidae	Segundo este autor a Família é sinonímia de Coelosphaeridae	isoquelas palmadas, ocasionalmente acompanhadas por tóxas.
------------	---	--

Hymedesmiidae	<p>Poecilosclerida com crescimento incrustante permanente. Megascleras coanossomal principais e acessórias são acantóstilos orientados verticalmente; eles estão inseridos em uma camada basal de esponjina que recobre o substrato. As espículas ectossomais são diactinais, orientadas verticalmente ou ocorrendo sem organização ao longo de toda a esponja. Eles são, frequentemente mais delgados que tornotos lisos ou anisotornotos, e coanossoma formado por acantóstilos eretos a partir do substrato (esqueleto himedesmioide); o elenco de microscleras incluem isoquelas arcuadas ou palmadas, as vezes anisoquelas e sigmatas.</p>	<p>Poecilosclerida com crescimento incrustante permanente. Megascleras coanossomal principais e acessórias são acantóstilos orientados verticalmente; eles estão inseridos em uma camada basal de esponjina que recobre o substrato. As espículas ectossomais são diactinais, orientadas verticalmente ou ocorrendo sem organização ao longo de toda a esponja. Eles são, frequentemente mais delgados que tornotos lisos ou anisotornotos, e coanossoma formado por acantóstilos eretos a partir do substrato especializadas. O elenco de microscleras inclui isoquelas arcuadas ou unguiferadas, sigmas, e outras formas incomuns que servem para caracterizar os gêneros.</p>
---------------	---	--

Poecilosclerida com megascleras ectossomais diactinais e esqueleto coanossomal organizado numa arquitetura plumosa ou plumoreticulada. A região basal justapostas aos feixes possui acantóstilos ou, ocasionalmente, estilos. Em alguns gêneros o esqueleto ectossomal é

Poecilosclerida com diferenciado e espículas diactinais ectossoma formado por estão presentes nos feixes feixes de acantóstilos coanossomais. As microscleras equinados por acantóstilos, são isoquelas e sigmas. Possuem ectossoma formado por áreas porais areoladas feixes de tornotos; isoquelas especializadas na superfície e as arcuadas e sigmatas como espículas ectossomais formam microscleras. uma paliçada ao redor.

Phorbasidae

	<p>Poecilosclerida com esqueleto ectossomal densamente compactado de acantóxeas ou acantóstilos, onde equinam acantóstilos. O esqueleto coanossomal de diactíνας lisas agrupadas em feixes frouxos, as vezes com acantóstilos basais eretos a partir do substrato. O elenco de microscleras, se presente, inclui quelas arcuadas e sigmatas.</p>	<p>Poecilosclerida com esqueleto principal de diactinas, ou ocasionalmente, de megascleras monactinais, organizadas numa arquitetura plumosa ou plumoreticulada, com fibras de acantóstilos. O esqueleto cortical é formado por diactíνας lisas agrupadas em uma densa camada de espículas acantósas, monactinais ou diactinais. Em muitos gêneros os acantóstilos basais são dispostos verticalmente no substrato. As microscleras são, se presentes, isoquelas arcuadas e sigmas</p>
<p>Crellidae</p>		

Poecilosclerida com reticulação regular, geralmente isodictial, compostas de megascleras com monactinais, as quais são estilos e esqueleto coanossomal acantóstilos, para os quais plumoreticulado de acantóstilos equinantes podem ser monactinas lisas ou acrescentados. O córtex é acantosas (raramente composto por megascleras oxiformes ou monactinais ou diactinais. As (strongiliformes). O elenco de microscleras características são microscleras incluye isoquelas quelas, as quais podem ser (ambas ancoradas e arcuadas, ancoradas, arcuadas), sigmatas, unguiferadas, birrotulas, isoquelas forcepes e palmadas ou anisoquelas. Estas oniquetas. Espongina mal podem ser acompanhadas de desenvolvida. sigmas, bipocila ou toxas.

Myxillinae

		Poecilosclerida com esqueleto plumoso, plumoreticulado ou reticulado. As megascleras são monactinais, estilos e acantóstilos. Estes são organizados em feixes e incluem quantidades variadas de
	Poecilosclerida com ectossoma formado por subtilóstilos lisos (podendo ser terminalmente microespinados), estilos coanossomais lisos ou acantósos, frequentemente curtos, acantóstilos equinantes (podendo ser perdidos); microscleras incluem isoquetas palmadas, toxas e ráfides toxiformes	espongina que suportam espículas equinantes. Um gênero, "Plocamia" Schmidt, 1870, possui espículas monactinais e diactinais no esqueleto coanossômico. O ectossoma possui diferentes graus de desenvolvimento e consiste de espículas monactinais orientadas em leques verticais. As microscleras são isoquetas palmadas e toxas, as quais podem ocorrer separadas ou juntas.
Clathriidae		
	Poecilosclerida com discorrábidos (incluindo sanidasteres verticiladas) sobre um esqueleto halicondroide de megascleras monactinais ou diactinais.	Estas autoras consideram esta Família melhor alocada em Hadromerida
Latrunculidae		

Van Soest (1984) considerou a ocorrência de megascleras acantosas nas ordens Poecilosclerida, Axinellidae, e na Classe Sclerospongia (hoje inválida); notou a presença de microscleras acantosas nas ordens Hadromerida e Choristida (hoje Astrophorida), mas nunca a ocorrência de megascleras acantosas nestas últimas. Este autor sugeriu que isso poderia apontar para a ancestralidade das megascleras acantosas como sendo as microscleras (VAN SOEST, 1984). Em oposição, Bergquist e Fromont (1988) examinaram vários tipos de megascleras acantosas concluindo que muitos tipos estruturais distintos ocorrem dentro de uma mesma

Ordem. Por exemplo, em Crella Gray, 1867, os acantóstilos equinantes com espinhos bem formados e estilos bem distintos com bases discretamente espinadas, são distintos de megascleras com base mucronada microespinada. É difícil sustentar a visão de que estes tipos de espículas sejam homólogos, e é ainda mais difícil quando eles são comparados aos espinhos verticilados presentes nas espículas acantosas de *Zyzya* de Laubenfels, 1936 e *Agelas* Duchassaing & Michelotti, 1864, cujos espinhos são rigorosamente organizados em verticilos.

Podemos resumir o status de Poecilosclerida, até o começo dos anos 1990, como indefinido, visto que Lévi (1973), van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1988), autores importantes, todos com argumentações plausíveis, defendiam pontos de vista diferentes.

1.3. O sistema de Subordens para Poecilosclerida

Um novo sistema surgiu em meados da década de 1990, embasado nos princípios filogenéticos, propondo uma ampla revisão dos gêneros de Poecilosclerida, com especial atenção à micromorfologia, e uma discussão meticulosa da significância filogenética dos caracteres.

Uma das características mais marcantes na Ordem Poecilosclerida é a posse de quelas e sigmas como microscleras, associada ao esqueleto plumoso/plumoreticulado, como foi salientado por quase todos os autores aqui citados (e. g. RIDLEY; DENDY, 1887; TOPSENT, 1928; LÉVI, 1956; VAN SOEST, 1984; BERGQUIST, 1978, 1980; BERGQUIST; FROMONT, 1988). Contudo, um gênero em particular, *Isodictya* Bowerbank, 1864, além de possuir quelas, possui óxeas peculiares em forma de charuto e esqueleto com reticulação isodictial, ambas importantes características que o alocariam na Ordem Haplosclerida. Esta questão específica é importante para a estruturação basal da Ordem Poecilosclerida e assunto de discordância na literatura.

Van Soest (1987) explorou as relações entre as famílias de Poecilosclerida e Haplosclerida. Em 1977, Wiendenmayer considerou os esqueletos multiespiculares com pouca espongina de *Petrosia* Vosmaer, 1885 e *Xestospongia* de Laubenfels, 1932, como um caráter ancestral, por sua semelhança ao esqueleto fóssil de *Nepheliospongiidae*. Van Soest (1987), contrariando esta interpretação, considera a forma ancestral a do esqueleto com reticulação isodictial, tratos secundários

embainhados em espongina e com presença de microscleras sigmóides e toxiformes. Desta reinterpretação dos caracteres, resultou uma nova proposta de relação filogenética entre Haplosclerida e Poecilosclerida, onde a última seria parafilética em relação à primeira, ou, alternativamente, deveria incluí-la em seu escopo (Figura 4; VAN SOEST, 1987).

Como explicitado no tópico anterior, duas grandes revisões de Poecilosclerida, van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1988), apesar de modificarem sensivelmente a Família Desmacididae, onde *Isodictya* estava incluída, mantiveram seu status como válida. Esta decisão gerou algumas constatações lógicas. Autores como Lévi (1973), Bergquist (1978), van Soest (1980) e Hartman (1982) terminam por aceitar, implicitamente, o surgimento homoplástico do esqueleto isodictial, uma vez que está posto como uma das características que definem a Ordem Haplosclerida, bem como o surgimento de suas óxeas peculiares (forma de charuto). As quelas foram sempre consideradas como caráter sinapomórfico da Ordem Poecilosclerida.

Hajdu et al. (1994a) apresentaram uma visão diferente, uma vez que estes autores, reconhecendo o esqueleto isodictial como díspar de qualquer outro encontrado em Poecilosclerida, concluíram ser uma decisão ilógica manter o referido gênero na Ordem Poecilosclerida. Hajdu et al. (op. cit.) transferiram *Isodictya* para Haplosclerida, como uma provável Niphatidae, e passaram a considerar as quelas do morfotipo palmada (bem como as sigmas e as toxas), como uma arqueomorfia de Haplosclerida e Poecilosclerida; mantendo o esqueleto isodictial e as óxeas charutiformes como sinapomorfias de Haplosclerida. Estes autores ainda discutem que a presença de *Isodictya* tanto em uma quanto na outra Ordem são igualmente parcimoniosas e desta forma, tendo em vista os princípios defendidos por Pinna (1991), tal decisão nestes casos cabe ao taxonomista (HAJDU et al., 1994a).

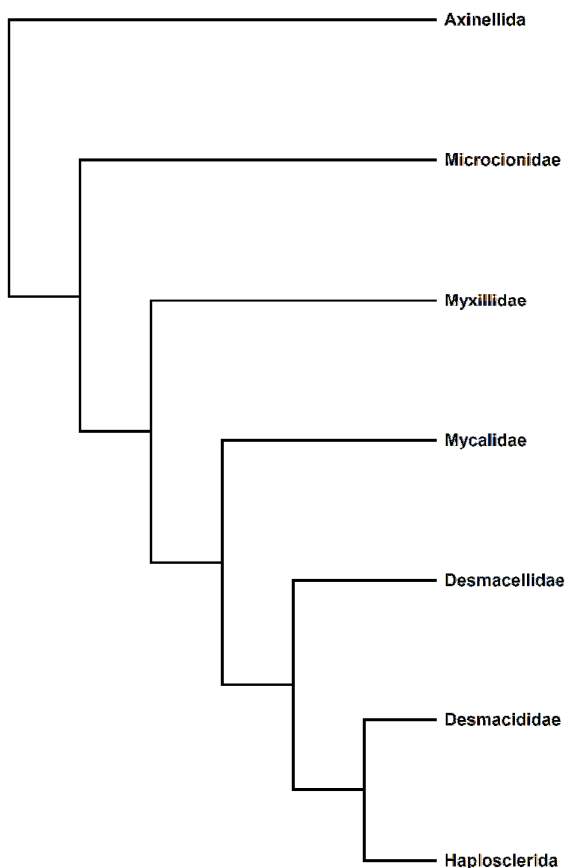


Figura 4 - Hipótese filogenética das relações entre a Ordem Haplosclerida e as famílias da Ordem Poecilosclerida, segundo van Soest (1987).

No entanto, estas hipóteses (a inclusão de *Isodictya* em Poecilosclerida ou Haplosclerida) podem ser contestadas, uma vez que de um lado temos um caráter, quelas palmadas, e do outro, temos dois caracteres: esqueleto isodictial e óxeas peculiares (forma de charuto). Mesmo que déssemos a estes dois últimos caracteres a mesma interpretação, uma arqueomorfia de Haplosclerida-Poecilosclerida (caso *Isodictya* fosse mantida em Poecilosclerida) teríamos que assumir a perda secundária de dois caracteres em Poecilosclerida, contra assumir uma única perda secundária, das quelas, em Haplosclerida. A figura 5 sumariza o status dos caracteres segundo as suposições discutidas.

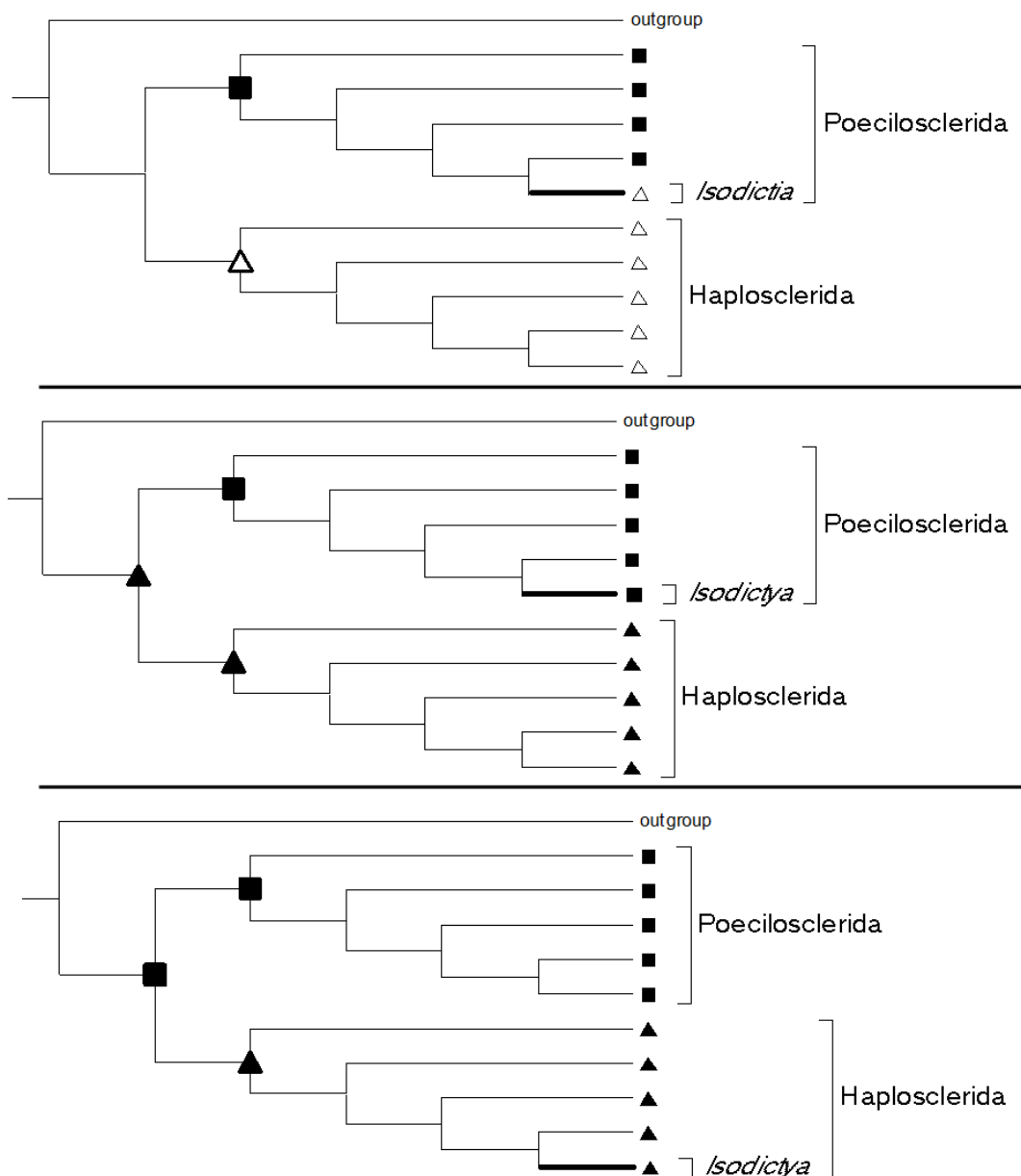


Figura 5 - Cladogramas explicitando as diferentes visões a cerca do status sinapomórfico dos caracteres nas relações entre as ordens Haplosclerida e Poecilosclerida como resultado da posição de Isodictya. Onde: (■) presença de quella como carácter sinapomórfico, (▲) reticulação isodictial mais óxeas charutiformes como carácter sinapomórfico, (△) reticulação isodictial mais óxeas charutiformes como carácter simplesiomórfico. Modificado de Hajdu et al. (1994a).

Samaai et al. (1999) consideraram o debate sobre a posição de *Isodictya* inconclusivo e a posição como estabelecida por Hajdu et al. (1994a), com inconsistências. Desta forma implementaram uma análise filogenética com as seguintes espécies: (1) *Isodictya palmata* (Ellis & Solander, 1786); (2) *I. multiformis* (Stephens, 1915); (3) *Isodictya* sp.; (4) *I. lankesteri* (Kirkpatrick, 1907) (como *Cercidochela lankesteri*); (5) *Niphates digitalis* (Lamarck, 1814); (6) *Niphates* sp.; (7) *Amphimedon compressa* Duchassaing & Michelotti, 1864; (8) *Amphimedon* sp.; (9) *Cribrochalina* sp. (as espécies de 1-9 são da Ordem Haplosclerida, Família Niphatidae); e (10) *Amphilectus informis* (Stephens, 1915) (como *Esperiopsis informis*) (Ordem Poecilosclerida, Família Esperiopsidae). Sendo, assim, nove espécies de Haplosclerida, uma de Poecilosclerida e como grupo externo, *Halichondria moorei* Bergquist, 1961. Foram utilizados 12 caracteres, dos quais dez morfológicos, abrangendo estrutura esquelética, desenvolvimento de fibras, de ectossoma, megascleras e microscleras, todos eles multiestado não ordenados; um caráter bioquímico e um reprodutivo.

Algumas questões são extremamente importantes ressaltar aqui, pois darão origem a conclusões futuras. Uma reside no fato deste trabalho ter sido implementado segundo uma análise filogenética formal, uma segunda questão refere-se a *Cercidochela* Kirkpatrick, 1907 (aceita como *Isodictya*) ser, na ocasião, um gênero válido para a Ordem Poecilosclerida. Hoje, *Cercidochela* é aceito como uma *Isodictya*, desta forma é de se esperar que ele tenda a se agrupar com as demais. A terceira questão trata do uso de caracteres bioquímicos de universalidade ainda não completamente elucidada. Estudos restritos de um táxon podem revelar metabólitos secundários compartilhados, porém isso não exclui a possibilidade da existência deste metabólito em táxons distantes não analisados, o que poderia indicar a simplesiomorfia destes.

Este é o caso da manzamina, utilizada por Samaai et al. (1999) como indicativo de afinidade entre os táxons de Haplosclerida. Mas, esta substância já foi isolada de diversos outros táxons de esponjas, como: *Haliclona* sp. (SAKAI et al., 1986 [Haplosclerida]), *Halichondria* Fleming, 1828 e *Oceanapia* (NAKAMURA et al., 1987, como *Pellina* sp. [Halichondrida/Haplosclerida]), *Pachypellina* Burton, 1934 (ICHIBA et al., 1994 [Haplosclerida]), *Xestospongia* (EDRADA et al., 1996, ICHIBA et al., 1988 [Haplosclerida]), *Ircinia* Nardo, 1833 (KONDO et al., 1992 [Dictyoceratida]) e

Amphimedon Duchassaing & Michelotti, 1864 (KOBAYASHI et al., 1994 [Haplosclerida]).

A figura 6 sumariza a hipótese de Samaai et al. (1999), o cladograma apresentado é resultado do consenso estrito entre 21 árvores igualmente parcimoniosas. Segundo os resultados apresentados, todas as *Isodictya* agruparam com *Poecilosclerida*, e as *Niphatidae* formaram um clado à parte. Estes autores discutem que o esqueleto de *Isodictya* não é isodictial strictu sensu como em *Haliclona*, propondo a transferência de *Isodictya* para *Poecilosclerida*.

Na última revisão do grupo, Hajdu e Lôbo-Hajdu (2002) seguiram a sugestão de Samaai et al. (1999), uma vez que estes implementaram uma análise filogenética formal. Entretanto, Hajdu e Lôbo-Hajdu (2002) assinalaram a necessidade de que novos estudos fossem realizados, tendo em vista que a relação de *Isodictya* com *Mycale* Gray, 1867 e *Esperiopsis* permanecia pouco consistente. Ademais estes autores não trataram em detalhe da questão relativa à presença de quelas.

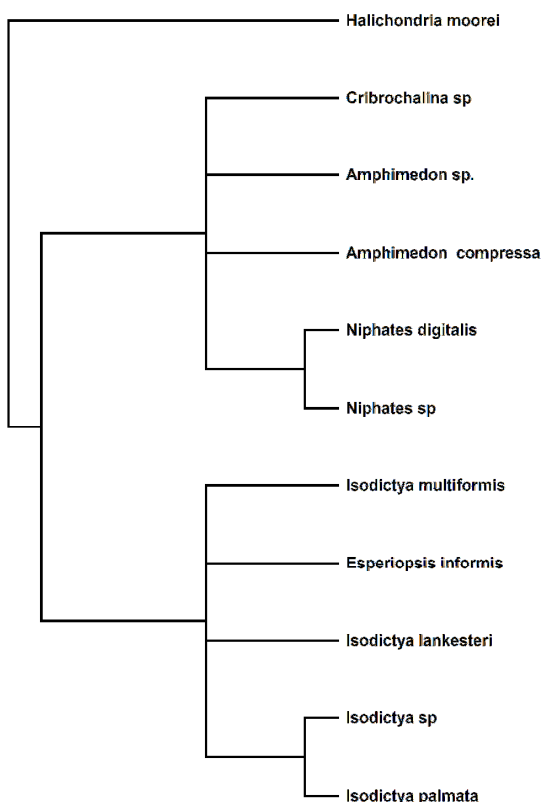


Figura 6 - Hipótese filogenética das relações entre as ordens Haplosclerida e Poecilosclerida segundo Samaai et al. (1999), justificando a alocação do gênero *Isodictya* na Ordem Poecilosclerida. Modificada de Samaai et al. (1999).

A partir daí modificações substanciais começaram a emergir. Hajdu et al. (1994b) assinalaram o valor sinapomórfico dos morfotipos de quelas compartilhados e com base nisso, transferiram *Desmacidon* Bowerbank, 1861 e *Desmapsama* Burton, 1934 de Desmacididae para Myxillidae, enfatizando o valor das quelas com morfotipo ancorado. Estes dois gêneros, segundo estes autores, poderiam ser facilmente alocados em Myxillidae, que substituiu as megascleras coanossomais por ectossomais, um modelo comum nos grupos que possuem quelas tridentadas (por exemplo, *Crella* e *Phorbas* Duchassaing & Michelotti, 1864).

Alguns gêneros da então Família Desmacididae possuíam quelas palmadas, um carácter interpretado como primitivo por van Soest (1984) e posteriormente reafirmado por Hajdu et al. (1994b), o que impede, portanto, sua utilização como evidência de relações próximas.

Ainda com relação à Família Desmacididae, os gêneros, *Guitarra* Carter, 1874 e *Euchellypluma* Topsent, 1909, foram considerados pertencentes ao mesmo grupo com base em suas placoquelas (quelas com denticulação complexa). A ocorrência de sigmancistras em *Euchellypluma*, a ausência tanto de toxas quanto de tricodragmas em todos os táxons que possuem placoquela e taxons que possuem microscleras derivadas de placoquela, foram considerados evidências de suas afinidades com *Cladorhiza* Sars, 1872 (HAJDU, 1994).

Ao contrário dos seus antecessores, Hajdu et al. (1994b) buscaram incorporar como procedimento de rotina o estudo da micromorfologia por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV ou SEM, do inglês Scan Electron Microscopy). Desta forma, propuseram um sistema de subordens derivado da interpretação filogenética de um espectro mais amplo de caracteres. Embora estes autores tenham salientado que esta classificação é uma hipótese e que alguns grupos no nível de gêneros e famílias não tenham sido completamente resolvidos.

A Família Desmacididae incluía o gênero *Isodictya* representa, até hoje, papel importante na constituição do que entendemos hoje como Ordem Poecilosclerida. Essa Família vinha frequentemente sendo defendida como um grupo muito maior, que foi posteriormente dividido por diferentes autores, ao longo dos anos. Schmidt (1870) considerou Desmacididae uma subFamília que somada a outros gêneros assemelhava-se ao que se reconhece hoje como Ordem Poecilosclerida. Gray (1872) atribuiu a ela um conceito relativamente conciso, excluindo alguns gêneros, que mais tarde foram reconhecidos como famílias separadas. Segundo Vosmaer

(1887), em Desmacididae estão incluídas esponjas marinhas com megascleras monaxônicas e microscleras sigmatosas, mas sem magascleras equinantes. Este ponto de vista foi adaptado por Ridley e Dendy (1887), que salientaram o valor sinapomórfico das quelas e, dessa forma, aceitaram apenas algumas espécies sem estas microscleras no grupo, nas quais postularam que essas microscleras teriam sido perdidas. Dendy (1905), consciente da origem mais provável das quelas a partir das sigmas, expandiu a antiga definição de Ridley e Dendy (1887) para incluir em Desmacididae esponjas sem quelas, mas com sigmas (HAJDU et al., 1994b).

Hentschel (1923) foi o primeiro autor a reconhecer em Desmacididae muitas potenciais famílias alocáveis em duas subordens, Protorhabdina e Poikilorhabdina. Topsent (1928) enfatizou a presença de apenas uma categoria de megascleras e, conseqüentemente, ausência de megascleras ectosomais especiais. De Laubenfels (1936), com uma interpretação mais radical, desconsiderou qualquer eventual valor sinapomórfico das quelas e transferiu Desmacidon para Haplosclerida com base em seu esqueleto reticulado constituído de óxeas.

Posteriormente, Levi (1973) e Hartman (1982) consideraram a Família polifilética, necessitando ser subdividida em decorrência da heterogeneidade dos gêneros inclusos. Por exemplo, van Soest (1984) reconheceu a existência de esqueletos reticulados isodictial contrastando com outros contendo tratos plumosos a plumo-reticulados. Bergquist e Fromont (1988) reconheceram uma suposta distinção básica entre gêneros com megascleras monactinais e outros com diactinais. Dentro desta miscelânea de formas e conceitos, Hajdu et al. (1994b) destacaram que a característica mais marcante do conceito tradicional de Desmacididae era a inclusão de praticamente qualquer tipo de microsclera em seus grupamentos (por exemplo: quela ancorada para Desmacidon, Desmapsamma e Monanchora Carter, 1883; quela arcuada para Echinostylinos; quela palmada para Esperioopsis, Isodictya, Euchelipluma e Cercidochela; placoquela ou derivações para Guitarra, Hoplakithara Kirkpatrick, 1907 (aceita como Guitarra), Euchelipluma e Tetrapocillon Brøndsted, 1924; e birrótula para Iotrochota Ridley, 1884 e Iotroata de Laubenfels, 1936). Em outros termos, a existência de Desmacididae como aceita até então tinha um efeito desestruturador sobre a classificação de Poecilosclerida por servir de exemplo para o não reconhecimento do valor sinapomórfico de diversas microscleras.

Para tentar resolver esse problema Wiedenmayer (1989) propôs duas subfamílias: 1) Desmacidinae, com Desmacidon como gênero tipo e outras esponjas relacionadas (sensu LÉVI, 1973; BERQUIST, 1978) e 2) Stylotellinae, para um grupo de esponjas com um esqueleto espicular muito reduzido reforçado pela captação de abundantes detritos.

Um passo adicional na resolução do problema foi dado por Hooper e Levi (1989), que sugeriram a ressurreição de Esperipsidae como originalmente definida, ou seja, sem Desmacidon, que continuaria em Desmacididae, discordando de Bergquist e Fromont (1988), que haviam alocado Esperiposis em Mycalidae. Assim, Esperipsidae foi definida como incluindo esponjas com megascleras monactinais e componentes axiais e extra-axiais bem definidos no esqueleto.

Em resumo, Hajdu et al. (1994b) concluíram que as idéias de Laubenfels (1936), Lévi (1973), Hartman (1982), Van Soest (1984, 1990), Bergquist e Fromont (1988) e Maldonado e Benito (1991) eram congruentes em apontar o polifiletismo de Desmacididae.

A revisão da distribuição de caracteres morfológicos em cerca de 300 gêneros nominais de Poecilosclerida empreendida por Hajdu et al. (1994b) atentou em particular para aspectos micromorfológicos e caracteres de maior complexidade estrutural. Esse feito possibilitou uma ampla reinterpretação de afinidades em Poecilosclerida, e o desmembramento de Desmacididae entre quatro famílias, ficando seu conteúdo restrito a dois gêneros.

Poecilosclerida foi então dividida em três subordens: Microcionina, Myxillina e Mycalina (HAJDU et al., 1994b). Posteriormente, Kelly e Samaai (2002) adicionaram a quarta Subordem, Latrunculina, como Poecilosclerida incertae sedis.

A Subordem Microcionina foi definida, então, como uma Poecilosclerida com: quelas palmadas; toxas bastante diversificadas; megascleras ectossomais terminalmente microespinadas e mais freqüentemente monactinais; até cinco categorias de megascleras; além disso, jamais apresentando sigmas lisas. Inclui as famílias Microcionidae, Raspaillidae, Rhabderemiidae e Iophonidae.

A Subordem Myxillina inclui as Poecilosclerida caracterizadas por possuir derivados de quelas tridentadas, com megascleras ectossomais basicamente diactinais (embora terminações aniso sejam amplamente distribuídas), e rara espinhação terminal de megascleras ectossomais (quando presente é geralmente

grosseira ou irregular); ademais toxas nunca são encontradas. Abrange as famílias Myxillidae, Coelosphaeridae, Crellidae, Hymedesmiidae, Anchinoidea e Tedaniidae.

A Subordem Mycalina inclui as Poecilosclerida caracterizadas por conter sigmancistra e seus derivados, (sub)(tilo)estilos com pescoço ligeiramente constricto e / ou com a base apenas ligeiramente alargada (denominados “micaloestilo”); megascleras quase sempre em uma única categoria lisa e nunca com tratos esqueléticos equinados. Comporta as famílias Mycalidae, Hamacanthidae, Desmacellidae, Cladorhizidae e Guitarridae.

A Subordem Latrunculina foi definida como compreendendo Poecilosclerida incertae sedis com acantodiscorrábidos formando um esqueleto ectossomal, sem quelas ou sigmas; e com apenas uma Família, Latrunculiidae.

A proposta de Hajdu et al. (1994b) decorreu da negação das idéias de Topsent (1896), que considerava as quelas pouco informativas, mas da visão de Levinsen (1983) e Lundbeck (1905, 1910), que argumentaram que as quelas teriam alto valor diagnóstico e, filogenético. Existem três formas básicas de quelas: palmada, arcuada e ancorada (Figura 7).

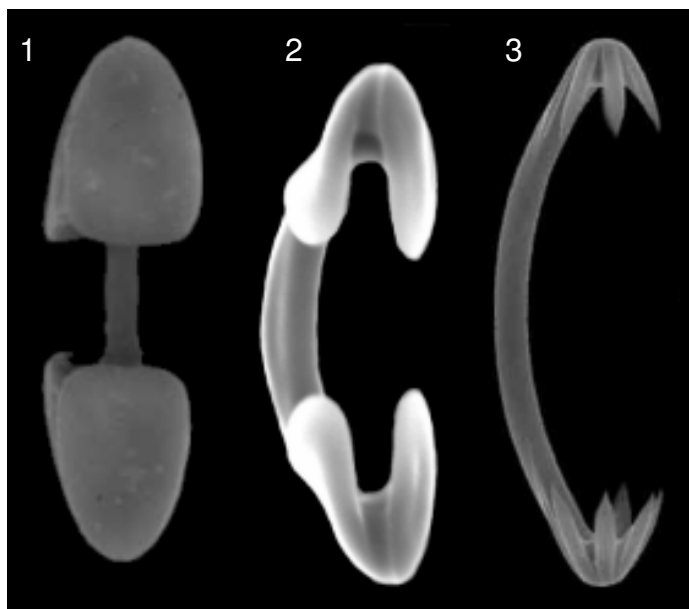


Figura 7 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) exemplificando três morfotipos de quelas: (1) palmada (extraído de LOPES; HAJDU, 2004), (2) arcuada (extraído de VAN SOEST, 2011) e (3) ancorada (extraído de VACELET et al., 2009).

As quelas palmadas têm em cada uma de suas extremidades uma ala frontal de largura variada e duas alas laterais amplamente fusionadas com o eixo da microsclera. Se abstrairmos um triângulo a partir de uma ala lateral (imaginando a quela de perfil), é a hipotenusa que é adjacente ao eixo em uma quela palmada (Figura 7.1).

As quelas arcuadas possuem uma ala lateral completamente formada, que na maioria dos casos está amplamente separada do eixo (são semelhantes a dentes). Assim, no triângulo imaginário (com a quela em perfil) é agora um dos catetos que é adjacente ao eixo (Figura 7.2).

No morfotipo ancorado, pelo menos três alas estão completamente formadas, uma frontal e duas laterais, e outras duas laterais estão amplamente fusionadas com o eixo (fímbrias; Figura 7.3). Muito freqüentemente as alas laterais incipientes de ambas as terminações se fusionam na parte central do eixo.

Lundbeck (1910) afirmou que considerou quelas ancoradas e arcuadas como espículas bem relacionadas derivadas de uma espícula original comum (ancestral), sugerindo, implicitamente, que o morfotipo palmado seria o primitivo. Este ponto de vista é partilhado por Dendy (1921), van Soest (1984) e Hajdu et al. (1994b). Ainda segundo Hajdu et al. (1994b), os casos intermediários, ou muito derivados, podem ser identificados segundo a congruência com outros caracteres que estão normalmente associados aos morfotipos básicos.

Deve-se atentar ao fato de que a maioria das quelas arcuadas são arqueadas, o que ajuda no seu reconhecimento, mas não deve ser tomado como diagnóstico, porque ambas ancoradas e palmadas também podem ser arqueadas.

Quelas unguiferadas são consideradas como possíveis reduções a partir de qualquer um dos morfotipos e sua origem deve ser retraçada com base em caracteres adicionais. Em alguns casos, porém, a quela ainda pode fornecer dados suficientes para inferir sua melhor alocação. Por exemplo, o eixo-fimbriado nas quelas unguiferadas de *Monanchora alaskensis* (Lambe, 1895) indica uma origem ancorada, e as menores terminações palmadas nas quelas unguiferadas de *Mycale* (*Grapelia*) *ancorina* (Whitelegge, 1906) é indicativa de origem palmada (HAJDU et al., 1994b).

Um termo que é muito freqüentemente utilizado na literatura é "quela tridentada". Foi introduzido por Bowerbank (1864), e seguido por Ridley e Dendy (1887) e alguns autores recentes (VAN SOEST, 1984). Segundo Hajdu et al.

(1994b), representa a sinapomorfia de um grupo compostos por quelas arcuadas e ancoradas, mas que não tem precisão descritiva e deve ser evitada na literatura taxonômica moderna.

Hajdu et al. (1994b), com base na interpretação dada acima, a polarização do caráter, quela, seria postulada como a série de transformações mais lógica: palmada -> arcuada -> ancorada. Foi recentemente reconhecido que o morfotipo palmado, pela sua ampla ocorrência, é provavelmente a condição mais primitiva na linhagem evolutiva das quelas (VAN SOEST, 1984); em oposição à sugestão de Topsent (1928) da ancestralidade birrotulada para todas as quelas (trataremos das birrótulas em parágrafos posteriores). Se este for o caso, e as quelas palmadas forem, realmente, primitivas (sinapomorfia em um nível mais geral), deve-se reconhecer também o valor sinapomorfico dos estágios arcuados e ancorados na série de transformações observada em Poecilosclerida. Assim, a presença das quelas palmadas deve ser tratada como uma simplesiomorfia quando se discute relações genéricas ou familiares, visão defendida por Hajdu et al. (1994b); e parte do racional para defender a inclusão de *Isodictya* em Haplosclerida, como já foi exaustivamente discutido.

Segundo a série de transformação postulada acima por Hajdu et al. (1994b), pode-se inferir que a ocorrência de gêneros que possuem quelas tridentadas têm uma baixa probabilidade de ser natural, porque implica numa inversão da série de transformação do caráter postulado. Assim, a presença de gêneros com quelas palmadas em um agrupamento que é caracterizado pela ampla ocorrência de quelas ancoradas é ainda mais improvável, uma vez que implica em uma reversão de caráter em dois passos. Parece lógico, então, que o conceito atualmente empregado de Família, como: Myxillidae, Desmacididae, Coelosphaeridae, Crellidae, Anchinoidea e Hymedesmiidae, não seja parcimonioso, porque todos os três morfotipos de quelas são aceitos como ocorrendo na maioria das famílias, implicando em múltiplas origens (homoplástico) (HAJDU et al., 1994b).

Sobre as quelas arcuadas, Hajdu et al. (1994b), seguindo o paradigma “hennigiano” de que um grupo monofilético deve incluir um ancestral e todos os seus descendentes, argumentaram que as quelas ancoradas têm mais probabilidade de serem originadas de quelas arcuadas e, como tal, não pode haver um grupo monofilético exclusivamente com quelas arcuadas, se as quelas ancoradas são deixadas de fora. Em outras palavras, o morfotipo arcuado não é em si um caráter

de valor sinapomórfico, preferencialmente, é o grupamento tridentado que deve ser considerado como um todo.

Já o morfotipo ancorado foi anteriormente interpretado como um caso de paralelismo, por van Soest (1984). Segundo Hajdu et al. (1994b) as quelas ancoradas foram aceitas em Myxillidae (por exemplo, *Myxilla* Schmidt, 1862, *Ectomyxilla* Hentschel, 1914), Desmacididae (*Desmacidon*, *Desmapsamrna*, *Monanchora*), Hymedesmiidae (*Hymenanchora* Lundbeck, 1910), Cladorhizidae (*Cladorhiza*, *Chondrocladia* Thomson, 1873) e Microcionidae (*Cionanchora* - sinonímia de *Discorhabdella* Dendy, 1924, atualmente classificada em Crambeidae). No entanto, existem poucas espículas tão elaboradas como as quelas e não pode ser descartada a possibilidade de que mesmo pequenas mudanças na sua forma poderiam ser regidas por um conjunto complexo de características genômicas. Para reforçar esta idéia Hajdu et al. (1994b) argumentaram que não importa qual variável seja, se tamanho e forma, há apenas três espécies em toda a Ordem Poecilosclerida que possuem dois morfotipos de quelas e todos eles precisam ser revistos (como de fato foram revistos e alguns modificados): *Damiriopsis brondstedii* Burton, 1928 Burton 1928, *Labisophlita forcipula* (Lundbeck, 1905) aceita hoje como *Forcepia* (*Forcepia*) *forcipula* (Lundbeck, 1905) e *Clathria* (*Microciona*) *novaezealandiae* (Brøndsted, 1924). Se a estabilidade dos morfotipos é assim tão marcante em cada espécie, por que razão uma mudança de morfotipos é tão facilmente alcançada em níveis mais elevados nos diferentes clados? A esta pergunta os próprios autores formularam uma resposta baseada no princípio “hennigiano” de parcimônia, ou seja, considerando a minimização de múltiplas origens independentes. Segundo esta premissa, as quelas ancoradas tiveram apenas dois surgimentos paralelos: um no ancestral das Myxillina e o outro na história das Cladorhizidae. Sugere-se que as quelas ancoradas de Myxillina possam ter evoluído de um ancestral com quelas tridentadas/arcuadas (amplamente difundidas nas famílias relacionadas: Coelosphaeridae, Crellidae, Anchinoidae, Hymedesmiidae), enquanto que nas Cladorhizidae provavelmente evoluiu de quelas palmadas. Isto é indicado pela ocorrência de quelas palmadas em *Asbestopluma* Topsent, 1901, que é uma inegável Cladorhizidae [presença de sigmancistras, 'micro'(sub)(tilo)estilos microespinados em sua superfície, hábito estipitado, e a ausência de espécies em águas rasas]. Além disso, as famílias relacionadas a Cladorhizidae, viz. Mycalidae e Guitarridae, também possuem quelas palmadas (HAJDU et al., 1994b).

Foi seguindo este raciocínio complexo, porém plausível, que em face da inexistência de uma explicação melhor embasada, ou seja, em um raciocínio mais parcimonioso, que estes autores transferiram *Desmacidon* e *Desmapsamma* para próximo de *Myxilla*, adicionalmente interpretando como havendo uma substituição das megascleras coanossomais por megascleras ectossomais (HAJDU et al., 1994b). As afinidades evolutivas das birrótulas já suscitaram considerável debate na literatura especializada. Topsent (1928) e van Soest (1987) consideraram-nas como caráter primitivo, oposto ao proposto por Dendy (1905). Segundo de Laubenfels (1936), o caráter estaria amplamente distribuído em diversas famílias. Hajdu et al. (1994b) aplicando sua linha de raciocínio palmada→arcuada→ancorada, concluíram que há um crescente número de dentes nas quelas. Nesse esquema, as birrótulas poderiam ter se originado a partir de quelas ancoradas pelo incremento de dentes, que eventualmente teria preenchido todo o perímetro de seu eixo (DENDY, 1921). De fato, a observação de que as quelas ancoradas de algumas espécies de lotroata possuem um grande número de dentes é tomado como indicativo desse processo (HAJDU et al., 1994b).

Os gêneros que possuem placoquela (e suas derivações) mais micaloestilo, *Coelodischela*, *Guitarra* e *Tetrapocillon* (estes dois últimos possuindo também sigmancistras e isoquelas espinadas), foram considerados por Hajdu et al. (1994b) pertencentes à *Mycalina*, e estariam mais relacionados ao gênero *Euchellipluma*, que possui quelas palmadas com fimbria interna. Desta forma *Guitarra* e *Tetrapocillon* estariam mais bem alocados em *Mycalina* em detrimento a *Myxillina*.

Hajdu (1994) apresentou de forma concisa e convincente uma discussão sobre as sigmancistras, e suas derivações, elaborando uma hipótese de série de transformação para esses caracteres. As cirtancistras foram postuladas como uma simplificação das diancistras pela redução das franjas na porção interna do “C”, mantendo-se apenas nas extremidades da microsclera. A série de transformações incluía paralelamente a extensão das terminações dos “Cs”, culminando com o fechamento da microsclera, observado nos clavodiscos, equivalentes a um “0” (Figura 8). O autor observou que existe uma franja interior em todas essas microscleras sigmatosas, além de dois freqüentes entalhes circulares na face interna das extremidades de cada espícula. Hoshino (1990) forneceu elementos factuais adicionais para este esquema através da publicação de clavodiscos abertos (parecidos com diancistras), para *Merlia tenuis*.

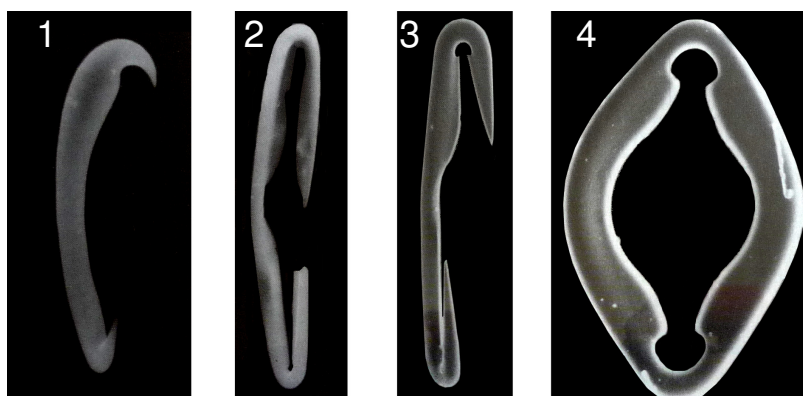


Figura 8 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) com a série de transformação das sigmancistras: (1) sigmancistra, (2 e 3) diancistras e (4) clavidisco. Extraído de Hajdu et al. (1994b).

Hajdu et al. (1994b) sugeriram que as microscleras do tipo fórceps fossem um caráter homoplástico uma vez que da publicação de seu trabalho os gêneros que eram reportados com essa microsclera pertenciam a grupos distintos. Entretanto, hoje, com exceção de *Abestopluma*, todos os outros gêneros foram considerados sinonímias de *Forcepia*: *Wilsa* de Laubenfels, 1930, *Leptolabis* Topsent, 1901, *Trachyforcepia* Topsent, 1904, *Clinolabis* Topsent, 1927 e *Labisophlita* de Laubenfels, 1936 (VAN SOEST et al., 2011). Mesmo assim, *Abestopluma* (*Mycalina*) e *Forcepia* (*Myxillina*) são postos como grupos distintos. A interpretação dos fórceps como derivados de toxas (VOSMAER, 1887; DENDY, 1921; WIEDENMAYER, 1977) parece improvável, porque a maioria destes são (micro)espinados, enquanto toxas espinadas são raras. Por outro lado, em *Tedaniidae* há oniquetas que são microscleras (semelhante a micróxeas) microespinadas. Se propuséssemos uma hipótese de relação filogenética das oniquetas com os fórceps, tal interpretação teria algumas implicações, como assumir uma hipótese pouco parcimoniosa de três surgimentos independentes e assumindo que os fórceps, mais complexos que as oniquetas, tenham surgido primeiro, consequência da proposição de *Mycalina* como grupo basal em relação a *Myxillina*. De fato, mesmo que menos provável, ou até improvável, as toxas (Figura 9) ainda seriam as melhores candidatas para hipotetizarmos uma série de transformações. Por outro lado, a posição de *Tedaniidae* dentro de *Myxillina* é pouco consistente, haja vista a completa ausência de sigmas ou quelas.

Em relação às megascleras podemos destacar os micalostilos (Figura 10), termo empregado por Hajdu et al. (1994b) para nomear um conjunto de espículas derivado de um único ancestral (não é estritamente descritivo). Estas são as megascleras que ocorrem nas famílias assinaladas para a Subordem Mycalina; são subtilóstilos a tilóstilos com uma constrição no pescoço, ou uma cabeça apenas ligeiramente inchada, frequentemente fusiformes. Em outras palavras, foram propostas como uma sinapomorfia subjacente para a Subordem ao lado da série de transformações das sigmancistras.

Como apresentado, até a publicação dos trabalhos de Hajdu e Hajdu et al. (HAJDU, 1994, 1995; HAJDU et al., 1994b), a Ordem Poecilosclerida, nunca tinha sido explorada de forma minuciosa e sistemática, dentro do paradigma filogenético henniguiano. A dita Ordem é a maior e mais diversa de Demospongiae e ainda apresentava inconsistências. Por exemplo, Hajdu et al. (1994b) sugeriram que *Coelocartheria* Burton, 1934 (aceita como Poecilosclerida, Mycalina, Isodictyidae), em virtude de sua organização esquelética caracterizada pela presença de uma reticulação de feixes multiespiculares de diactinas, teria afinidade com a Família Phloeodictyidae (Haplosclerida, Subordem Petrosina). Mas, como dito anteriormente, não é consenso a alocação dos gêneros *Isodictya* e *Coelocartheria* em Haplosclerida, bem como a alocação dos gêneros *Podospongia* du Bocage, 1869 e *Latrunculia* du Bocage, 1869 em Hadromerida.

1.4 Mycalina após o Systema Porifera

Segundo a última revisão para a Subordem Mycalina, van Soest e Hajdu (2002a) a definem como uma Poecilosclerida com quelas palmadas ou derivadas destas, megascleras lisas de um único tipo, quelas tridentadas, toxas ausentes, sigmas e derivadas destas presentes e esqueleto plumoreticulado a reticulado.

Em relação à designação original por Hajdu et al. (1994), a composição de Famílias, que continha Mycalidae, Hamacanthidae, Desmacellidae, Cladorhizidae e Guitarridae, foi acrescida de Esperlopsidae, Isodictyidae, Merliidae e Podospongiidae; totalizando nove famílias (VAN SOEST; HAJDU 2002a).

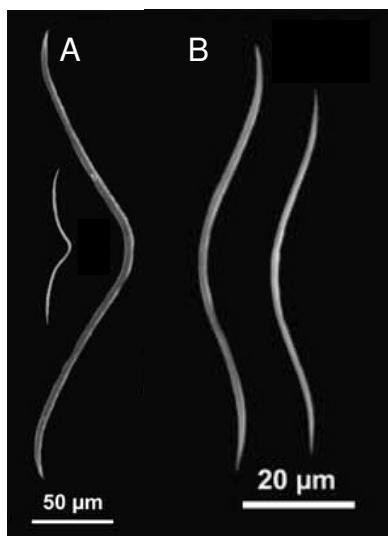


Figura 9 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) exemplificando toxas. A, toxas em duas categorias: toxa-I (grande) e toxa-II (pequena); e B, toxas pequenas. Extraídas de Carballo e Barrradas (2010).

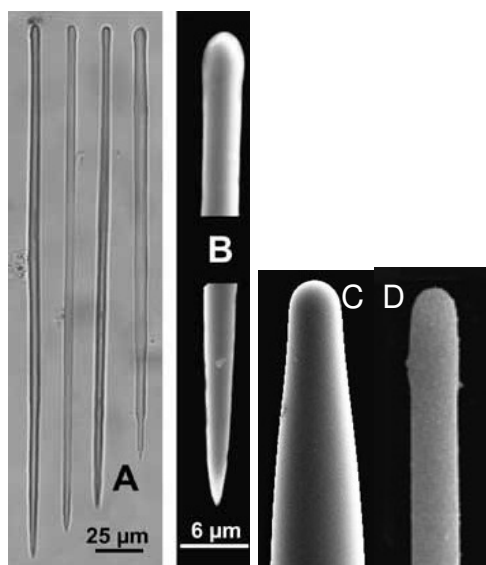


Figura 10 – Imagens de microscopia ótica (MO) e eletrônica de varredura (SEM) apresentando micalostilos, megascleras típicas da Subordem Mycalina e detalhes da base e ponta. A e B, extraídas de Carballo e Barrradas (2010) e, C e D, de Vacelet et al. (2006).

Esperiopsidae já esteve assinalada, em parte, dentro de Mycalidae por dois estudos cladísticos: Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994) e, posteriormente, Hajdu (1999), que comprovaram o monofiletismo da Família Mycalidae, apesar do gênero *Esperiopsis* mostrar-se parafilético em ambas as análises. Historicamente, *Esperiopsis* era considerada uma Mycalidae (TOPSENT, 1928; BERGQUIST; FROMONT, 1988; HAJDU et al., 1994b) pelas similaridades entre as microscleras e megascleras de *Amphilectus* Vosmaer, 1880, *Esperiopsis* e *Mycale*. Contudo, o esqueleto dos dois primeiros gêneros é distinto dos encontrados dentro de Mycalidae. Desta forma, van Soest e Hajdu (2002a) propuseram a ressurreição de Esperiopsidae, incluindo ainda outros dois gêneros além de *Amphilectus* e *Esperiopsis*: *Ulosa* de Laubenfels, 1936 e *Semisuberites* Carter, 1877, ambos sem microscleras. Esses autores, contudo, consideraram as similaridades dos estilos e da reticulação do esqueleto como compatíveis com o observado em *Amphilectus* e *Esperiopsis*.

A Família Merllidae é sem dúvida um caso à parte por apresentar um esqueleto carbonático basal. No passado, seu único gênero, *Merlia* Kirkpatrick, 1908, foi assinalado como grupo irmão de Desmacelinae por Kirkpatrick (1911). Posteriormente sua posição variou entre grupos distintos, até que Hajdu et al. (1994b) e Hajdu (1995) enfatizaram a similaridade dos seus clavidiscos e comas com microscleras de Hamacanthidae e Desmacellidae. *Merlia* é o único gênero de Mycalina com esqueleto basal carbonático com grau quetetideo (formado por camaras calcáreas organizadas em camadas) de organização. Por esta razão, Hajdu e van Soest (2002c) ressuscitaram Merllidae para *Merlia*, apesar do questionamento acerca da real utilidade dos táxons monotípicos e suas diagnoses redundantes.

Podospingiidae possui uma história longa e complicada (ver histórico em Kelly e Samaai, 2002), estes mesmo autores colocaram a Família, antes pertencente a Latrunculidae, como Mycalina incertae sedis com base na interpretação de que as microscleras protorrábdos e espinorrábdos são derivadas de microscleras sigmóides. A estes se somam dados acerca da reprodução e a presença de peróxidos norsesterpênicos, características que diferenciam Podospingiidae de Latrunculidae e a aproximam de Mycalina. Recentemente dois novos gêneros foram descritos para a Família: *Neopodospongia* e *Diplopodospongia* (SIM-SMITH; KELLY, 2011).

Apresentamos em seguida, de forma resumida, a composição das famílias não monotípicas da Subordem Mycalina. A Família Desmacellidae possui seis gêneros, é definida como uma Mycalina sem quela e microscleras semelhantes a diancistras; as microscleras incluem sigmas, micróxeas, comatas e ráfides (HAJDU; VAN SOEST, 2002b). A Família Isodictyidae possui dois gêneros, é definida como uma Mycalina que possui megascleras diactinais arranjadas em uma arquitetura esquelética (plumo)reticulada (nifatidi- ou fleodictiforme) e isoquelas palmadas (HAJDU; LÔBO-HAJDU, 2002). A Família Mycalidae possui dois gêneros, é definida como uma Mycalina com micalostilo, ocasionalmente modificado a óxea ou estrôngilo, em um arranjo, plumoreticulado ou de maneira confusa; microscleras incluem quelas palmadas, sigmas (podem ser serrilhadas), toxas (podem ser espinadas), micróxeas espinadas e ráfides, as quais podem ser ausentes, sem diancistras ou derivadas desta, sem comatas ou micro(subtilo-)estilos espinados (VAN SOEST; HAJDU, 2002b). A Família Cladorhizidae possuía quatro gêneros (VAN SOEST et al., 2011), é definida como uma Mycalina normalmente pequena, simétrica, majoritariamente de oceanos profundos, com processos diagonalmente radiais diagonais e ramificações basais, possuem adaptação para viver em substrato inconsolidado. O esqueleto axial é composto de megascleras monoactinais ou diactinais, a partir do qual os tratos extra-axial irradiam para o ectossoma. As microscleras incluem (an)isoquelas, sigmas, forceps, ou micro(subtilo)estilo (microespinados, lanceolados em alguns casos). Uma considerável redução ou perda total das câmaras coanocitárias é conhecida para algumas espécies, estando associado com a adaptação a carnivoría, capturando uma larga quantidade de presas (HAJDU; VACELET, 2002). Desde a última revisão foi descrito mais um gênero para esta Família, Lollipocladia Vacelet, 2008 e foi descoberta uma espécie carnívora de outra Família, Esperlopsidae (ERESKOVSKY; WILLENZ, 2007). A Família Guitarridae, com quatro gêneros, é definida como uma Mycalina com microsclera do tipo placoquela e derivações desta. Dois gêneros compõem a Família Hamacanthidae, uma Mycalina com diancistras e variações desta, as quais são sempre em forma de “C”, achatadas ou contorcidas (HAJDU, 2002).

1.5 O ponto de vista da sistemática molecular

Até este momento foi apresentado um panorama geral da classificação da Ordem Poecilosclerida e da Subordem Mycalina exclusivamente com base em dados morfológicos. Os dados moleculares são poucos e não há um trabalho com enfoque em Mycalina.

O primeiro trabalho de filogenia molecular que continha alguma espécie de Mycalina foi publicado por Borchiellini et al. (1998) cujo objetivo era avaliar o monofiletismo de Metazoa e a relação deste com Fungi, utilizando sequências do gene que codifica a proteína de choque térmico HSP70. Foram utilizadas cinco espécies de Porifera, e *Asbestopluma hypogea* Vacelet & Boury-Esnault, 1996 (Mycalina, Cladorhizidae) aparece agrupada com *Chondrosia reniformis* (Chondrosida, Chondrillidae). Segundo os dados morfológicos o provável grupo irmão de Poecilosclerida seria Haplosclerida, desta forma era esperado que a espécie *Petrosia* (Haplosclerida, Petrosiidae), que compunha o conjunto de dados, se agrupasse com *Asbestopluma*, entretanto, os grupos ficaram distantes. O resultado é um provável artefato de uma amostragem pequena e do alto grau de conservação do gene utilizado.

Collins (1998) utilizou o gene codificante do RNA ribossomal (RNAr) 18S ou SSU (do inglês Small Subunit), buscando avaliar hipóteses alternativas para o surgimento de Bilateria. Na árvore apresentada constavam seis Demospongiae, dentre elas *Mycale fibrexilis* (Wilson, 1894) (Poecilosclerida, Mycalina, Mycalidae), que aparece agrupada com *Microciona prolifera* (aceita hoje como *Clathria* (*Clathria*) *prolifera* (Ellis & Solander, 1786) [Poecilosclerida, Microcionina, Microcionidae]), e tendo *Suberites nardo*, 1833 (Hadromerida) como grupo irmão destas.

Alvarez et al. (2000) realizaram uma análise utilizando o gene codificante do RNAr 28S ou LSU (do inglês Large Subunit) para avaliar as relações da Família Axinellidae com 27 táxons, dentre eles uma, hoje aceita como Poecilosclerida, *Ulosa*, apresentada no trabalho como uma Dictyonellidae (Halichondrida). Na hipótese apresentada a referida Poecilosclerida agrupa com *Scopalina ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977) (Dictyonellidae). A amostragem não engloba nenhuma outra Poecilosclerida, Haplosclerida ou Hadromerida, grupos possivelmente mais correlatos.

Borchiellini et al. (2000) em revisão acerca da sistemática molecular de Porifera, mostraram que 95 táxons possuíam sequências de ao menos um marcador

molecular (RNAr 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 e 28S e HSP70) depositadas em bancos públicos. Destas 95 sequencias, apenas seis eram de Poecilosclerida, sendo a metade (três) da Subordem Mycalina. Esta revisão mostra que os autores, não possuíam interesse na filogenia de Poecilosclerida ou a obtenção dos dados era difícil.

Vacelet et al. (2000) buscando entender o posicionamento de esponjas sem esqueleto, empreenderam uma análise filogenética usando parte do gene LSU. *Asbestopluma hypogea* (Mycalina, Cladorhizidae) agrupou, com a outra Poecilosclerida da análise, *Anchinoe tenacior* (aceita hoje como *Phorbas tenacior* (Topsent, 1925) [Myxillina, Hymedesmiidae]); tendo como grupo irmão de Poecilosclerida o agrupamento *Spongosorites genitrix* (aceita como *Halichondria* (*Halichondria*) *genitrix* (Schmidt, 1870)) mais *Halichondria panicea* (ambas *Halichondrida*, *Halichondriidae*). A análise contou com três Haplosclerida, as quais se agruparam entre si, mas o clado ficou distante das Poecilosclerida. A Ordem Hadromerida não foi representada nesta análise. Estes dados indicam que Haplosclerida, provavelmente, não é o grupo irmão de Poecilosclerida.

Borchiellini et al. (2001) investigando o parafiletismo de Porifera e a origem dos metazoários, utilizando sequencias parciais do gene SSU, encontraram o mesmo resultado que Collins (1998) no tocante à Poecilosclerida. Esta proximidade entre Hadromerida e Poecilosclerida também foi corroborada por resultados obtidos por Manuel et al. (2003), Addis e Peterson (2005) e Dohrmann et al. (2006).

Schmitt et al. (2005), trabalhando com sequencias de SSU, obtiveram uma árvore onde *Mycale fibrexilis* (Mycalina, Mycalidae) agrupa com *Clathria* (*Thalysias*) *reinwardti* (Microcionina), com outra Microcionina, *Microciona prolifera*, adjacente a esse grupo, e na base, *Negombata corticata* (Carter, 1879) (Mycalina: Podospongida). Como grupo irmão destas Poecilosclerida aparece o agrupamento *Plakortis* Schulze, 1880 (Classe Homoscleromorpha) mais *Suberites ficus* (Johnston, 1842) (Hadromerida). Esses agrupamentos carecem de robustez e estes dados merecem uma reavaliação cuidadosa e crítica.

Erpenbeck et al. (2005a) utilizando o gene do RNAr 28S e duas *Mycale* em suas análises, discutem que estas duas espécies não formam um clado e se agrupam com a Ordem Halichondrida, provavelmente um reflexo colinear da disparidade morfológica que apresentam entre si. A visão dos autores é interessante, entretanto, as diferenças morfológicas entre quaisquer espécies de

Mycale é muito menor do que quando comparadas a qualquer Halichondrida. Já Erpenbeck et al. (2005b) utilizando como marcador molecular o gene codificante da proteína nuclear fator 1-alfa de alongamento da tradução (EF1-a), demonstraram que a espécie *Mycale flagellifera* Vacelet & Vasseur, 1971 (Mycalina, Mycalidae) não forma um clado com *Coelocartheria* (Mycalina, Isodictiida), nem com qualquer outra Ordem da Classe Demospongiae.

Erpenbeck et al. (2007), utilizando diferentes domínios do LSU e alinhamento com base na estrutura secundária do RNA, empreenderam uma análise filogenética com amostragem de quase todas as ordens de Demospongiae. As Poecilosclerida aparecem agrupadas em todas as árvores, entretanto; as relações internas são distintas daquelas postuladas por Hajdu et al. (1994b). As Mycalinas de mesmo gênero agrupam-se, contudo, dentro do clado Poecilosclerida aparecem espécies de *Astrophorida* e *Hadromerida* em mais de uma árvore. Os autores argumentam que esses agrupamentos são artefatos já registrados na literatura para sequências de LSU. A busca pela árvore mais parcimoniosa foi prejudicada pelo baixo aporte computacional de hardware e falta de algoritmos refinados para os modelos de alinhamento com base na estrutura secundária do RNA.

Kober e Nichols (2007) produziram o primeiro trabalho, de filogenia molecular, cujo objetivo focava na Ordem Poecilosclerida. Eles investigaram a relação entre as ordens *Hadromerida* e *Poecilosclerida* e a amostragem incluía quase todas as ordens de Demospongiae, com representantes da Ordem *Haplosclerida*, postulada como grupo irmão de *Poecilosclerida* segundo dados morfológicos, como já apresentado. Os resultados mostraram que: (1) aceitar o monofilietismo de *Hadromerida* implicaria em incluir *Poecilosclerida*, ou (2) aceitar *Poecilosclerida* como um grupo monofilético seria assumir *Hadromerida* como parafilético. Os autores não tomam uma posição e argumentam a necessidade de maiores estudos e uma amostragem mais substancial para o entendimento desta relação.

Morrow et al. (2011) investigaram as relações internas do grupo G4, designação de grupo informal definido a partir de dados moleculares, que inclui *Poecilosclerida*, *Hadromerida*, *Halichondrida*, algumas famílias de outras ordens e *Tetractinellida* (sensu MARSHAL 1876). Os resultados de LSU e CO1 mostraram a Ordem *Poecilosclerida* subdividida em *Raspaillidae* e demais *Poecilosclerida*, grupos que se situam distantes na árvore, além disso, *Desmacellidae* (excetuando *Desmacella*) é desmembrada da Ordem.

Como apresentado, há poucos dados moleculares para as espécies de Mycalina e apesar de dois trabalhos que tratam especificamente de Poecilosclerida, em algum nível, e tantos outros que abordam alguma espécie desta Ordem, suas relações permanecem não resolvidas. A subordem Mycalina encontra-se na mesma situação, com o possível desmembramento de alguns grupos e talvez a inclusão de outros. Desta forma, este trabalho tem como meta gerar novos dados moleculares, unir aos que já existem e proceder a uma análise filogenética, associada à proposição formal de filogenias com base em dados morfológicos e reinterpretar os caracteres com uma abordagem mais ampla, na busca de uma proposição de classificação mais robusta em resposta às atuais perguntas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar, discutir e propor mudanças no atual sistema de classificação da Subordem Mycalina Hajdu, van Soest & Hooper, 1994 (Poecilosclerida, Demospongiae), dentro de uma perspectiva filogenética, com base em dados morfológicos e moleculares.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Propor e analisar uma hipótese filogenética formal, com base em dados morfológicos, para a Subordem Mycalina no nível de categoria taxonômica de Espécie;
- 2- Propor e analisar uma hipótese filogenética formal, com base em dados morfológicos, para a Subordem Mycalina no nível de categoria taxonômica de Gênero;
- 3- Propor e analisar uma hipótese filogenética formal, com base em dados morfológicos, para a Subordem Mycalina no nível de categoria taxonômica de Família;
- 4- Propor e analisar uma hipótese filogenética formal, com base em dados moleculares, para a Subordem Mycalina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Examinado

As maioria das amostras utilizadas nas análises moleculares foram obtidas a partir da coleção de Porifera do Museu Nacional (MNRJ) e do Museu Zoológico de Amsterdam (ZMA, *Zoological Museum of Amsterdam*) (Tabela 4), que contam com uma coleção de Poríferos com espécimes tipos ou não da Subordem Mycalina, bem como um permanente acordo de empréstimo de material.

3.2 Estudo das espículas

3.2.1 Dissociação espicular em tubo de ensaio

Retira-se um pequeno fragmento da esponja, o qual é colocado em um tubo de ensaio e fervido com algumas gotas de ácido nítrico 65% até a completa dissociação da matéria orgânica. Na etapa seguinte, lava-se o material quatro vezes com água destilada e quatro vezes com álcool 96°GL, centrifugando ou deixando decantar a preparação entre uma lavagem e outra. Ao concluir-se este processo, pipeta-se o material, colocando-o sobre lâminas, as quais devem ser deixadas sob uma lâmpada para evaporação do álcool. Após completa secagem, cobrem-se as lâminas com bálsamo do Canadá ou Entellan® e lamínula.

3.2.2 Dissociação espicular em lâmina

Retira-se um fragmento da esponja, depositando-o sobre uma lâmina e deixando-o assim até a completa evaporação do álcool. A seguir, pingam-se algumas gotas de ácido nítrico 65% e flamba-se a lâmina até completa dissociação da matéria orgânica. Após, pingam-se quatro vezes algumas gotas de água destilada, sempre deixando secar sob o calor emitido da lâmpada. Repete-se este processo com álcool 96°GL. A seguir, cobre-se a preparação com bálsamo do Canadá ou Entellan® e lamínula. Emprega-se essa técnica quando o espécime analisado é pequeno ou quando há necessidade de uma identificação rápida.

Tabela 4 – Material utilizado na extração e amplificação do DNA de espécies de Mycalina. ID = identificação única para o produto da extração; [DNA] = concentração de DNA; 260/280 = relação entre OD 260 nm/ OD 280 nm; 260/230 = relação entre OD 260 nm/ OD 230 nm.

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Táxóns	Ano col.	Coletor	Local
184	21.2	1.9	1.2	MNRJ10866	<i>Abestopluma</i> sp. n.1		Programa de Observadores de Bordo do Chile	Chile
182	13.6	1.7	0.9	MNRJ9118	<i>Abestopluma</i> sp. n.1			Chile
191				MNRJ10866	<i>Abestopluma</i> sp. n.2		Programa de Observadores de Bordo do Chile	Chile
189				MNRJ9118	<i>Abestopluma</i> sp. n.2			Chile
183	21.2	1.5	0.5	MNRJ9119	<i>Abestopluma</i> sp. n.2			Chile
190				MNRJ9119	<i>Abestopluma</i> sp. n.3			Chile
217	244.1	1.9	1.7	ZMAPOR13264	<i>Abestopluma vaceleti</i>		B.Baker	Antártica
185	17.1	1.6	0.4	MNRJ10873	<i>Abyssocladia</i> sp.		Programa de Observadores de Bordo do Chile	Chile
192				MNRJ10873	<i>Abyssocladia</i> sp.		Programa de Observadores de Bordo do Chile	Chile
121	1.9	2.5	0.3	MNRJ375?	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	1996		Brasil
31	119.6	1.7	0.8	MNRJ6470	<i>Amphilectus</i> sp.	2002	N. Oc. Astro Garoupa	Brasil
255	484.9	1.8	1.1	MNRJ6470	<i>Amphilectus</i> sp.	2002	N. Oc. Astro Garoupa	Brasil
33	680.9	1.7	0.7	MNRJ6583	<i>Amphilectus</i> sp.	2002	N. Oc. Astro Garoupa	Brasil
32	1167.5	1.8	0.9	MNRJ6590	<i>Amphilectus</i> sp.	2002	N. Oc. Astro Garoupa	Brasil
80	0.2	-0.3	0.1	MNRJ9191	<i>Amphilectus</i> sp.	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
253	1754.8	2.0	1.6	MNRJ9191	<i>Amphilectus</i> sp.	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
13	1.9	1.0	0.5	MNRJ13494	<i>Amphilectus fucorum</i>		C. Cardenas	Chile

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Táxóns	Ano col.	Coletor	Local
21	28.6	1.5	0.4	MNRJ13494	<i>Amphilectus fucorum</i>		C. Cardenas	Chile
95	35.0	1.9	1.4	MNRJ3752	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
113	45.6	1.7	0.7	MNRJ3752	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
129	5.6	1.8	1.1	MNRJ3752	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
104	-0.3	0.6	-0.7	MNRJ3753	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
3	2.1	0.7	0.3	MNRJ3754	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
87	2.1	2.3	1.6	MNRJ3754	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
89	39.9	1.8	1.1	MNRJ3754	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
106	-0.6	0.5	-2.6	MNRJ3754	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
61	0.6	-0.9	2.0	MNRJ3755	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
115	100.3	1.3	0.3	MNRJ3755	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
63	2.0	3.7	2.7	MNRJ3756	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
117	23.7	1.6	0.8	MNRJ3757	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
78	3.3	1.5	0.9	MNRJ3759	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
79	0.8	1.3	3.1	MNRJ3759	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
122	52.6	1.3	0.4	MNRJ3759	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
64	1.1	1.6	0.3	MNRJ3761	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
123	96.2	1.7	0.7	MNRJ3761	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
72	1.1	7.5	0.9	MNRJ3762	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
112	34.0	1.5	0.5	MNRJ3762	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
73	4.2	3.2	2.4	MNRJ3763	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
118	12.1	1.4	0.4	MNRJ3763	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
77	1.0	1.0	2.7	MNRJ3765	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
120	96.2	1.4	0.4	MNRJ3766	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
11	3.9	1.9	-2075.0	MNRJ3767	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Táxóns	Ano col.	Coletor	Local
60	3.0	2.9	2.3	MNRJ3767	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
71	4.5	2.7	1.5	MNRJ3767	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
62	1.3	-5.8	-5.4	MNRJ3770	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
83	17.7	1.8	1.3	MNRJ3772	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
125	0.3	-0.8	0.6	MNRJ3772	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
101	7.6	1.6	1.2	MNRJ3773	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
124	3.3	1.4	0.4	MNRJ3773	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
69	0.7	-1.0	-0.9	MNRJ3776	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
75	0.1	-0.1	-0.2	MNRJ3784	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
91	2.3	1.3	0.5	MNRJ3796	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
9	3.4	1.2	0.3	MNRJ3798	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
20	57.1	0.5	0.6	MNRJ3798	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
70	10.8	1.9	1.4	MNRJ3798	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
27	94.5	1.6	0.8	MNRJ3839	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
59	5.0	1.6	1.2	MNRJ3839	<i>Amphilectus fucorum</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
43	45.3	1.9	1.3	MNRJ10777	<i>Amphilectus</i> sp.	2007	P. Willenz & J. Birro	Chile
46	17.9	1.9	1.1	MNRJ10777	<i>Amphilectus</i> sp.	2007	P. Willenz & J. Birro	Chile
155	61.9			MNRJ10777	<i>Amphilectus</i> sp.	2007	P. Willenz & J. Birro	Chile
29	8505.7	2.0	2.2	MNRJ9207	<i>Amphilectus</i> sp.5	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
119	-0.3	0.2	0.4	MNRJ9207	<i>Amphilectus</i> sp.5	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
127	0.2	-0.5	0.3	MNRJ9207	<i>Amphilectus</i> sp.5	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
139	5.6	2.2	2.3	MNRJ9207	<i>Amphilectus</i> sp.5	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
140	48.0	1.7	0.9	MNRJ9207	<i>Amphilectus</i> sp.5	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
141	-0.3	0.4	0.6	MNRJ9207	<i>Amphilectus</i> sp.5	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
242	1040.7	2.0	1.8	MNRJ9207	<i>Amphilectus</i> sp.5	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Taxóns	Ano col.	Coletor	Local
252	1834.5	1.9	1.5	MNRJ9207	<i>Amphilectus</i> sp.5	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
92	995.8	2.0	1.8	MNRJ3914	<i>Batzella</i> sp.	2001	G. Muricy & L. Monteiro	Brasil
133	2.2	4.4	1.5	MNRJ4632	<i>Biemna</i> sp.	2001	E. Hajdu	Brasil
35	3465.6	2.0	1.8	MNRJ8914	<i>Biemna</i> sp.	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
38	6.7	2.0	1.2	MNRJ8914	<i>Biemna</i> sp.	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
50	33.2	1.8	1.1	MNRJ8914	<i>Biemna</i> sp.	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
56	29.2	2.0	1.8	MNRJ8914	<i>Biemna</i> sp.	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
108	8.8	2.2	2.0	MNRJ8914	<i>Biemna</i> sp.	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
111	88.5	2.0	1.9	MNRJ8914	<i>Biemna</i> sp.	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
128	1.4	2.6	0.5	MNRJ8914	<i>Biemna</i> sp.	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
7	48.7	1.7	1.4	MNRJ8925	<i>Biemna</i> sp.	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
66	31.4	2.1	2.4	MNRJ9177	<i>Biemna</i> sp.	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
180	70.8	2.0		MNRJ9177	<i>Biemna</i> sp.	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
39	12.0	1.8	1.2	MNRJ9222	<i>Biemna</i> sp.	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
49	57.7	1.7	0.9	MNRJ9222	<i>Biemna</i> sp.	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
76	50.2	2.0	1.8	MNRJ9222	<i>Biemna</i> sp.	2005	V. Häussermann e G. Försterra	Chile
15	6.2	0.8	0.3	MNRJ8219	<i>Biemna</i> sp.2	2004	E. Hajdu, P. Willenz & G. Lobo-Hajdu	Brasil
19	2.4	1.0	0.8	MNRJ8219	<i>Biemna</i> sp.2	2004	E. Hajdu, P. Willenz & G. Lobo-Hajdu	Brasil
67	2.9	2.3	1.6	MNRJ8219	<i>Biemna</i> sp.2	2004	E. Hajdu, P. Willenz & G. Lobo-Hajdu	Brasil
97	2.2	1.4	0.7	MNRJ8219	<i>Biemna</i> sp.2	2004	E. Hajdu, P. Willenz & G. Lobo-Hajdu	Brasil
105	-0.3	0.6	0.7	MNRJ8219	<i>Biemna</i> sp.2	2004	E. Hajdu, P. Willenz & G. Lobo-Hajdu	Brasil

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Táxóns	Ano col.	Coletor	Local
							Hajdu	
131	0.8	-6.9	1.2	MNRJ8219	<i>Biemna</i> sp.2	2004	E. Hajdu, P. Willenz & G. Lobo-Hajdu	Chile
30	4535.8	2.0	1.9	MNRJ8922	<i>Biemna</i> sp.3	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
126	1.3	4.8	1.3	MNRJ8922	<i>Biemna</i> sp.3	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
147	9.0	1.5	0.9	MNRJ8922	<i>Biemna</i> sp.3	2005	Hajdu, Willenz e Lobo-Hajdu	Chile
40	38.6	1.9	1.3	MNRJ10316	<i>Biemna?</i>	2006	E. Hajdu & P. Willenz	Chile
2	534.3	1.9	1.4	MNRJ9172	Calcarea	2004		Brasil
42	34.6	1.8	0.8	MNRJ10756	cf. <i>Amphilectus americanus</i>	2007	E. Hajdu & P. Willenz	Chile
47	108.1	1.9	0.7	MNRJ10756	cf. <i>Amphilectus americanus</i>	2007	E. Hajdu & P. Willenz	Chile
186	31.1	1.9	2.0	MNRJ10882	<i>Chondrocladia</i> sp.		Programa de Observadores de Bordo do Chile	Chile
193				MNRJ10882	<i>Chondrocladia</i> sp.		Programa de Observadores de Bordo do Chile	Chile
142	26.4	1.9	2.5	MNRJ100	<i>Cinachyra (Cinachyrella)</i>	1996	E. Hajdu	Brasil
150	7565.2	1.9	2.3	MNRJ100	<i>Cinachyra (Cinachyrella)</i>	1996	E. Hajdu	Brasil
220				ZMAPOR21289	<i>Cladorhiza flosabyssi</i>			
222				ZMAPOR19680	<i>Cladorhiza gelida</i>		R.W.M. van Soest	Irlanda
85	22.0	2.0	1.4	MNRJ10728	<i>Cliona</i> aff. <i>celata</i>			Brasil
153	44.9	1.6	0.7	MNRJ8637	<i>Cliona varians</i>	2003	Fabiana	Brasil
229				ZMAPOR17703	<i>Coelocarteria singapoorensis</i>		D.Erpenbeck e N.J.de Voogd	Indonésia
268	575.7	1.6	0.7	ZMAPOR17703	<i>Coelocarteria singapoorensis</i>		D.Erpenbeck e N.J.de Voogd	Indonésia
151	6.1	2.0	1.4	MNRJ1499	<i>Dactylocalyx pumiceu</i>		Astro Garoupa	Brasil
194				Itaipu	<i>Desmacella</i> sp.	2011	G. Lôbo-Hajdu	Brasil
244	21.1	1.6	0.7	MNRJ7329	<i>Desmacella</i> sp.	2003		Brasil

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Táxóns	Ano col.	Coletor	Local
136	1.1	1.9	0.4	MNRJ7987	<i>Desmacella</i> sp.	2003		Brasil
146	5.4	0.8	0.1	MNRJ7987	<i>Desmacella</i> sp.	2003		Brasil
								Atlântico
240	126.2	1.7	0.7	MNRJ13767	<i>Desmacella</i> aff. <i>anexa</i>	2009	MAR-ECO	Sul
137	1.9	2.0	0.9	MNRJ8001a	<i>Desmacella</i> aff. <i>pumilio</i>	2003		Brasil
138	0.3	-0.3	-0.3	MNRJ8001a	<i>Desmacella</i> aff. <i>pumilio</i>	2003		Brasil
144	0.2	-0.4	0.8	MNRJ8001a	<i>Desmacella</i> aff. <i>pumilio</i>	2003		Brasil
34	545.0	1.9	1.2	MNRJ8005	<i>Desmacella</i> aff. <i>pumilio</i>	2003		Brasil
243	33.2	1.8	1.5	MNRJ8005	<i>Desmacella</i> aff. <i>pumilio</i>	2003		Brasil
135	0.5	-2.5	-8.0	MNRJ8005c	<i>Desmacella</i> aff. <i>pumilio</i>	2003		Brasil
98	23.2	1.8	1.5	MNRJ7342	<i>Desmacella</i> aff. <i>pumillio</i>	2003		Brasil
103	0.2	3.1	0.1	MNRJ7342	<i>Desmacella</i> aff. <i>pumillio</i>	2003		Brasil
145	19.1	1.2	0.3	MNRJ7342	<i>Desmacella</i> aff. <i>pumillio</i>	2003		Brasil
245	64.1	1.8	1.4	MNRJ7342	<i>Desmacella</i> aff. <i>pumillio</i>	2003		Brasil
232				ZMAPOR21186	<i>Desmacella inornata</i>		Marina Cunha	Espanha
								Papua Nova
221				ZMAPOR18576	<i>Diacarnus bismarckensis</i>		Karen Tenney	Guiné
								Papua Nova
262	55.3	1.5	0.6	ZMAPOR18576	<i>Diacarnus bismarckensis</i>		Karen Tenney	Guiné
228				ZMAPOR13278	<i>Diacarnus megaspinorhabdosa</i>		N.J. de Voogd	Indonesia
267	1230.0	1.9	1.2	ZMAPOR13278	<i>Diacarnus megaspinorhabdosa</i>		N.J. de Voogd	Indonesia
226				ZMAPOR17257	<i>Diacarnus megaspinorhabdosa</i>		Y. Benayahu e S. Perkoll	Quênia
265	86.9	1.6	0.5	ZMAPOR17257	<i>Diacarnus megaspinorhabdosa</i>		Y. Benayahu e S. Perkoll	Quênia
							G. Muricy, L. Monteiro & E.	
86	8.0	1.4	0.6	MNRJ3857	<i>Dragmacidon reticulatus</i>	2001	Vilanova	Brasil

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Táxóns	Ano col.	Coletor	Local
216	4.7	1.8	0.2	ZMAPOR18038	<i>Dragmatella aberrans</i>		R.W.M. van Soest	Espanha
57	22.7	1.9	1.7	MNRJ3943	<i>Dysidea robusta</i>	2001	E. Hajdu	Brasil
271	1747.2	1.0	0.2	ilha elefante	<i>Esperiopsis</i> sp.			Antártica
230				ZMAPOR20090	<i>Esperiopsis macrosigma</i>		R.W.M. van Soest	
82	11.9	2.0	1.3	MNRJ3207	<i>Geodia corticostilifera</i>	2000	G. Muricy	Brasil
5	372.9	1.9	1.3	MNRJ3923	<i>Guitarra sepia</i>	2001	G. Muricy & L. Monteiro	Brasil
65	1.9	2.9	5.2	MNRJ3923	<i>Guitarra sepia</i>	2001	G. Muricy & L. Monteiro	Brasil
88	2028.9	2.1	1.8	MNRJ3923	<i>Guitarra sepia</i>	2001	G. Muricy & L. Monteiro	Brasil
110	146.2	2.0	1.9	MNRJ3923	<i>Guitarra sepia</i>	2001	G. Muricy & L. Monteiro	Brasil
114	26.2	2.1	1.6	MNRJ3923	<i>Guitarra sepia</i>	2001	G. Muricy & L. Monteiro	Brasil
237				ZMAPOR11540	<i>Guitarra sigmatifera</i>		B. Baker	
219	20417.7	2.0	2.0	GUI T SUL BR	<i>Guitarra</i> sp.	2011	Cecília	Brasil
241	5193.6	1.9	1.6	GUI T SUL BR	<i>Guitarra</i> sp.	2011	Cecília	Brasil
					<i>Hamacantha (Hamacantha)</i>			
235				ZMAPOR21171	<i>johnsoni</i>		Marina Cunha	Espanha
					<i>Hamacantha (Hamacantha)</i>			
272	2.7	3.3	-0.8	ZMAPOR21171	<i>johnsoni</i>		Marina Cunha	Espanha
224				ZMAPOR19419	<i>Hamacantha (Vomerula) falcula</i>		R.W.M. van Soest	Irlanda
264	255.6	1.9	1.3	ZMAPOR19419	<i>Hamacantha (Vomerula) falcula</i>		R.W.M. van Soest	Irlanda
188	443.1	2.0	1.9	MNRJ11165	<i>lophon</i> sp.	2009	MABIREH	Antártica
17	46.5	1.6	1.0	MNRJ13482	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
44	19.9	1.7	0.8	MNRJ13482	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
52	1.6	1.9	1.0	MNRJ13482	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
171	530.0	1.7	0.9	MNRJ13482	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
178	73.3	1.4	0.6	MNRJ13482	<i>Isodictya</i> sp.			Chile

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Táxóns	Ano col.	Coletor	Local
249	293.4	1.6	0.6	MNRJ13482	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
8	356.3	1.8	1.4	MNRJ13490	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
37	53.6	1.8	1.4	MNRJ13490	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
54	22.4	1.7	1.2	MNRJ13490	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
170	357.0	1.8	1.6	MNRJ13490	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
177	53.3	1.6	0.8	MNRJ13490	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
251	59.3	1.7	0.7	MNRJ13490	<i>Isodictya</i> sp.			Chile
223				ZMAPOR20646	<i>Isodictya grandis</i>		B. Baker	Antártica
263	337.9	2.1	2.1	ZMAPOR20646	<i>Isodictya grandis</i>		B. Baker	Antártica
275	245.4	1.9	1.7	ZMAPOR21130	<i>Isodictya kerguelenensis</i>		B. Baker	Antártica
236				ZMAPOR17105	<i>Isodictya setifera</i>		B. Baker	Antártica
273	1544.8	2.1	2.1	ZMAPOR17105	<i>Isodictya setifera</i>		B. Baker	Antártica
239				ZMAPOR16770	<i>Isodictya toxophila</i>		GSN	Antártica
274	18.5	1.7	0.9	ZMAPOR16770	<i>Isodictya toxophila</i>		GSN	Antártica
276	39.6	1.9	1.6	ZMAPOR04765	<i>Merlia normani</i>		R.W.M. van Soest	
100	2.0	2.0	0.4	MNRJ3807	<i>Monanchora arbuscula</i>	2001	G. Muricy, L. Monteiro & E. Vilanova	Brasil
130	1.7	1.7	0.8	MNRJ3807	<i>Monanchora arbuscula</i>	2001	G. Muricy, L. Monteiro & E. Vilanova	Brasil
102	8.8	1.8	1.1	MNRJ4029	<i>Monanchora</i> sp.	2001	E. Hajdu & E. Vilanova	Brasil
238				ZMAPOR19661	<i>Mycale (Aegogropila) tunicata</i>		R.W.M. van Soest	Irlanda
225				ZMAPOR21411	<i>Mycale (Mycale) lingua</i>			
260	600.0	1.9	1.7	ZMAPOR21411	<i>Mycale (Mycale) lingua</i>			
233				ZMAPOR13405	<i>Mycale (Mycale) tridens</i>		USARP-SOSC	Antártica
269	37.1	1.6	0.9	ZMAPOR13405	<i>Mycale (Mycale) tridens</i>		USARP-SOSC	Antártica

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Táxóns	Ano col.	Coletor	Local
254	2667.9	2.0	2.0	Antartica	<i>Mycale acerata</i>		César Cárdenas & Emma	Antártica
187	172.4	2.1	2.0	MNRJ11131	<i>Mycale acerata</i>	2009	Newcombe	Antártica
4	22.7	1.9	1.3	MNRJ10848	<i>Mycale magelanica</i>	2007	E. Hajdu e P. Willenz	Chile
14	8.7	1.4	1.2	MNRJ10848	<i>Mycale magelanica</i>	2007	E. Hajdu e P. Willenz	Chile
22	12.3	1.8	1.1	MNRJ10848	<i>Mycale magelanica</i>	2007	E. Hajdu e P. Willenz	Chile
45	150.5	1.7	0.7	MNRJ10848	<i>Mycale magelanica</i>	2007	E. Hajdu e P. Willenz	Chile
51	44.2	1.7	1.0	MNRJ10848	<i>Mycale magelanica</i>	2007	E. Hajdu e P. Willenz	Chile
168	833.8	1.8	0.9	MNRJ10848	<i>Mycale magelanica</i>	2007	E. Hajdu e P. Willenz	Chile
175	1129.8	1.7	0.8	MNRJ10848	<i>Mycale magelanica</i>	2007	E. Hajdu e P. Willenz	Chile
270	143.9	2.0	1.8	ZMAPOR20645	<i>Mycale magellanica</i>		B. Baker	Antártica
36	0.7	1.4	0.2	MNRJ13994	<i>Mycale microsigmatosa</i>	2011	Wellington	Brasil
53	-0.1	1.0	-2935.0	MNRJ13994	<i>Mycale microsigmatosa</i>	2012	Wellington	Brasil
169	34.1	1.3	0.4	MNRJ13994	<i>Mycale microsigmatosa</i>	2010	Wellington	Brasil
176	30.3	1.4	1.0	MNRJ13994	<i>Mycale microsigmatosa</i>	2010	Wellington	Brasil
1	2.1	1.2	0.5	MNRJ9471	<i>Mycale microsigmatosa</i>	2005	Diego Valderrama	Panamá
18	120.4	1.9	1.7	MNRJ9471	<i>Mycale microsigmatosa</i>	2005	Diego Valderrama	Panamá
215	1261.0	2.0	1.9	ZMAPOR18995	<i>Mycale tunicata</i>		F. Brammer e M. Pfannkuchen	Croácia
210	48.4	1.9	1.2	ZMAPOR21466	<i>Negombata aff. corticata</i>			
256	214.5	1.9	1.2	ZMAPOR21466	<i>Negombata aff. corticata</i>			
234				ZMAPOR19911	<i>Negombata kenyensis</i>		Y. Benayahu	Tanzânia
								Mar
212	597.8	2.1	1.6	ZMAPOR16617	<i>Negombata magnifica</i>		D. Youssef	Vermelho
								Mar
258	974.1	2.0	1.7	ZMAPOR16617	<i>Negombata magnifica</i>		D. Youssef	Vermelho

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Táxóns	Ano col.	Coletor	Local
211	2041.2	1.9	1.4	ZMAPOR14177	<i>Neofibularia nolitangere</i>		M.J. de Kluijver	Curaçao
257	1137.0	1.7	0.8	ZMAPOR14177	<i>Neofibularia nolitangere</i>		M.J. de Kluijver	Curaçao
84	6.6	1.3	0.4	MNRJ2029	<i>Paresperella</i> sp.	1999	E. Hajdu	Brasil
213	21.0	1.5	0.3	TYPE BOCAGEI	<i>Phlyctaenopora</i> sp.			
12	5.6	1.2	0.5	MNRJ11666	<i>Podospongia</i> sp.	2009	MABIREH	Antártica
16	38.3	2	1755.0	MNRJ11666	<i>Podospongia</i> sp.	2009	MABIREH	Antártica
218	33.1	1.8	0.8	ZMAPOR10791	<i>Sceptrintus richardi</i>		don. S.A. Pomponi	
261	704.0	2.0	1.8	ZMAPOR10791	<i>Sceptrintus richardi</i>		don. S.A. Pomponi	
231				ZMAPOR17024	<i>Semisuberites cribosa</i>		H.A. Zanker	Escócia
28	489.1	1.9	1.5	MNRJ8687	<i>Sigmaxinella cearense</i>	2004	E. Hajdu	Brasil
99	64.0	1.9	1.8	MNRJ8687	<i>Sigmaxinella cearense</i>	2004	E. Hajdu	Brasil
109	0.6	-1.9	1.4	MNRJ8687	<i>Sigmaxinella cearense</i>	2004	E. Hajdu	Brasil
134	5.0	1.7	0.4	MNRJ8687	<i>Sigmaxinella cearense</i>	2004	E. Hajdu	Brasil
246	262.2	1.8	1.4	MNRJ8687	<i>Sigmaxinella cearense</i>	2004	E. Hajdu	Brasil
167	3551.2	2.1	1.8	MNRJ10348	<i>Sigmoceptrella</i> sp.	2007	D. Thompson	Chile
174	63.1	1.7	0.9	MNRJ10348	<i>Sigmoceptrella</i> sp.	2008	D. Thompson	Chile
41	153.8	1.9	1.3	MNRJ10323b	<i>Sigmosceptrella</i> sp.	2006	E. Hajdu & P. Willenz	Chile
48	708.9	1.9	1.2	MNRJ10323b	<i>Sigmosceptrella</i> sp.	2006	E. Hajdu & P. Willenz	Chile
248	5045.2	1.9	1.4	MNRJ10323b	<i>Sigmosceptrella</i> sp.	2006	E. Hajdu & P. Willenz	Chile
55	43.7	2.0	1.6	MNRJ10348	<i>Sigmosceptrella</i> sp.	2006	D. Thompson	Chile
166	202.2	1.9	1.0	MNRJ10787	<i>Sigmosceptrella</i> sp.	2008	P. Willenz & J. Birro	Chile
173	22.5	1.7	0.9	MNRJ10787	<i>Sigmosceptrella</i> sp.	2009	P. Willenz & J. Birro	Chile
74	108.4	2.1	2.2	MNRJ10787	<i>Sigmosceptrella</i> sp.	2007	P. Willenz & J. Birro	Chile
93	166.1	2.1	2.1	MNRJ10787	<i>Sigmosceptrella</i> sp.	2007	P. Willenz & J. Birro	Chile
227				ZMAPOR15263	<i>Tetrapocillon</i> sp.		J.H. Stock	Madagascar

ID	[DNA]	260/280	260/230	Tombo	Taxóns	Ano col.	Coletor	Local
266	211.6	1.5	0.6	ZMAPOR15263	<i>Tetrapocillon</i> sp.		J.H. Stock	Madagascar
152	1737.3	1.9	1.5	MNRJ300	<i>Trachycladus</i> sp.	1996	E. Hajdu e G. Muricy	Brasil
23	21.2	1.5	0.6	MNRJ3799	<i>Ulosa</i> sp.	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
58	7.1	1.1	0.8	MNRJ3799	<i>Ulosa</i> sp.	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
94	7.7	1.5	0.6	MNRJ3799	<i>Ulosa</i> sp.	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
116	-0.2	-1.8	2.6	MNRJ3799	<i>Ulosa</i> sp.	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
90	12.2	1.7	0.9	MNRJ3804	<i>Ulosa</i> sp.	1993	E. Hajdu e C. Lévi	França
25	7.2	1.0	0.6	MNRJ3835	<i>Ulosa</i> sp.	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
81	2.0	2.5	1.3	MNRJ3835	<i>Ulosa</i> sp.	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
6	1.9	0.7	0.4	MNRJ3837	<i>Ulosa stiposa</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
24	22.6	1.5	0.6	MNRJ3837	<i>Ulosa stiposa</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
247	15.8	1.8	1.0	MNRJ3837	<i>Ulosa stiposa</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
10	5.4	1.3	0.4	MNRJ3843	<i>Ulosa stiposa</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
26	32.5	1.8	0.4	MNRJ3843	<i>Ulosa stiposa</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
250	7.5	2.6	-4.5	MNRJ3843	<i>Ulosa stiposa</i>	1992	E. Hajdu e C. Lévi	França
214	9664.0	2.1	2.1	ZMAPOR14109	<i>Ulosa stiposa</i>		M.J. de Kluijver	França
259	1815.5	2.0	2.0	ZMAPOR14109	<i>Ulosa stiposa</i>		M.J. de Kluijver	França
148	13.8	2.0	1.7	MNRJ10005		2006	P. Willenz & D. Thompson	Chile
149	12.2	1.9	1.8	MNRJ10008		2006	P. Willenz & D. Thompson	Chile
								Brasil - Meso
96	0.9	2.1	0.7	MNRJ3585?		2000		oceânico
143	8.6	1.8	1.0	MNRJ9807?		2006	E. Hajdu e E. Torres	Argentina

3.2.3 Mensurações micrométricas em microscópio óptico

Foram efetuadas 30 micrometrias das diferentes categorias de espículas e microescleras, indicando sempre as dimensões mínima–média–máxima de largura e comprimento. Todas as micrometrias estão dadas em micrômetros (μm).

3.2.4 Observação do conjunto espicular em microscópio eletrônico de varredura

Retira-se um fragmento da esponja, procedendo-se a dissociação espicular em tubo de ensaio anteriormente descrita, com exceção de que, para a lavagem das escleras, utiliza-se somente água destilada. Sobre o suporte cola-se uma lamínula com esmalte incolor. Posteriormente, pinga-se uma ou duas gotas da dissociação espicular, deixando secar sob luminária com lâmpada de 60W por um ou dois dias. Após a secagem, a preparação é metalizada com ouro 24 quilates em metalizador.

3.3 **Estudo da arquitetura esquelética**

3.3.1 Cortes histológicos

Retira-se um fragmento perpendicular à superfície da esponja, o qual sofre duas desidratações com álcool 70°GL por aproximadamente 20 minutos cada, duas desidratações com álcool absoluto, também por 20 minutos cada. E uma terceira desidratação com butanol (duas vezes) por 30 minutos cada. Em seguida são feitas duas clarificações em xilol por cerca de 20 minutos cada uma. Após essas etapas inicia-se a fase de impregnação, que consiste em incluir o fragmento em parafina líquida purificada adicionada com cera de abelha com ponto de fusão de 56°C a 58°C, numa estufa com temperatura em torno de 80°C, por não menos que 24 horas e não mais que 48 horas. Para a confecção de blocos cilíndricos, derrama-se a parafina líquida sobre o fragmento diretamente no Micrótomo de Ranvier. Após a solidificação, os blocos são cortados de modo mais fino possível com o auxílio de um bisturi. A seguir, os cortes são depositados sobre placas de Petri, adicionando certa quantidade de xilol suficiente para cobrir o corte para retirada completa de parafina, trocando-se o xilol ou adicionando mais conforme se faça necessário, o que varia de acordo com a

espessura do corte, por 2 ou mais dias. Após esta etapa, cobre-se a preparação com bálsamo do Canadá ou Entellan® e lamínula.

3.3.2 Montagem de pranchas de imagens ou desenhos de cortes histológicos e desenho de espículas

Realizada com o programa PaintShop PRO (JASC software 1998-2000).

3.4. Estudo da morfologia externa das esponjas em estéreo-microscópio

Realizam-se observações, sempre que possível, descrevendo o tipo de superfície da esponja, coloração e consistência de cada espécime estudado, além do arranjo das aberturas inalantes (poros) e exalantes (ósculos).

3.5 Filogenia morfológica

Foram produzidas hipóteses cujos dados se baseiam em três níveis taxonômicos: espécies, gênero e família. Para todos estes utilizei dados secundários, selecionando na literatura, preferencialmente, a descrição original do grupo alvo e quando necessário complementado com a observação dos espécimes e auxílio de descrições.

As matrizes foram montadas utilizando o programa NDE 0.5.0 (PAGE, 1999) e analisadas por uma busca heurística de máxima parcimônia (MP) utilizando o algoritmo *New Technology Search*, uma análise de distância utilizando *Neighbor Joining* (NJ, agrupamento de vizinhos) e *Bootstrap*, todas no programa TNT 1.1 (GOLOBOFF *et al.*, 2008) e análise Baeyesiana (BA) via MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) utilizando o *MrBayes* 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). A avaliação, observação e consenso das árvores geradas foi feita no PAUP* 4Beta10 (rodando sob PAUPUP 1.0.3.1.BETA, [CALENDINI; MARTIN, 2005]) e formatação da versão impressa da árvore no McClade 4.08 (MADDISON; MADDISON, 2005).

3.6 Estudo de marcadores moleculares

3.6.1 Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído das amostras de esponjas homogeneizadas em tampão de lise contendo 4 M hidrocloreto de guanidina em 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 0,5% sarcosil (LBWGH, *lyses buffer with guanidine hydrochloride*). Após remoção de proteínas e lipídios por extração com fenol:clorofórmio, o DNA foi precipitado com etanol (LÔBO-HAJDU *et al.*, 2004). Além deste, outros protocolos foram utilizados: tampão de lise contendo CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*, adaptado de DOYLE; DOYLE, 1987), adsorção de ácidos nucleicos em microesferas de sílica (adaptado de HOSS, 1994) e extração salina adaptado de Aljanabi e Martinez (2007).

3.6.2 Quantificação do DNA

Os produtos de extração foram analisados por eletroforese em gel de 0.8% de agarose, e visualizados após incubação em brometo-de-etídeo a 0,5 ug/uL e por leitura da densidade óptica (OD) a 260 nm, 280 nm e 260 nm/280 nm no espectrofotômetro Nanodrop™ 2000c (Thermo Scientific). As amostras com relação 260 nm/280 nm entre ~1,8-2 eram reservadas para a etapa seguinte.

3.6.3 Escolha de marcadores moleculares e amplificação

Os marcadores moleculares foram escolhidos da literatura com base na variabilidade descrita em outros organismos. Neste projeto, cujos objetivos são majoritariamente ligados a análise de categorias taxonômicas gerais (subordem e famílias), foram preteridas seqüências parciais de domínios conservados. Nos ramos que estas seqüências não demonstraram definição adequada, foram seqüenciados outros domínios mais variáveis.

Para a subunidade maior do RNA ribossomal (RNAr 28S ou LSU) foram seqüenciados fragmentos pertencentes a domínios entre D3 e D5. Estes são bem conservados, já descritos e recorrentemente utilizados por possuírem um bom sinal

filogenético (D3: ALVAREZ *et al.*, 2000; D3–D5: REVEILLAUD *et al.*, 2011; MCCORMACK; KELLY, 2002; MCCORMACK *et al.*, 2002).

Apesar das inegáveis contribuições no entendimento da filogenia de Porfiera obtidas utilizando o 28S, em algumas situações, este pode produzir agrupamentos anômalos (NICHOLS, 2005) ou ser inábil na resolução de alguns ramos, desta forma a utilização combinada com dados morfológicos apresenta-se como uma estratégia com maior chance de sucesso (MEDINA *et al.*, 2001; COLLINS *et al.*, 2006).

Regiões específicas do genoma das esponjas foram amplificadas *in vitro* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Foram utilizados oligonucleotídeos específicos, listados na tabela 5.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos (*primers*, em inglês) específicos utilizados neste trabalho.

Nome	Domínios	Direção	Sequencia	Tm	Publicação original	posição
C'1	C1-C2	senso	ACCCGCTGAATTTAAGCAT	50 °C	Borchiellini <i>et al.</i> , 2004	354
Ep3	C1-C2	antisenso	ATKCGYTTCCCTCCYAACGG	50 °C	Borchiellini <i>et al.</i> , 2004	1491
C'1	C1-C2	senso	ACCCGCTGAATTTAAGCAT	50 °C	Borchiellini <i>et al.</i> , 2004	354
D2R	D2	antisenso	TCCGTGTTTCAAGACGGG	50 °C	Chombard <i>et al.</i> , 1998	1161
NL2F	C2-D5	senso	TACCGTGAGGGAAAGGTGAAA	59 C	Kober; Nichols 2007	685
NL2R	C2-D5	antisenso	CGGAGGGAACCAGCTACTAGA	61 C	Kober; Nichols 2007	1479
RD3a	D3-D5	senso	GACCCGTCTTGAAACACGA	50 °C	McCormack <i>et al.</i> , 2002	1151
RD5B2	D3-D5	antisenso	ACACACTCCTTAGCGGA	50 °C	McCormack <i>et al.</i> , 2002	1805
Por28S-830F	D3-D5	senso	CATCCGACCCGTCTTGAA	50 °C	Morrow <i>et al.</i> , 2011	1154
Por28S-1520R	D3-D5	antisenso	GCTAGTTGATTCCGGCAGGTG	50 °C	Morrow <i>et al.</i> , 2011	1828
18S f		senso	CTGGTGCCAGCAGCCGCGG	54 °C	Nichols (2005)	
18S f		antisenso	TGGTGCCCTTCCGTCAATTCCT	54 °C	Nichols (2005)	
LCO1490		senso	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	48 °C	Folmer <i>et al.</i> , 1994	
HCO2198		antisenso	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	48 °C	Folmer <i>et al.</i> , 1994	
COX1-D2		senso	AATACTGCTTTTTTGTATCCTGTTGG	41 °C	Rot <i>et al.</i> , 2006	
COX1-R1		antisenso	TGTTGRGGGAAAAARGTTAAATT	41 °C	Rot <i>et al.</i> , 2006	

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 da fita nova pela DNA polimerase. A reação de amplificação, para 15 µL de volume de reação, ocorreu sob as seguintes condições de termociclagem: (1x) 94°C por 2 min + (35x) 92°C por 30 seg, 52°C por 30 seg, 72°C por 1 min + (1x) 72°C por 5 min; em solução contendo 1x Tampão de reação PCR (BioTools™), 0,7 unidades de DNA polimerase *Tth* (BioTools™), 3,7 mM de MgCl₂, 0,13 µM dos iniciadores, 0,3 µM de dNTP, e aproximadamente 4 ng de DNA da amostra a ser amplificada.

A subunidade menor do gene ribossomal (18S ou SSU) foi utilizada com os iniciadores 18S forward (sentido senso) 5´ CTGGTGCCAGCAGCCGCGG 3´ e 18S backward (sentido antisenso) 5´ TGGTGCCCTTCCGTCAATTCCT 3´ publicados em Nichols (2005). A reação de amplificação utilizou os mesmos reagentes (exceto os iniciadores) e concentrações descritas anteriormente para o marcador 28S. As condições de termociclagem foram (1x) 94°C por 4 min + (45x) 92°C por 30 seg, 54°C por 45 sec, 72°C por 1 min + (1x) 72°C por 6 min.

Além dos marcadores nucleares (28S e 18S) foram utilizadas, do genoma mitocondrial, duas regiões, Folmer e Rot, localizadas no gene citocromo oxidase 1 (COX1 ou COI). A região Folmer foi amplificada utilizando os iniciadores LCO1490 (sentido senso) 5´ GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3´ e HCO2198 (sentido antisenso) 5´ TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA 3´, publicados em Folmer *et al.*, 1994. A reação de amplificação utilizou os mesmos reagentes (exceto os iniciadores) e concentrações descritas anteriormente para o marcador 28S. As condições de termociclagem foram (1x) 94°C por 2 min + (35x) 92°C por 30 seg, 48°C por 1 min, 72°C por 1 min + (1x) 72°C por 5 min. A região Rot foi amplificada utilizando os iniciadores COX1-D2 5´ AATACTGCTTTTTTTGATCCTGTTGG 3´ e COX1-R1 5´ TGTTGRGGGAAAARGTTAAATT 3´. A reação de amplificação utilizou os mesmos reagentes (exceto os iniciadores) e concentrações descritas anteriormente para o marcador 28S. As condições de termociclagem foram (1x) 94°C por 5 min + (45x) 95°C por 1 seg, 41°C por 1 min, 72°C por 1:30 min + (1x) 72°C por 7 min.

Foi utilizada uma técnica de reconstituição parcial do DNA denominada polimerização reconstrutiva. Uma pre-amplificação numa reação de 15 µL de volume, ocorreu sob as seguintes condições de termociclagem: (1x) 94°C por 2 min

+ (35x) 92°C por 30 seg, 52°C por 30 seg, 72°C por 1 min + (1x) 72°C por 5 min; em solução contendo 1x Tampão de reação PCR (BioTools™), 0,7 unidades de DNA polimerase *Tth* (BioTools™), 3,7 mM de MgCl₂, 0,3 μM de dNTP, e aproximadamente 6 ng de DNA da amostra a ser amplificada. Desta reação sem iniciadores era tomada uma alicota de 1 μL e utilizada como DNA numa reação normal de PCR, como descritas anteriormente.

3.6.4 Purificação e sequenciamento

O produto da PCR foi verificado em eletroforese com gel de agarose 1,5% e quantificado. Cerca de 20 μL contendo ~50 ng de produto de PCR não-purificado, foi enviado para *Macrogen Inc.*, Coréia (<http://dna.macrogen.com/>), prestadora de serviços de biotecnologia, por meio de envio postal pela *Federal Express* (FedEx), seguindo todas as normas nacionais de envio de material biológico para o exterior.

3.7 **Filogenia molecular**

As análises e programas utilizados foram: alinhamento automático e manual com Clustalx 2.1 (LARKIN *et al.*, 2007) e Bioedit 5.0.1 (HALL, 1999), determinação do melhor modelo evolutivo com MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011) e DAMBE 5.2.43 (XIA; XIE, 2001), análise de PTP, máxima parcimônia (MP) e consenso de árvores com PAUP* (SWOFFORD, 2002), análise Bayesiana (BA) com MrBayes 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) e Geneious PRO 4.8.3 (DRUMMOND *et al.*, 2010), máxima verossimilhança (ML, do inglês *Maximum Likelihood*) e Bootstrap com Treefinder 2011 (JOBBER *et al.*, 2004), plotagem de caracteres morfológicos e impressão de árvores com McClade 4.08 (*op. cit.*), obtenção de sequencias disponíveis no Genbank com Geneious PRO 4.8.3 e análise de eletroferogramas com Vector NTI advance 10 (Invitrogen Corporation).

4 RESULTADOS

4.1 Filogenia Morfológica

4.1.1 Filogenia de espécies

Foram selecionadas 77 espécies (Tabela 6), destas: 73 Mycalina, duas Hadromerida (*Timea clippertoni* van Soest, Kaiser E van Syoc, 2011 e *Protosuberites denhartogi* van Soest e de Kluijver, 2003), duas Haplosclerida (*Niphates rowi* Ilan, Gugele van Soest, 2004 e *Oceanapia cancap* de Weerdte, van Soest, 1986) e uma Halichondria (*Halichondria cebimarensis* Carvalho e Hajdu, 2001), tratada como grupo externo.

O levantamento resultou em 7 caracteres (Tabela 6), dos quais dez são multiestados. O hábito responde por cinco caracteres, a arquitetura esquelética por 14, as megascleras por oito e as microscleras por 20; todos tratados como não ordenados.

As análises de máxima parcimônia (MP) retornaram seis árvores, com passos= 264, CI= 0,277, RC=0,176 e HI=0,724, a figura 11 representa o consenso de maioria das árvores. A análise Bayesiana (BA), após 10.000.000 gerações, figura 12, representa o consenso de maioria com, passos= 319, CI= 0,229, RC=0,121 e HI=0,771. A análise de *Neighbor Joining* (NJ) retornou uma árvore com passos= 252, CI= 0,29, RC=0,191 e HI=0,710 (Figura 13).

Caráteres e estados utilizados na análise filogenética de espécies da Subordem Mycalina.

1. Hábito:

0. Pedunculado
1. Incrustante (amorfo)
2. Esférico
3. Maciça (amorfo não incrustante)
4. Tubuliforme
5. Crescimento vertical sem geometria clara
6. Tubos, papilas, fistulas ou prolongamentos
7. incrustante sobre uma base calcárea
8. lobada

2. (hábito) pedunculado, corpo:

0. ausente
1. Esférico a hemisférico por corpo maciço (podendo ou não ter paliçada espicular, a região de tecido orgânico deve ter ao menos 30% do equivalente ao maior raio)
2. Esférico a hemisférico por corpo maciço (podendo ou não ter paliçada espicular, a região de tecido orgânico deve ter menos de 30% do equivalente ao maior raio)
3. ramoso, bi, tri ou tetra partido
4. Indiferenciado do pedúnculo
5. Formado por projeções perpendiculares ao pedúnculo (esférico a hemisférico), não paliçádico
6. Formado por projeções perpendiculares ao pedúnculo (esférico a hemisférico), paliçádico
7. Infundibuliforme

3. (hábito) pedúnculo:

0. com ramos laterais
1. sem ramos laterais (liso)

4. Carnivoria:

0. ausente
1. presente

5. Sistema aquífero:

0. ausente
1. presente

6. (megasclera) estílo, tilóstilo,subtilóstilo, mycaloestilo:

0. ausente
1. presente

7. **(megasclera) estílo, tilóstilo,subtilóstilo, mycaloestilo (categorias):**
 0. ausente
 1. uma
 2. duas
 3. três

8. **(megascleta) estrôngilo, substrôngilo:**
 0. ausente
 1. presente

9. **(megascleta) estrôngilo, substrôngilo (categorias):**
 0. ausente
 1. uma
 2. duas

10. **(megasclera) tiloto (categorias):**
 0. ausente
 1. uma

11. **(megasclera) exotilo (categorias):**
 0. ausente
 1. uma

12. **(megasclera) óxea (categorias):**
 0. ausente
 1. uma normal
 2. duas normais
 3. uma charutiforme
 4. anisóxea

13. **(microsclera) abissoquela (categorias):**
 0. ausente
 1. uma

14. **(mirosclera) anisoquela:**
 0. ausente
 1. presente

15. **(microsclera) anisoquela (categorias):**
 0. ausente
 1. uma
 2. duas
 3. três

16. **(microsclera) isoquela palmada (categorias):**
 0. ausente
 1. uma lisa
 2. duas lisas
 3. uma microespinada

17. **(microsclera) isoquela ancorada:**
0. ausente
1. presente
18. **(microsclera) isoquela ancorada (categorias):**
0. ausente
1. uma
2. duas
19. **(microsclera) quela com fimbria interna:**
0. ausente
1. presente
20. **(microsclera) quela com alas completamente fundidas:**
0. ausente
1. presente
21. **(microsclera) quela:**
0. ausente
1. presente
22. **(microsclera) placoquela:**
0. ausente
1. presente
23. **(microsclera) tetrapocilla:**
0. ausente
1. presente
24. **(microsclera) disquela:**
0. ausente
1. presente
25. **(microsclera) troquirrábido (categoria):**
0. ausente
1. presente
26. **(microsclera) sigma:**
0. ausente
1. presente
27. **(microsclera) sigma (categorias):**
0. ausente
1. uma categoria
2. duas categorias
3. três categorias
28. **(microsclera) sigmancistra:**
0. ausente
1. presente

- 29. (microsclera) sigmancistra (categorias):**
0. ausente
1. uma categoria
2. duas categorias
- 30. (microsclera) certancistra:**
0. ausente
1. presente
- 31. (microsclera) diancistra:**
0. ausente
1. presente
- 32. (microsclera) espinorrábido:**
0. ausente
1. presente
- 33. (esqueleto) ectossomal tangencial:**
0. ausente
1. presente
- 34. (esqueleto) ectossomalparatangencial:**
0. ausente
1. presente
- 35. (esqueleto) ectossomal perpendicular:**
0. ausente
1. presente
- 36. (esqueleto) ectossomal confuso:**
0. ausente
1. presente
- 37. (esqueleto) ectossomal reticulado:**
0. ausente
1. presente
- 38. (esqueleto) ectossomal exclusivamente de microsclera:**
0. ausente
1. presente
- 39. (esqueleto) ectossomal isotropico:**
0. ausente
1. presente
- 40. (esqueleto) coanossomal plumoso:**
0. ausente
1. presente

- 41. (esqueleto) coanossomal plumoreticulado:**
0. ausente
1. presente
- 42. (esqueleto) coanossomal reticulado:**
0. ausente
1. presente
- 43. (esqueleto) coanossomal confuso:**
0. ausente
1. presente
- 44. (esqueleto) coanossomal axial comprimido:**
0. ausente
1. presente
- 45. (esqueleto) coanossomal isodictial:**
0. ausente
1. presente
- 46. (esqueleto) coanossomal radial:**
0. ausente
1. presente
- 47. (esqueleto) coanossomal feixes ascendentes:**
0. ausente
1. presente

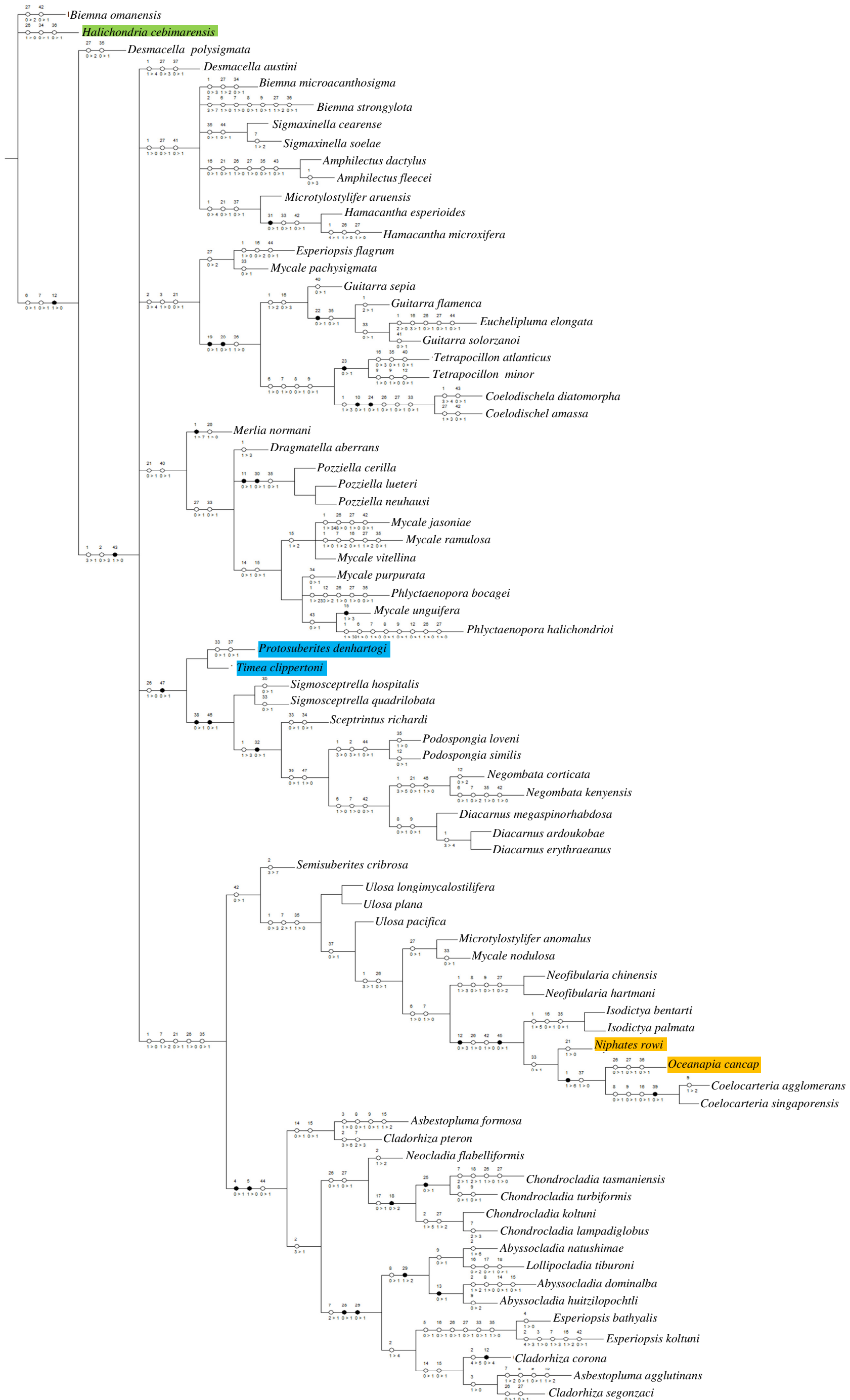


Figura 11 - Hipótese filogenética de espécies de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via máxima parcimônia (MP). Os números acima representam o número do caráter e abaixo a transformação do estado do caráter. (o) representa homoplasias e (*) sinapomorfias. A espécie em verde pertencem à ordem Halichondrida, em azul à ordem Hadromerida e em laranja à ordem Haplosclerida.

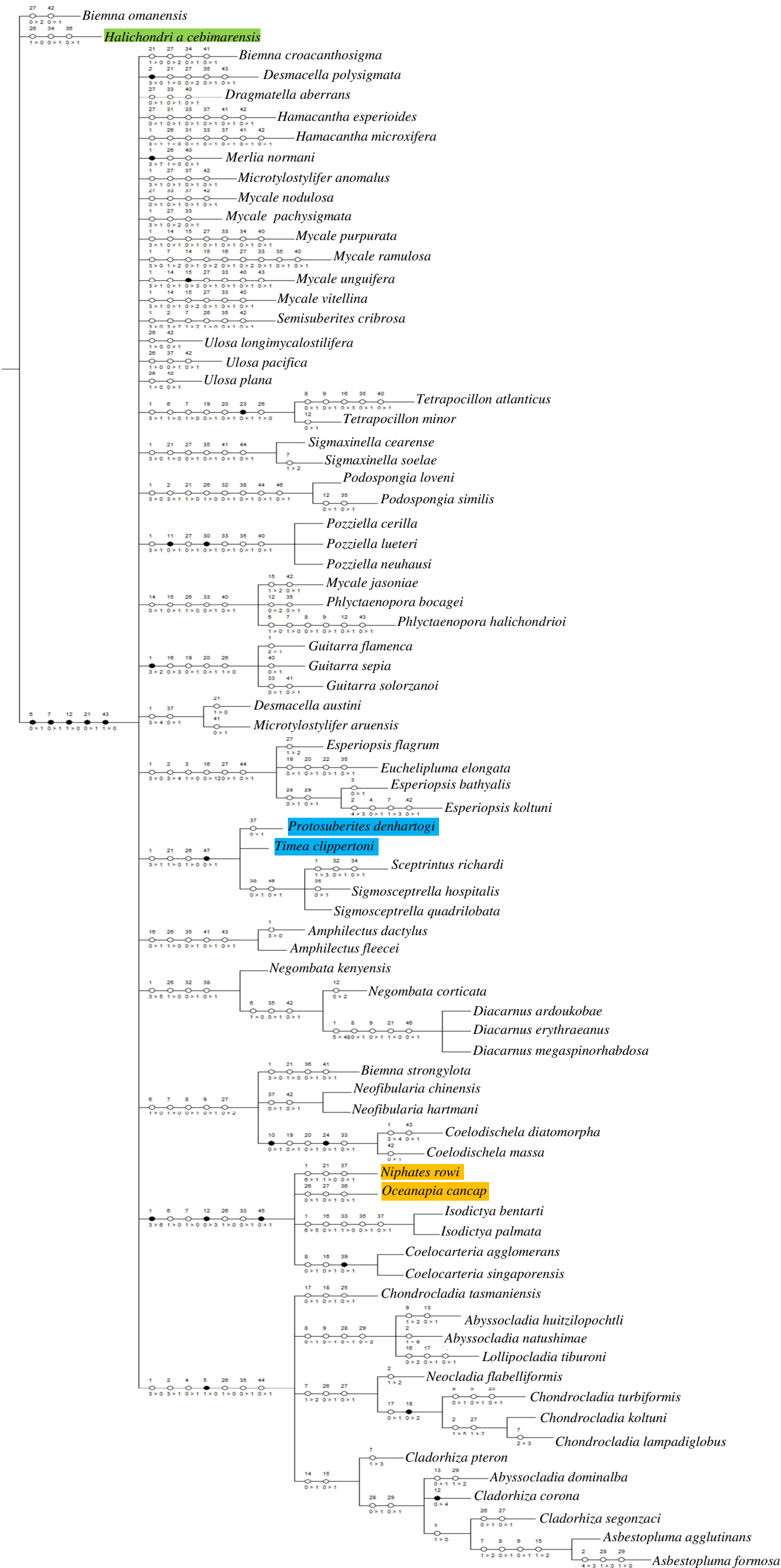


Figura 12 - Hipótese filogenética de espécies de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via análise Bayesiana (BA). Os números acima representam o número do caráter e abaixo a transformação do estado do caráter. (o) representa homoplasias e (●) sinapomorfias. A espécie em verde pertencem à ordem Halichondrida, em azul à ordem Hadromerida e em laranja à ordem Haplosclerida.

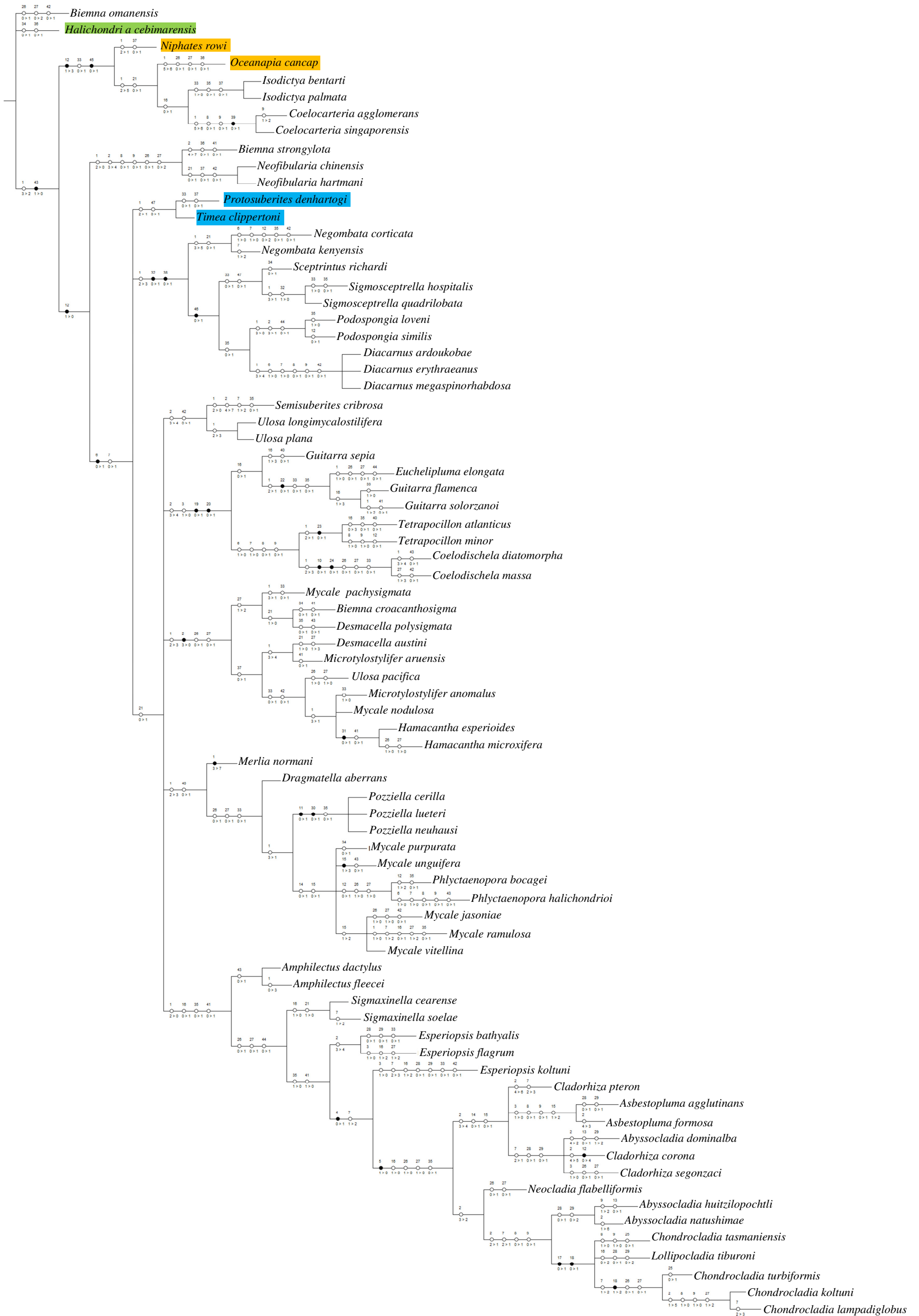


Figura 13 - Hipótese filogenética de espécies de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via *Neighbor Joining* (NJ). Os números acima representam o número do caráter e abaixo a transformação do estado do caráter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias. A espécie em verde pertencem à ordem Halichondrida, em azul à ordem Hadromerida e em laranja à ordem Haplosclerida.

4.1.2 Filogenia de gêneros

Foram selecionados 33 gêneros (Tabela 7), 23 Mycalina, duas Hadromerida (*Suberites* e *Tethya*) e duas Haplosclerida (*Niphates* e *Pachypellina*) e uma Halichondrida (*Halichondria*), tratada como grupo externo.

Foram selecionados 23 caracteres (Tabela 7), três referentes ao hábito, dois à arquitetura esquelética, cinco a megasclera e 13 de microsclera, todos tratados como não ordenados.

As análises de máxima parcimônia (MP) retornaram 11 árvores, com passos= 94, CI= 0,436, RC= 0,265 e HI= 0,564, a figura 14 representa o consenso *strictu* das árvores. A análise bayesiana (BA), após 5.000.000 gerações, resultou num consenso *strictu* com passos= 124, CI= 0,331, RC=127 e HI=0,669 (Figura 15). A análise de *Neighbor Joining* (NJ) retornou uma árvore com passos= 92, CI= 0,446, RC=277 e HI=0,554(Figura 16).

Caráteres e estados utilizados na análise filogenética de gêneros de Mycalina.

- | | |
|--|--|
| <p>1. Hábito:
 0. incrustante
 1. massiva
 2. pedunculada</p> | <p>2. tangencial
 3. perpendicular
 4. exclusivamente com microscleras
 5. paratangencial
 6. radial</p> |
| <p>2. Carnivoria:
 0. ausente
 1. presente</p> | <p>6. (megasclera) tilostilo e subtilóstilo:
 0. ausente
 1. presente</p> |
| <p>3. Sistema aquifero:
 0. ausente
 1. presente</p> | <p>7. (megasclera) estilo:
 0. ausente
 1. presente</p> |
| <p>4. (esqueleto) coanossomal:
 0. halichondroide
 1. plumoso
 2. plumoreticulado
 3. reticulado
 4. reticulado isodictial
 5. axial
 6. radial</p> | <p>8. (megasclera) tiloto:
 0. ausente
 1. presente</p> |
| <p>5. (esqueleto) ectossomico:
 0. ausente
 1. reticulado</p> | <p>9. (megasclera) estrôngilo e subestrôngilo:
 0. ausente
 1. presente</p> |
| | <p>10. (megasclera) óxea:</p> |

- 0. ausente
 - 1. presente simples
 - 2. presente charutiforme
- 11. (microsclera) quela palmada:**
- 0. ausente
 - 1. presente
 - 2. espinada
- 12. (microsclera) quela ancorada:**
- 0. ausente
 - 1. presente
- 13. (microsclera) quela com fimbria interna:**
- 0. ausente
 - 1. presente
- 14. (microsclera) abissoquela:**
- 0. ausente
 - 1. presente
- 15. (microsclera) sigmancistra:**
- 0. ausente
 - 1. presente
- 16. (microsclera) diancistra e derivados:**
- 0. ausente
 - 1. presente
- 17. (microsclera) clavidiscus:**
- 0. ausente
 - 1. presente
- 18. (microsclera) placoquela e derivados:**
- 0. ausente
 - 1. placoquela
 - 2. discoquela
 - 3. tetrapocila
- 19. (microsclera) espinorrábido:**
- 0. ausente
 - 1. presente
- 20. (microsclera) sigma:**
- 0. ausente
 - 1. presente
- 21. (microsclera) microrrábido:**
- 0. ausente
 - 1. micróxea
 - 2. microestilo
 - 3. microestrôngilo
 - 4. troquirrábido
- 22. (microsclera) ráfide:**
- 0. ausente
 - 1. presente
- 23. (microsclera) comma:**
- 0. ausente
 - 1. presente lisa
 - 2. presente rugosa

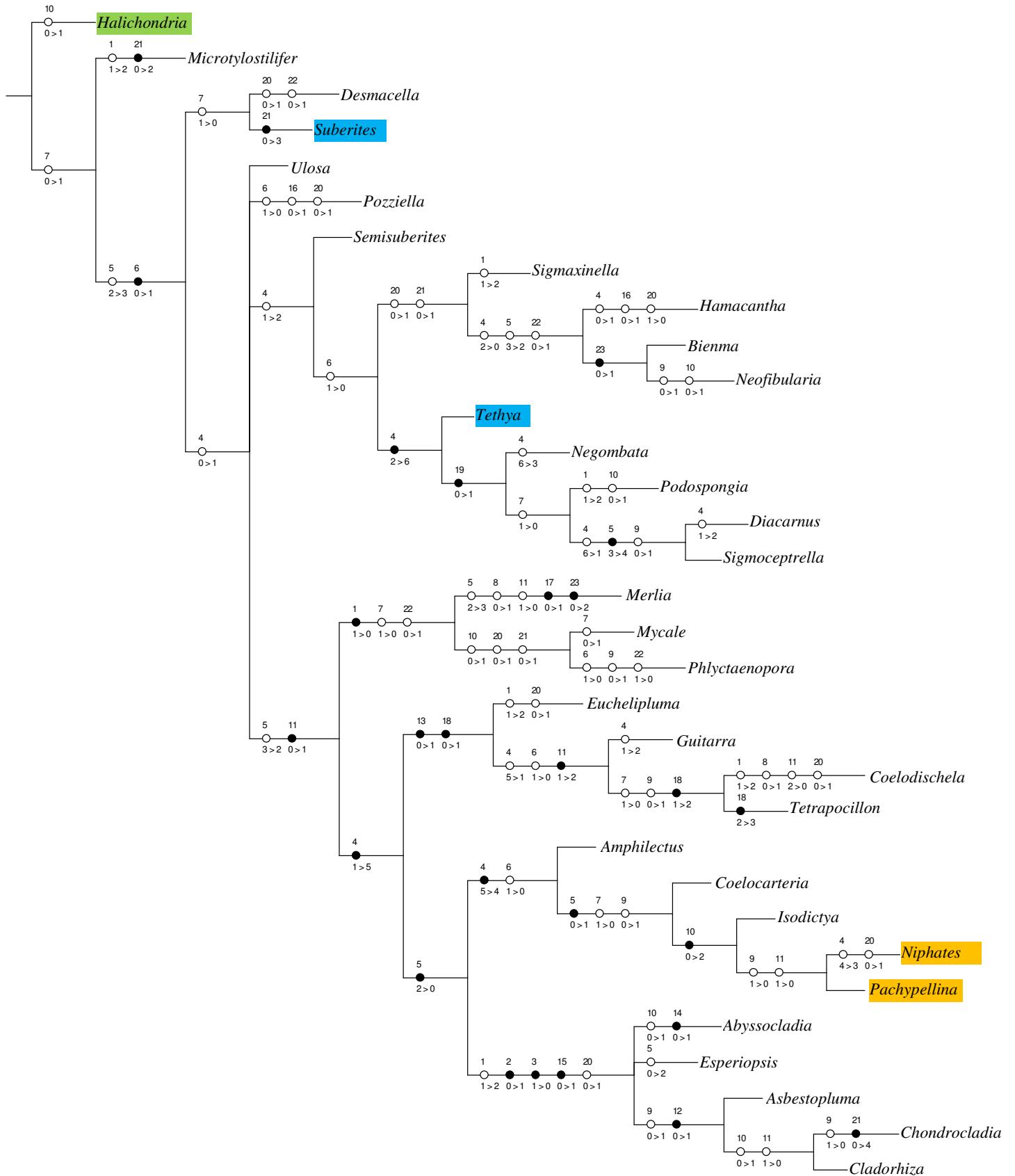


Figura 14 - Hipótese filogenética do gêneros de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via máxima parcimônia (MP). Os números acima representam o número do caráter e abaixo a transformação do estado do caráter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias. O gênero em verde pertencem à ordem Halichondrida, em azul à ordem Hadromerida e em laranja à ordem Haplosclerida.

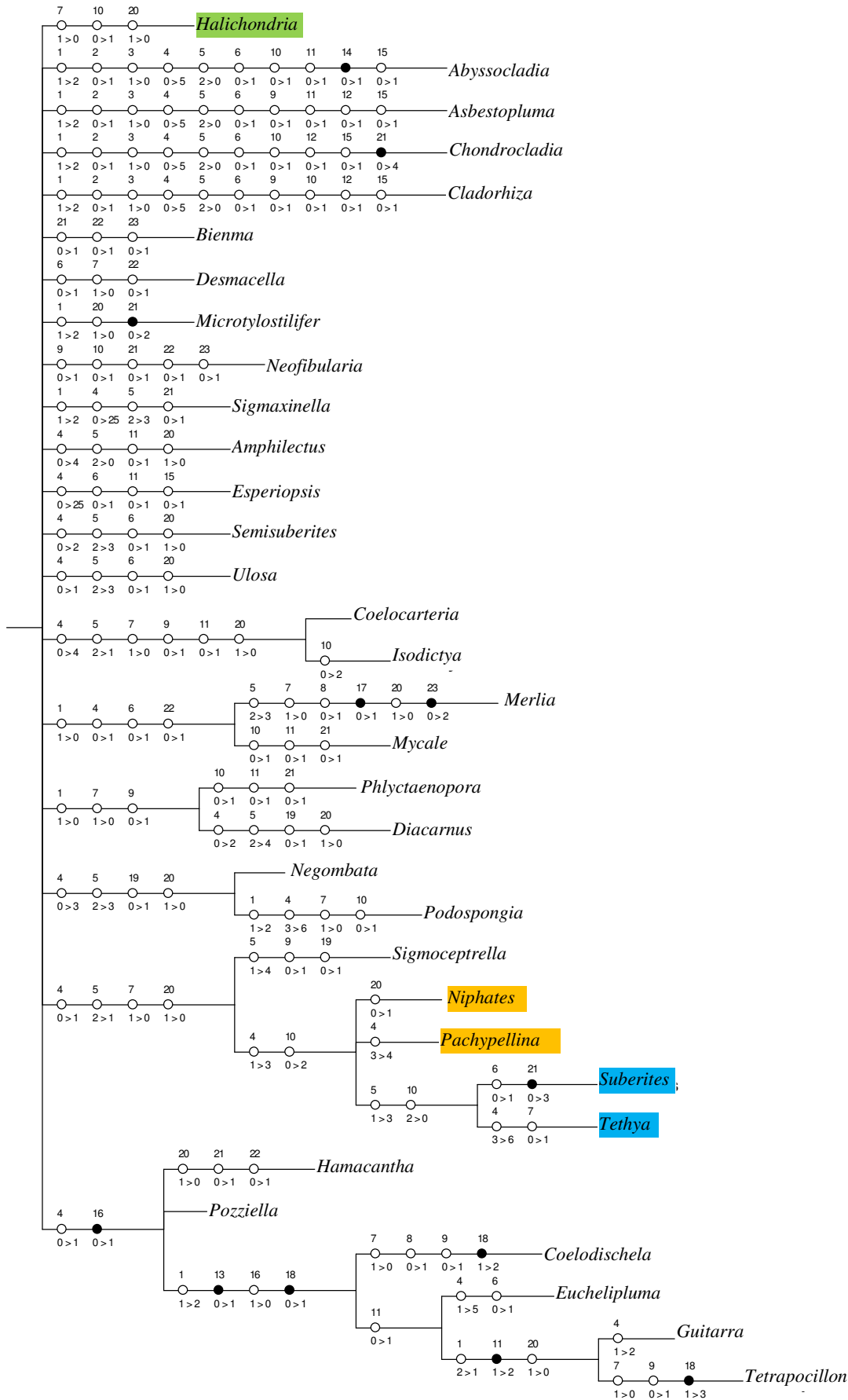


Figura 15 - Hipótese filogenética do gêneros de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via análise bayesiana (BA). Os números acima representam o número do caráter e abaixo uma transformação do estado do caráter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias. O gênero em verde pertencem à ordem Halichondrida, em azul à ordem Hadromerida e em laranja à ordem Haplosclerida.

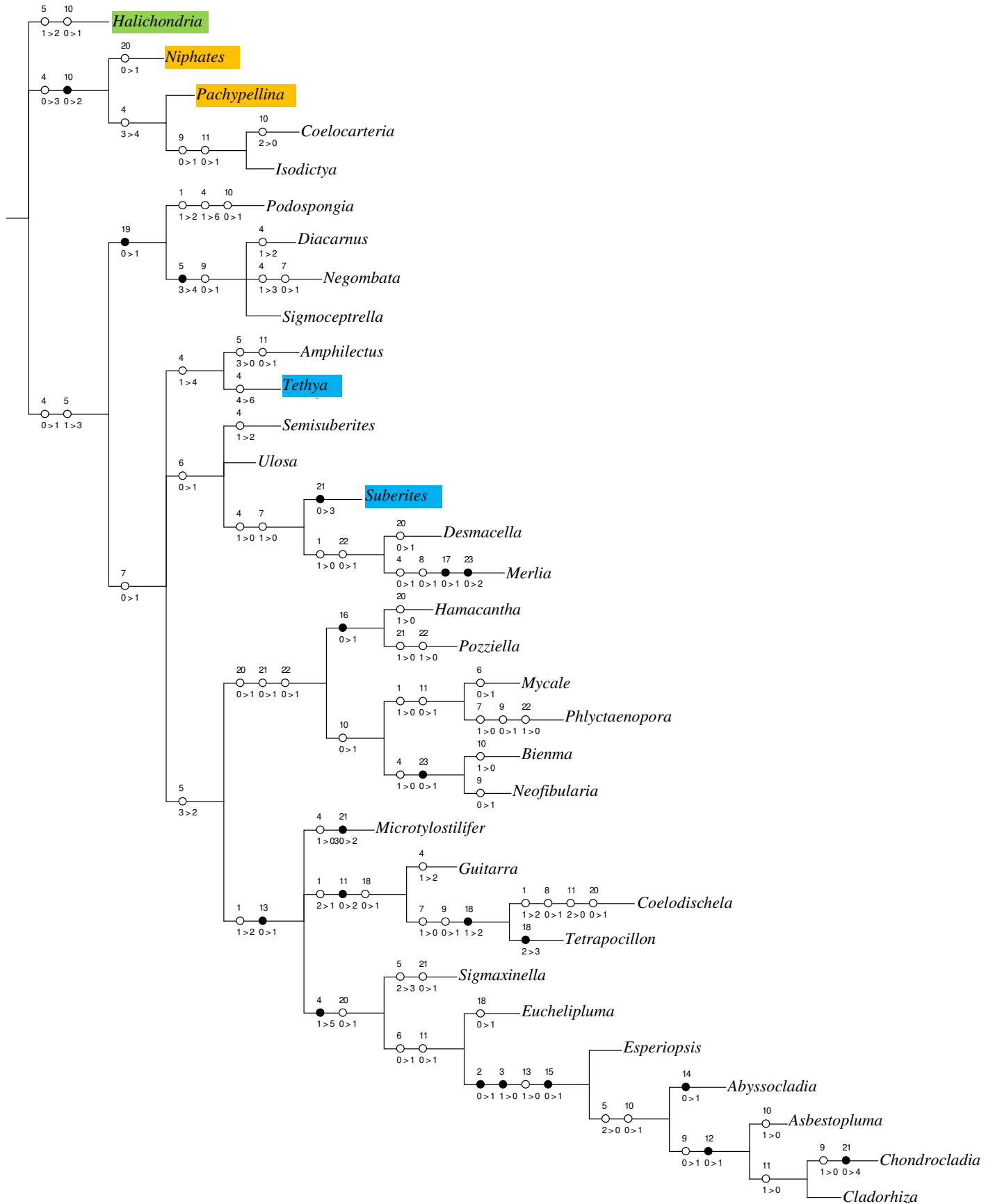


Figura 16 - Hipótese filogenética do gêneros de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via *Neighbor Joining* (NJ). Os números acima representam o número do caráter e abaixo a transformação do estado do caráter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias. O gênero em verde pertencem à ordem Halichondrida, em azul à ordem Hadromerida e em laranja à ordem Haplosclerida.

4.1.3 Filogenia de famílias

Foram selecionadas 14 famílias (Tabela 8), destas nove Mycalina, uma Suberitidae (Hadromerida), três Haplosclerida (Phloeodictyidae, Niphatidae e Chalinidae), uma Astrophorida (Geodiidae) tratadas como grupo externo.

O levantamento dos caracteres resultaram em 14 caracteres (Tabela 8). O hábito responde por cinco caracteres, a arquitetura esquelética por três, as megascleras por dois e as microscleras por nove; todos tratados como caracteres não ordenados.

As análises de máxima parcimônia (MP) retornou três árvores, com passos= 32, CI= 0,78, RC= 0,59 e HI= 0,22, a figura 17 representa o consenso de maioria das árvores. A análise bayesiana (BA), após 5.000.000 gerações, encontrou uma árvore com passos= 46, CI= 0,565, RC= 0,147 e HI= 0,435(Figura 18). A análise de *Neighbor Joining* (NJ) retornou uma árvore com passos= 34, CI= 0,74, RC= 0,5 e HI= 0,26 (Figura 19).

Tabela 8 - Matriz utilizada na análise filogenética das famílias da Subordem Mycalina. Nas colunas estão os números dos caracteres; nas linhas espécies e presença (1), ausência (0) ou estados dos caracteres (2 ou mais).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Cladorhizidae	1+2	0	0	0	0	1+2	1	1	5	2	0	1	0	0
Desmacellidae	0	1+2	1+2+3	1	0	0	0	0	0+1+3+5	0+1	0	1	0	0
Esperiopsidae	1	0	0	0	0	0	0	1	0+1+2+7	3	0	1	0	0
Guitarridae	1	0	0	0	0	0	0	1	3+5	0+1+3	0	2	1+2+3+4	0
Hamacanthidae	0	0	0	0	0	0	0	1	3+4	0	0	3	0	0
Isodictyidae	1	0	0	0	1	0	0	0	2+7	0+4	0	0	0	1
Merliidae	0	2	1	0	0	0	0	0	4	0	1	4	0	0
Mycalidae	1	1+2	0	0	2	0	0	1	0+1+3+4	0+1	0	1	0	0
Podospongiidae	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Suberitidae	0	0	0	0	1	0	0	0	4+8	8	0	0	0	0
Phloeodictyidae	0	0	0	0	1	0	0	0	2+6	0+4+6	0	1	0	1
Niphatidae	0	1	0	0	0	0	0	0	2+6	0+4+6	0	1	0	1
Chalinidae	0	1+2	0	0	1	0	0	0	2+7	0+5	0	1	0	1
Geodiidae	0	1	0	0	0	0	0	0	8	6	0	0	0	0

Lista de caracteres utilizados na filogenia de famílias de Mycalina.

1. Microsclera sigmoide, quela:

- 0. ausente
- 1. palmada
- 2. abissoquela

2. Microsclera monaxonida:

- 0. ausente
- 1. micróxea
- 2. ráfide

3. Microsclera monaxonida commata:

- 0. ausente
- 1. normal
- 2. microespinada
- 3. rugosa

4. Microsclera monaxonida tricodragma:

- 0. ausente
- 1. presente

5. Microsclera monaxonida toxa:

- 0. ausente
- 1. normal
- 2. espinada

6. Microsclera monaxonida microsubtilóstilo:

- 0. ausente
- 1. presente
- 2. microespinado

7. Microsclera monaxonida forceps:

- 0. ausente
- 1. presente

8. Megasclera monaxonida micaloestilo:

- 0. ausente
- 1. presente

9. Esqueleto coanossomal:

- 0. plumoso
- 1. plumoreticulado
- 2. isodictial
- 3. reticulação irregular
- 4. halicondroide
- 5. axial
- 6. Feixes multiespiculares tangenciais
- 7. Feixes multiespiculares perpendiculares
- 8. radial

10. Esqueleto ectossomal:

- 0. tangencial
- 1. umbeliforme
- 2. formado por microscleras
- 3. ausente
- 4. paratangencial
- 5. hexagonal
- 6. multicamada
- 7. megascleras embebidas em fibras
- 8. Paliçada de megasclera

11. Esqueleto basal calcáreo:

- 0. ausente
- 1. presente

12. Sigmancistra-derivados:

- 0. ausente
- 1. sigma
- 2. sigmancistra
- 3. certancistra/diancistra
- 4. clavidisco

13. Placoquela-derivados:

- 0. ausente
- 1. placoquela
- 2. biplacoquela
- 3. discoquela
- 4. tetrapocila

14. Megascleras charutiformes:

- 0. ausente
- 1. presente

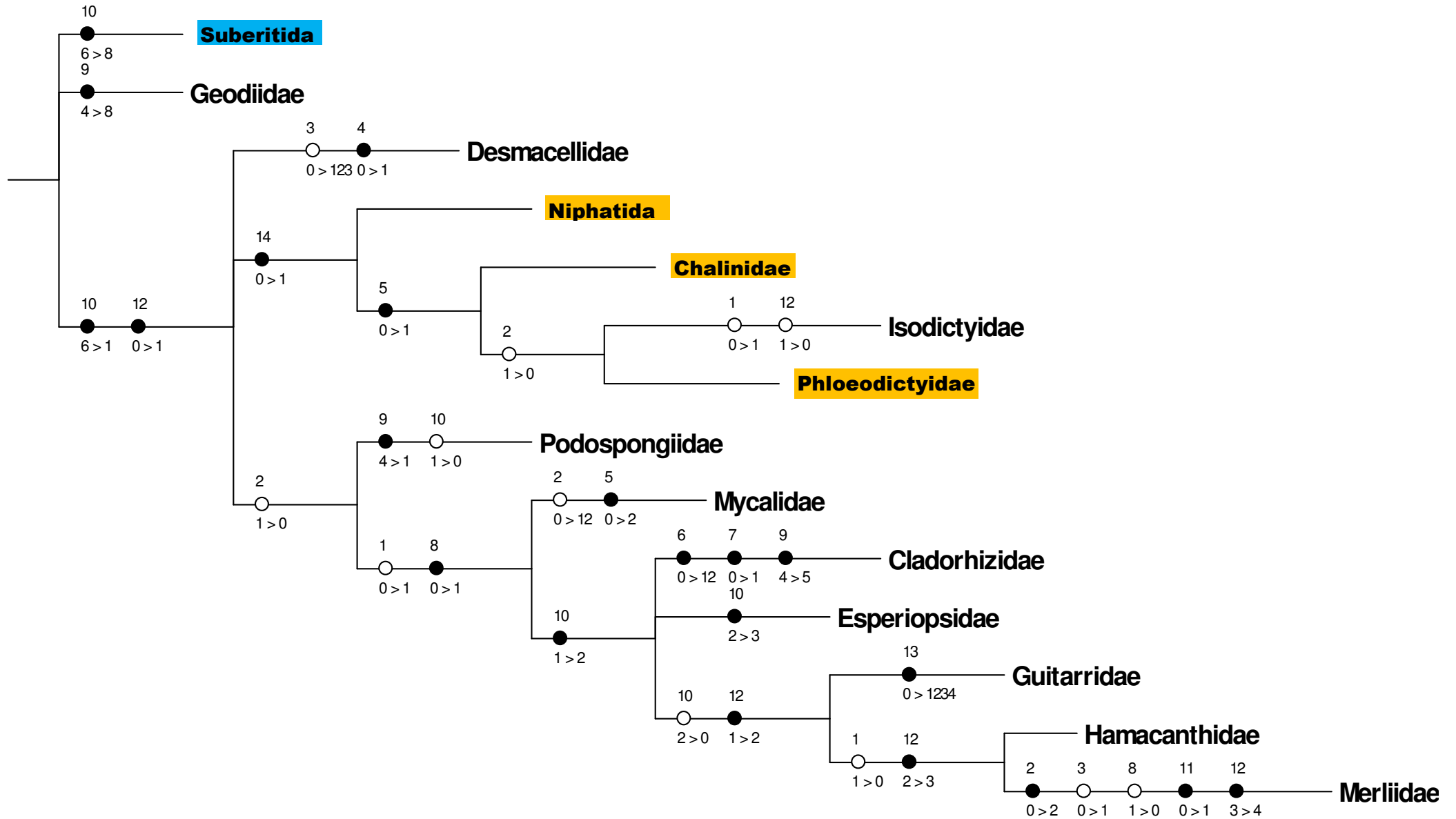


Figura 17 - Hipótese filogenética das famílias de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via máxima parcimônia (MP). Os números acima representam o número do caráter e abaixo a transformação do estado do caráter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias. A família em azul pertencem à ordem Hadromerida e em laranja à ordem Haplosclerida.

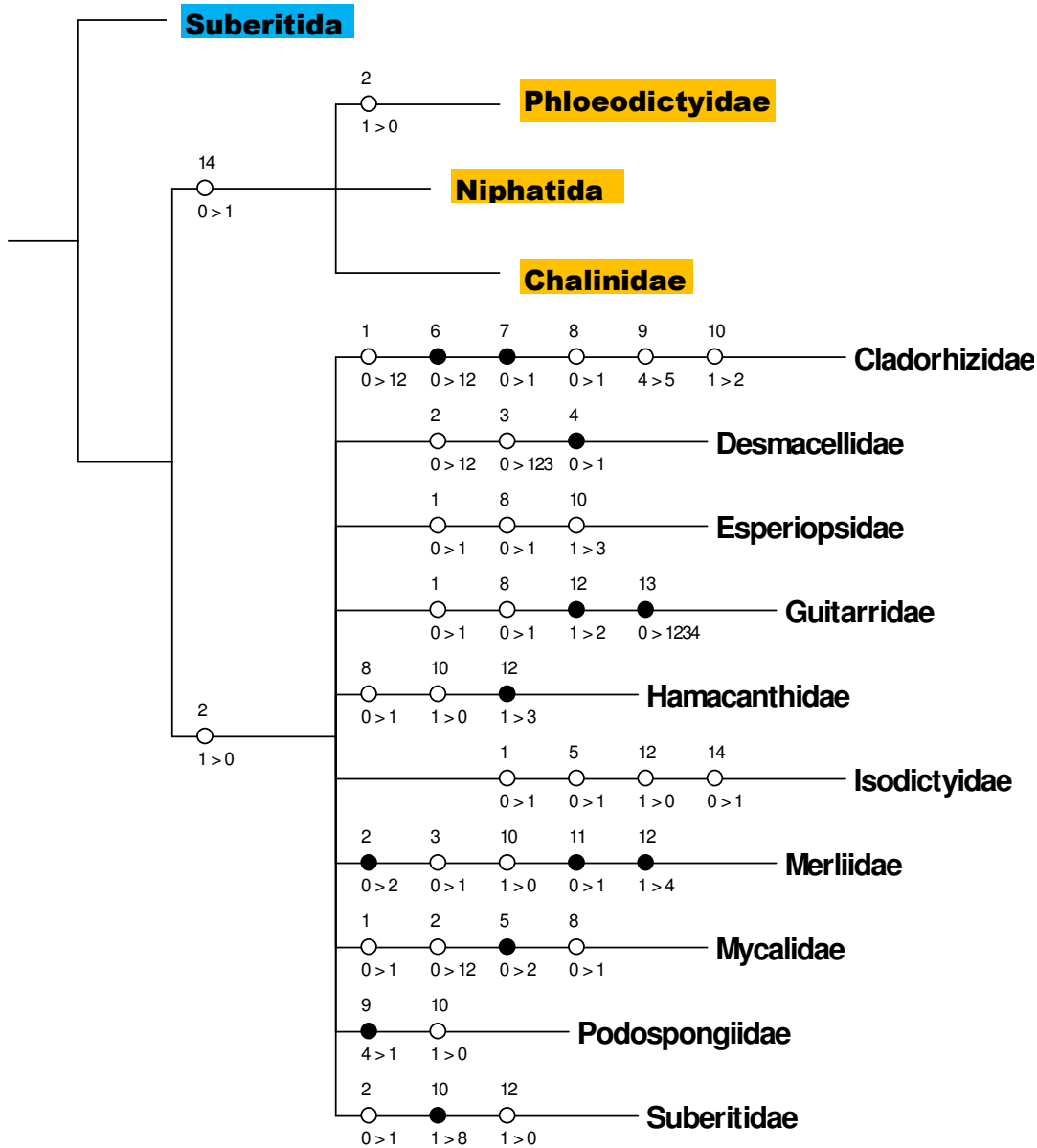


Figura 18 - Hipótese filogenética das famílias de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via análise bayesiana (BA). Os números acima representam o número do caráter e abaixo a transformação do estado do caráter. (○) representa homoplasias e (●) sinapomorfias. A família em azul pertecem à ordem Hadromerida e em laranja à ordem Haplosclerida.

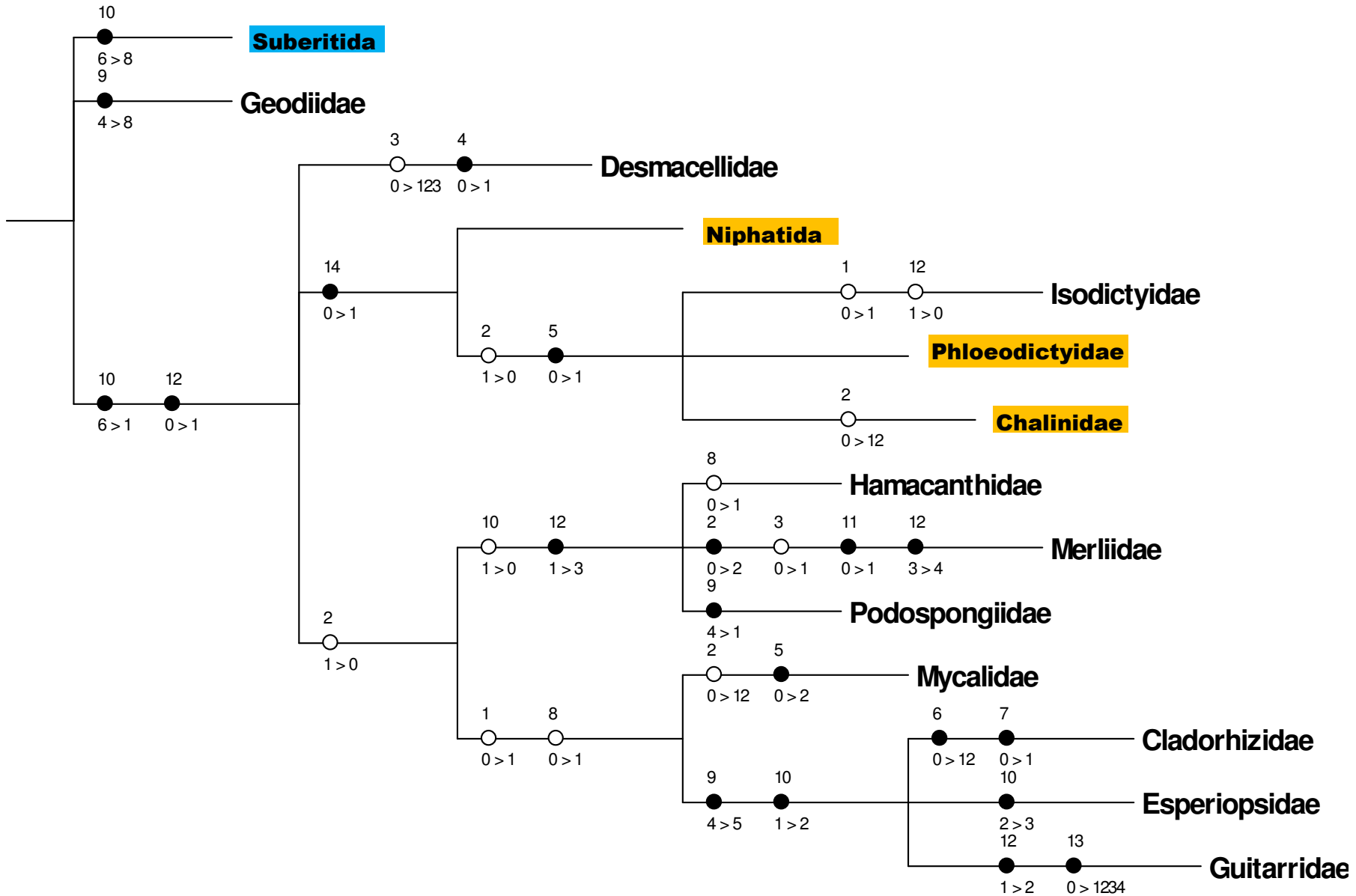


Figura 19 - Hipótese filogenética das famílias de Mycalina, utilizando dados morfológicos, gerado via *Neighbor Joining* (NJ). Os números acima representam o número do caráter e abaixo a transformação do estado do caráter. (o) representa homoplasias e (•) sinapomorfias. A família em azul pertencem à ordem Hadromerida e em laranja à ordem Haplosclerida.

4.2 Estudo de marcadores moleculares

Foram realizadas mais de 300 extrações de DNA genômico total, por diferentes métodos e menos de 10% do total foi amplificado com sucesso; destes nenhum com mais de cinco anos de preservação em coleções zoológicas. Em geral a taxa de degradação era bem alta e muito variável entre as amostras (Figura 20). A reamplificação (PCRs em sequencia, onde o produto da primeira reação é a fita molde para a segunda reação de PCR) dos produtos de PCR de algumas amostras foi tentado, obtendo-se resultados positivos. Entretanto, quando sequenciados, o resultado, geralmente, era ruim; gerando eletroferogramas confusos (Figura 21), com muitas sobreposições de picos e muitas bases incompatíveis entre as sequencias do sentido senso (5'-3') e antisenso (3'-5'), em alguns casos elas nem podiam ser agregadas haja vista a diferença entre elas.

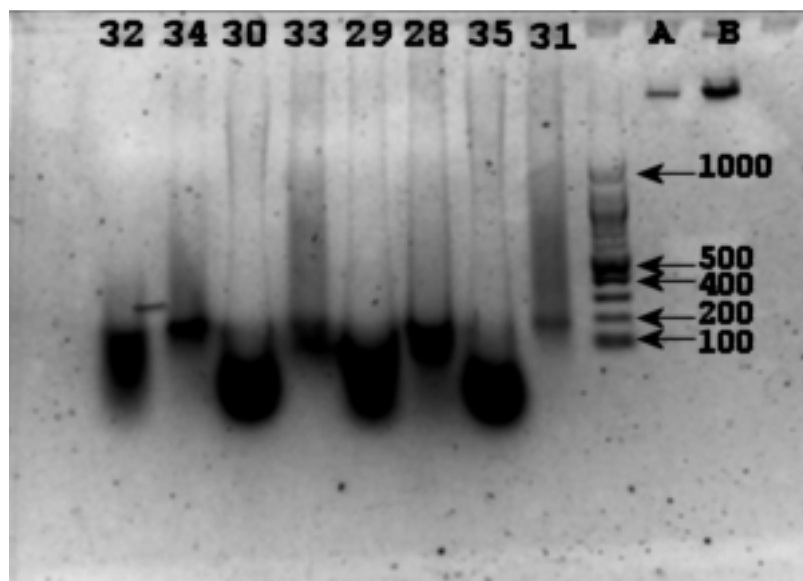


Figura 20 – Eletroforese em gel de 0,8% de agarose mostrando a extração de DNA genômico total de oito amostras, não tratadas com RNase. Amostras 31-33 coletadas em 2002; 29-30,35 coletadas em 2005. A = DNA de fago λ com 10 ng, B = DNA de fago λ com 50 ng. Os números com setas indicam o comprimento em pares de bases das bandas.

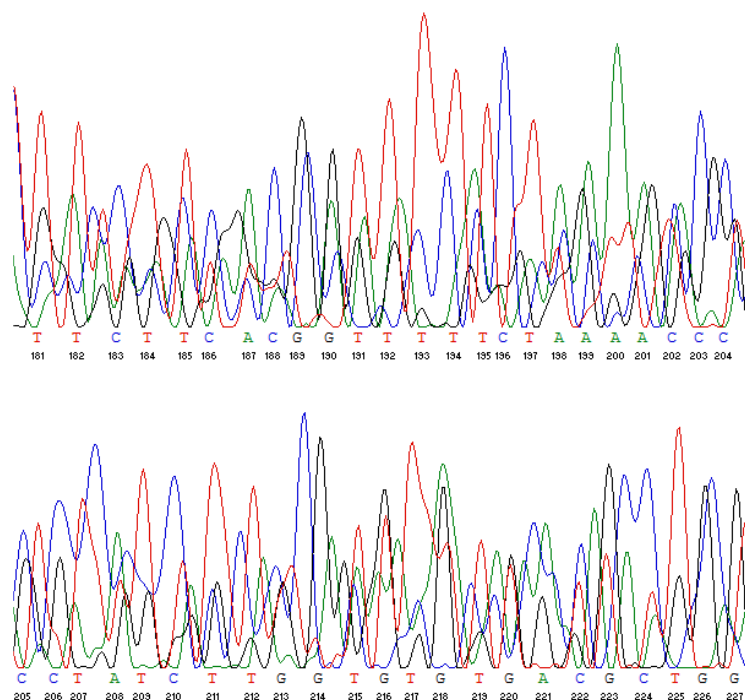


Figura 21 – Região central do eletroferograma da sequência em sentido senso da amostra ID 40 coletada em 2006. As cores correspondem as seguintes bases do DNA: preto, guanina(G); azul, citosina(C); vermelho, timina(T); e verde, adenina(A).

4.3 Filogenia Molecular

Foram selecionadas 25 táxons (Tabela 9), destas 18 Mycalina, três Poecilosclerida (não Mycalina), uma Hadromerida, duas Haplosclerida e uma Dictyoceratida tratadas como grupo externo.

O alinhamento das sequências resultou em 552 caracteres. Foram mantidas as posições cuja composição tivesse menos de 10% de gaps (deleção parcial=90%). As análises foram feitas utilizando o modelo T92 (Tamura 3 parâmetros) e a consistência dos ramos calculadas com 1000 réplicas de *bootstrap*.

As análises de máxima parcimônia (MP) retornaram 48 árvores, com passos= 462, CI= 0,62 e RI= 0,798, a figura 22 representa o consenso inferido a partir de 1000 réplica de *bootstrap*. A análise bayesiana (BA), após 5.000.0000 gerações, está na figura 23; *Neighbor Joining* (NJ) retornou uma árvore, figura 24; máxima verossimilhança (ML), figura 25 e evolução mínima (ME), figura 26.

Tabela 9 - Táxons utilizados na filogenia de espécies de Mycalina; os sem número no GenBank são sequências geradas neste trabalho.

Táxons	Número no GenBank	Ordem	Subordem	Família
<i>Haliclona (Haliclona) oculata</i> (Pallas, 1766)	HQ379326	Haplosclerida	Haplosclerina	Haliclona
<i>Xestospongiacaminata</i> Pulitzer-Finali, 1986	AF441348	Haplosclerida	Petrosina	Petrosiidae
<i>Clathria (Clathria) barleei</i> (Bowerbank, 1866)	HQ393897	Poecilosclerida	Microcionina	Microcionidae
<i>Biemnavariantia</i> (Bowerbank, 1858)	HQ379292	Poecilosclerida	Mycalina	Desmacellida
<i>Biemna</i> sp.1		Poecilosclerida	Mycalina	Desmacellidae
<i>Biemna</i> sp.2		Poecilosclerida	Mycalina	Desmacellidae
<i>Biemna</i> sp.3		Poecilosclerida	Mycalina	Desmacellidae
<i>Biemna</i> sp.4		Poecilosclerida	Mycalina	Desmacellidae
<i>Desmacellaannexa</i> Schmidt, 1870	HQ379293	Poecilosclerida	Mycalina	Desmacellidae
<i>Amphilectus</i> sp.		Poecilosclerida	Mycalina	Esperiopsidae
<i>Ulosa stuposa</i> 1 (Esper, 1794)		Poecilosclerida	Mycalina	Esperiopsidae
<i>Ulosa stuposa</i> 2 (Esper, 1794)		Poecilosclerida	Mycalina	Esperiopsidae
<i>Amphilectusfucorum</i> (Esper, 1794)	HQ379294	Poecilosclerida	Mycalina	Esperiopsidae
<i>Amphilectusamericanus</i> (Ridley &Dendy, 1887)		Poecilosclerida	Mycalina	Esperiopsidae
<i>Esperiopsis</i> sp.		Poecilosclerida	Mycalina	Esperiopsidae
<i>Hamacantha (Vomerula) falcula</i> (Bowerbank, 1874)		Poecilosclerida	Mycalina	Hamacanthidae
<i>Mycale (Aegogropila) rotalis</i> (Bowerbank, 1874)	HQ379296	Poecilosclerida	Mycalina	Mycalidae
<i>Mycale (Naviculina) flagellifera</i> Vacelet&Vasseur, 1971	AY319321	Poecilosclerida	Mycalina	Mycalidae
<i>Diacarnusspinipoculum</i> (Carter, 1879)	AY561881	Poecilosclerida	Mycalina	Podospongiidae
<i>Negombatakenyensis</i> (Pulitzer-Finali, 1993)		Poecilosclerida	Mycalina	Podospongiidae
<i>Sigmoceptrella</i> sp.		Poecilosclerida	Mycalina	Podospongiidae
<i>Hemimycalecolumella</i> (Bowerbank, 1874)	HQ379300	Poecilosclerida	Myxillina	Hymedesmiidae
<i>Myxilla (Styloptilon) ancorata</i> (Cabiocch, 1968)	HQ379304	Poecilosclerida	Myxillina	Myxillidae
<i>Ircinia ramosa</i> (Keller, 1889)	EF507818	Dictyoceratida		Irciniidae
<i>Polymastiapachymastia</i> de Laubenfels, 1932	AY561924	Hadromerida		Polymastiidae

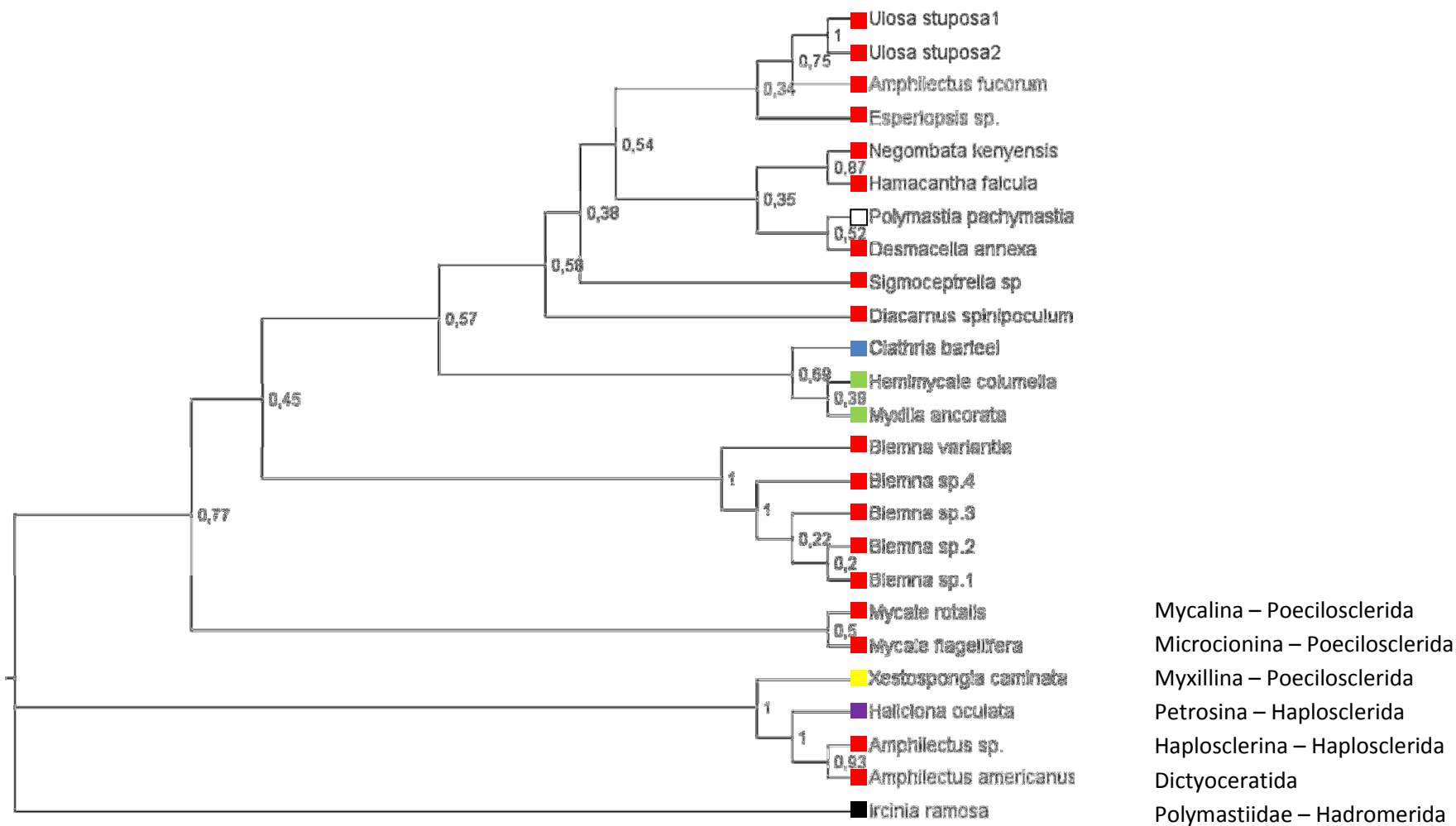


Figura 22 - Hipótese filogenética gerada a partir de dados moleculares analisados via análise de máxima parcimônia (MP). Valores de bootstrap (1000 replicações) na parte interna dos ramos.

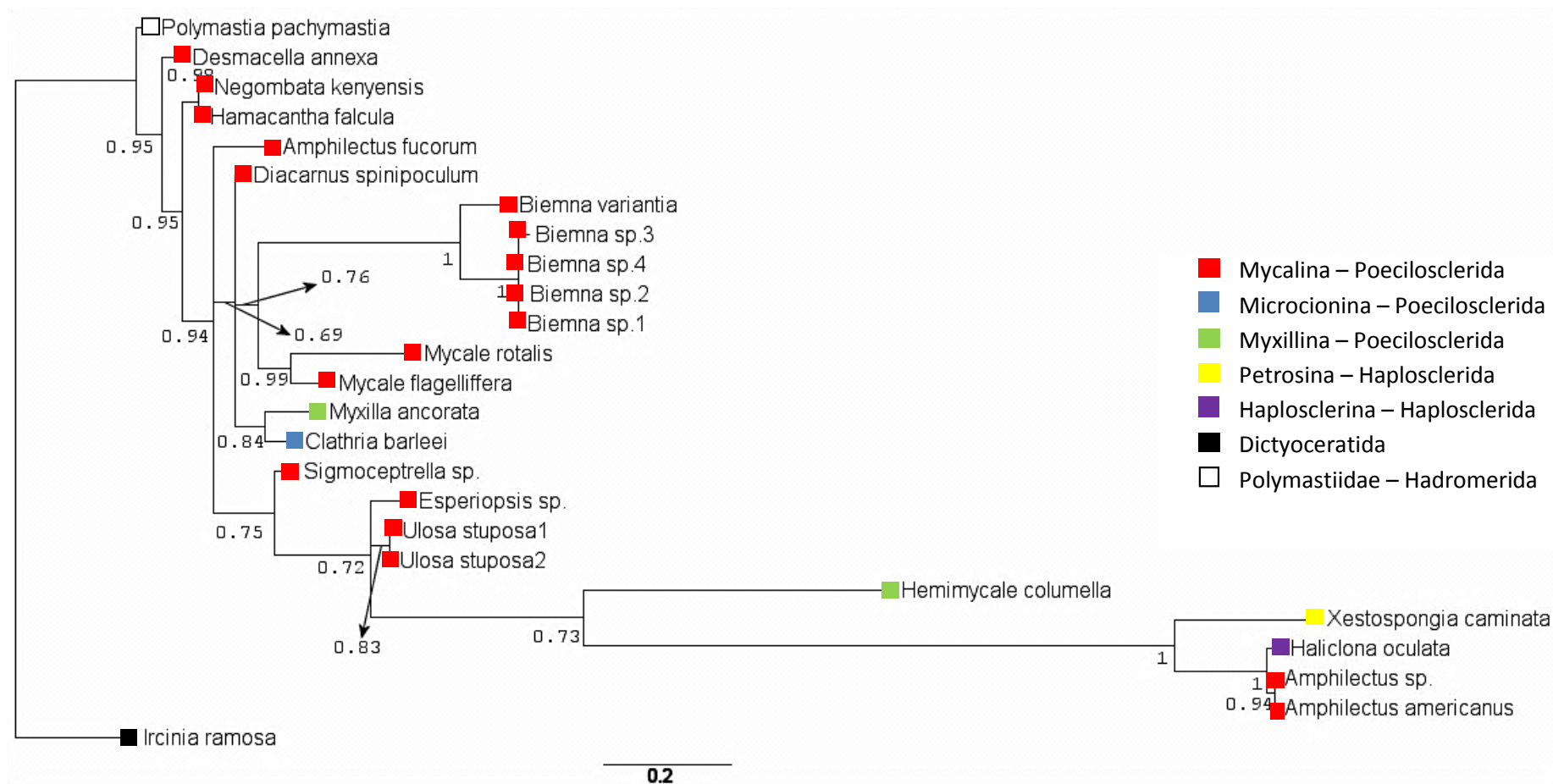


Figura 23 - Hipótese filogenética gerada a partir de dados moleculares analisados via análise de bayesiana (BA). Valores de probabilidade posterior (5×10^6 gerações) apresentada nos ramos.

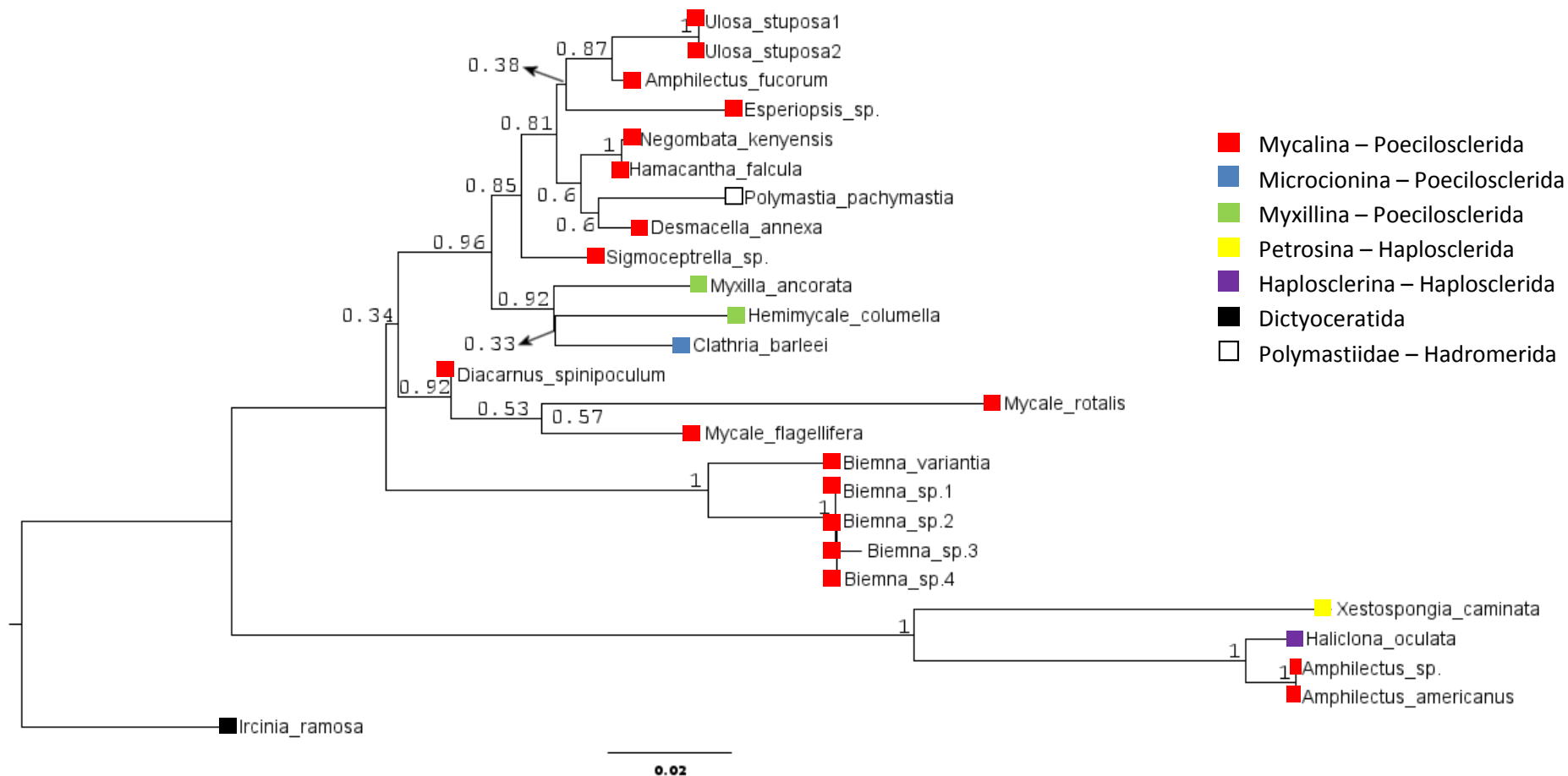


Figura 24 - Hipótese filogenética gerada a partir de dados moleculares analisados via análise de *Neighbor Joining* (NJ). Valores de bootstrap (1000 replicações) apresentada nos ramos.

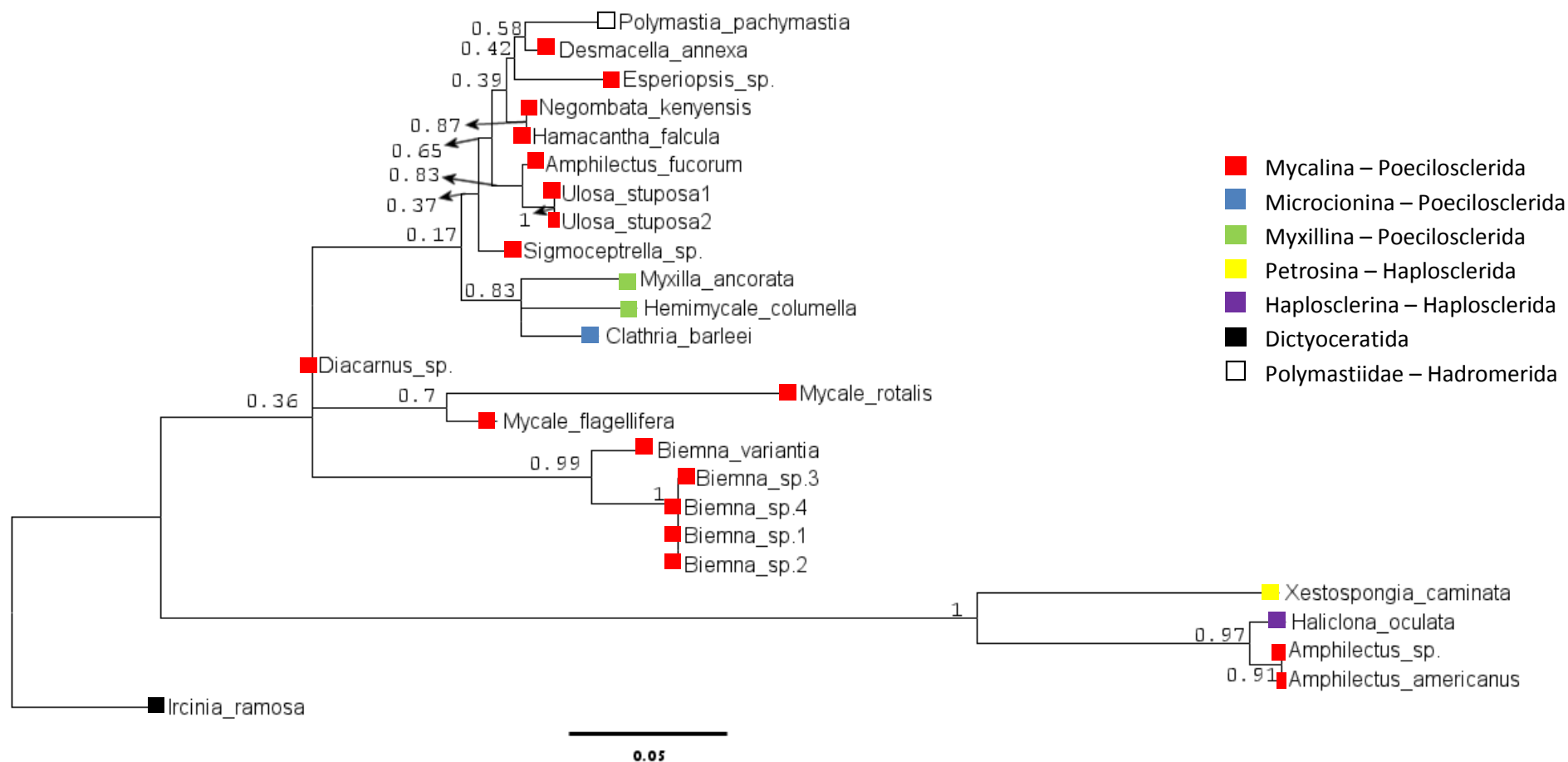


Figura 25 - Hipótese filogenética gerada a partir de dados moleculares analisados via análise de máxima verossimilhança (ML). Valores de bootstrap (1000 replicações) na parte interna dos ramos.

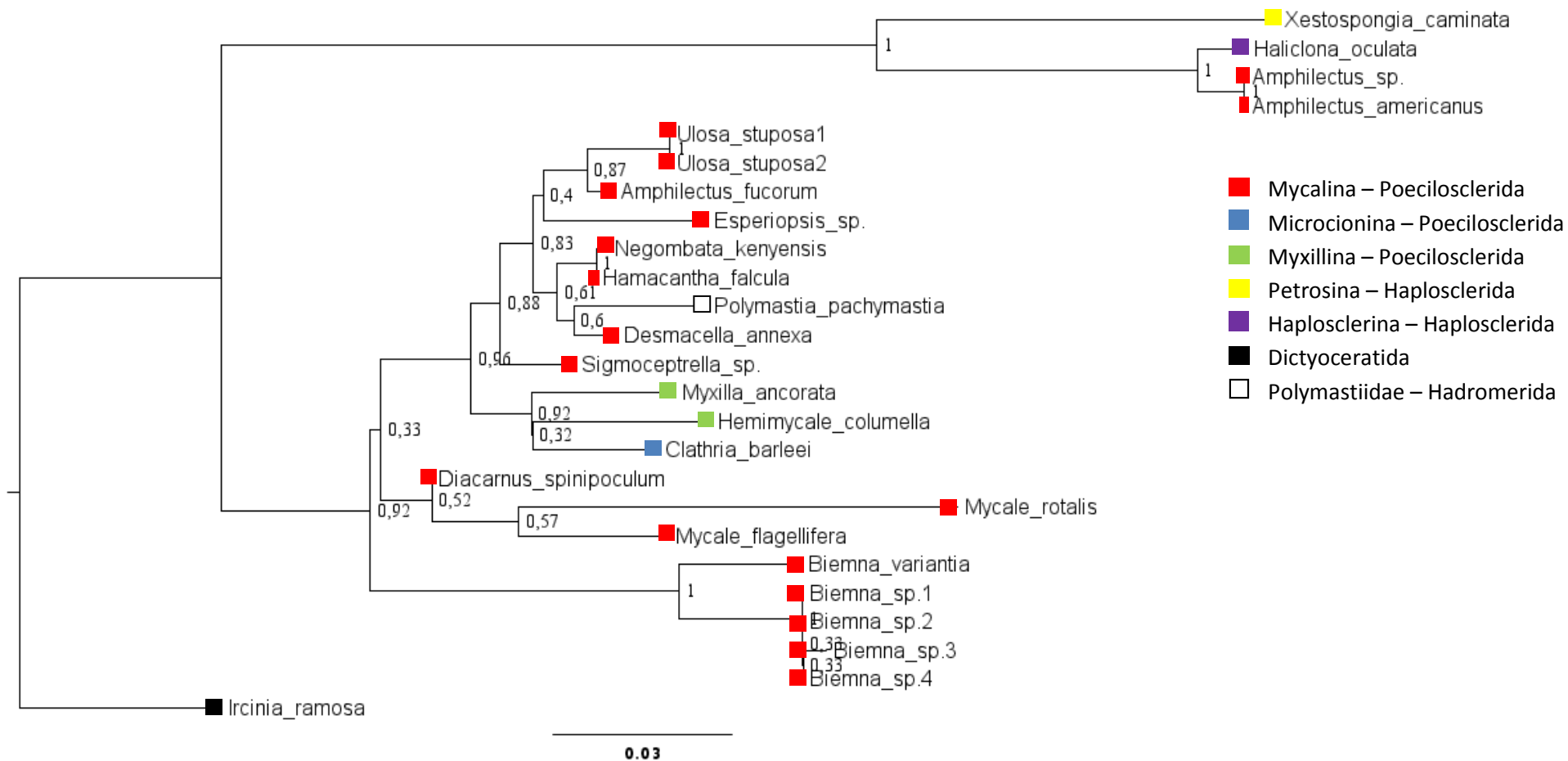


Figura 26 - Hipótese filogenética gerada a partir de dados moleculares analisados via análise de evolução mínima (ME). Valores de bootstrap (1000 replicações) na parte interna dos ramos.

5 DISCUSSÃO

5.1 Filogenia Morfológica

Foram elaboradas hipóteses a cerca das relações filogenéticas em *Mycalina*, trabalhando-se com OTUs selecionadas em três níveis de universalidade da hierarquia Linneana: espécies, gêneros e famílias. Para cada nível foi gerada uma matriz de dados, e analisadas através de três algoritmos: máxima parcimônia (MP), Análise Bayesiana (BA) e *Neighbor Joining* (NJ). Aos níveis de espécies e de gêneros, as árvores geradas via NJ apresentaram os melhores índices. BA se mostrou a metodologia mais conservadora, gerando árvores com baixa resolução, e MP, só encontrou as árvores mais parcimoniosas na análise ao nível de famílias.

O número de caracteres morfológicos acessíveis, em esponjas, é reduzido. As classificações taxonômicas são majoritariamente baseadas em combinações exclusivas destes caracteres. Esse modelo vem sendo empregado com sucesso a séculos com o objetivo de descrição, reconhecimento de espécies e grupos superiores, entretanto a utilização deste mesmo modelo nas análises filogenéticas têm sido um grande entrave.

A sistemática filogenética tem por princípio o reconhecimento de ancestralidade com base em estruturas morfológicas derivadas de outra estrutura morfológica, princípio da homologia. Bem como, no reconhecimento de estruturas homólogas derivadas e compartilhadas entre grupos, sinapomorfias. Quando toda a taxonomia de um grupo é baseada no compartilhamento de combinações exclusivas e não no compartilhamento de estruturas exclusivas, o processo de análise filogenética fica enfraquecido.

A metodologia de análise filogenética, como aplicada hoje, não é capaz de reconhecer combinações exclusivas de caracteres que são independentes entre si e entende-los como uma sinapormorfia. Por exemplo, a diagnose de *Isodictya*, segundo o Systema Porifera é uma Isodictyidae com hábito digitiforme/flabeliforme; esqueleto reticulado ou plumoreticulado (semelhante a um esqueleto nifatídico); megascleras normamente diactinais, comumente óxeas; microscleras são isoquelas palmadas. O outro gênero desta família, *Coelocarteria*, possui fistulas, arquitetura

esquelética floerdictiide, denso, reticulação de feixes de estrôngilos ou óxeas. Apesar de *Coelocarteria* e *Isodictya* serem diferentes, nenhuma das características citadas podem ser entendidas, mesmo que *a priori* ou primariamente, como uma sinapomorfia para um ou outro gênero, nem mesmo para a família, por outro lado, a combinação do tipo de esqueleto somado ao tipo de megasclera e microsclera confere uma identidade única para os gêneros e para a família, em resumo serve bem para a individualização, mas dentro do atual paradigma filogenético como usar isso para entender a evolução do grupo? Um exemplo que ilustra o melhor cenário, para uma análise filogenética e para a taxonomia clássica, é o da família Hamacanthidae, possui dois gêneros (tal como no exemplo anterior com a família Isodictyidae). *Hamacantha* é caracterizada por possuir diancistras e *Pozziella* por possuir cirtancistras. Além destas características outras em combinação estruturam a identidade dos gêneros entre si e para compor a família, entretanto ambos apresentam sinapomorfias, ou seja, ao menos uma característica que é única, exclusiva para as espécies de cada um daquele gênero. Infelizmente casos como este visto em Hamacanthidae são raros.

Assim sendo, o procedimento de codificar esses caracteres morfológicos independentes, que estão presentes em grupos muito distintos, segundo a metodologia filogenética, produz resultados pouco robustos, com alta taxa de homoplasia, grande número de árvores filogenéticas igualmente parcimoniosas, índices baixos e obviamente, o reconhecimento de poucas sinapomorfias. Neste cenário o reconhecimento de séries de transformações robustas são extremamente raros.

Com base nisso, neste trabalho, foi adotada uma estratégia de análise em três níveis hierárquicos, uma vez que, para cada nível um determinado conjunto de caracteres é mais adequado, por exemplo, caracteres mais gerais e amplos são melhor aplicáveis a categorias taxonômicas mais altas, enquanto que caracteres mais específicos, como ornamentações e pequenos detalhes de espículas, são mais adequados para níveis hierárquicos mais baixos. Desta forma poderá ser explorado o maior número possível de caracteres morfológicos. Apesar de não serem completamente independentes, as diferentes hipóteses poderão ser contrastadas e a evolução do grupo ser mais bem compreendida. Essa é uma abordagem original cuja eficiência esta sendo testada neste trabalho.

Além da originalidade em relação à estratégia de análise, esse é o primeiro trabalho com uma proposição formal de hipóteses filogenéticas e contraste entre dados morfológicos e moleculares para a subordem Mycalina.

5.1.1 Filogenia de espécies

A figura 11 refere-se à Análise de Máxima Parcimônia (MP), a figura 12 à Análise Bayesiana (BA), e a figura 13 à de *Neighbor Joining* (NJ).

A MP recuperou quatro famílias monofiléticas em Mycalina: Cladorhizidae, Guitarridae, Isodictyidae e Podospongiidae. A monofilia de Cladorhizidae depende, entretanto, da transferência de *Esperiopsis bathyalis* e *E. koltuni* para esta família. É importante ressaltar que se tratam de espécies cuja possível carnivoría foi sugerida na literatura (LOPES *et al.*, no prelo), o que indica que sua classificação em *Abyssocladia* seria mais apropriada. Como apontado por Lopes *et al.* (no prelo), as isoquetas de *E. koltuni* são tecnicamente arcuadas. Esta Cladorhizidae *s.l.* é suportada por duas sinapomorfias, presença de carnivoría (4.1 [caráter 4, estado 1]) e ausência de sistema aquífero (5.1 [caráter 5, estado 1]), e uma homoplasia, presença de compressão axial no esqueleto coanossomal (44.1). Este último caráter está presente em seis outras espécies: *Esperiopsis flagrum* Lehnert, Stone & Heimler, 2006, *Euchelipluma elongata* Lehnert, Stone & Heimler, 2006, *Podospongia loveni* Bocage, 1869, *P. similis* Lévi, 1993, *Sigmaxinella cearense* Salani, Lotufo & Hajdu, 2006 e *S. soelae* Hooper, 1984. Este tipo de esqueleto está preponderantemente associado ao hábito pedunculado/estipitado; todas as seis espécies possuem hábito pedunculado. Entretanto, foi detectado o surgimento independente do pedúnculo diversas vezes ao longo da história evolutiva das esponjas. Em Mycalina, esta estrutura está presente em Cladorhizidae, Desmacellidae (p.ex. *Biemna strongylota* Rios & Cristobo, 2006), Esperlopsidae (também em *Amphilectus dactylus* Goodwin, Jones, Neely & Brickle, 2011), Guitarridae, Mycalidae (p.ex. *Mycale ramulosa* Carballo & Cruz-Barrazo, 2010) e Podospongiidae, mas também ocorre em inúmeros táxons fora desta subordem, p.ex. *Amphitethya* Lendenfeld, 1907 (Tetillidae, Spirophorida), *Halicometes* Topsent, 1898 (Tethyidae, Hadromerida), *Stylocordyla* Thomson, 1873 (Stylocordilidae, Hadromerida).

Ao nível de gênero, 14 apareceram monofiléticos na MP: *Amphilectus*, *Chondrocladia*, *Coelocarteria*, *Coelodischela*, *Diacarnus* Burton, 1934, *Hamacantha* Gray, 1867, *Isodictya*, *Negombata*, *Neofibularia*, *Podospongia*, *Pozziella* Topsent, 1896, *Sigmaxinella*, *Sigmosceptrella* Dendy, 1922 e *Tetrapocillon* Brøndsted, 1924. O clado *Chondrocladia* é suportado pela presença de duas categorias de isoquelas ancoradas (sinapomorfia, 18.1), com posterior perda de uma categoria em *C. tasmaniensis* Vacelet, Kelly, Schlacher-Hoenlinger, 2009 (18.2). O monofiletismo do gênero também é suportado pela presença de isoquelas ancoradas (homoplasia, 17.1), as quais também estão presentes em *Lollipopcladia tiburoni* Vacelet, 2008, o que explica a inclusão desta espécie no clado de *Chondrocladia* pelo algoritmo de NJ. *Guitarra* só é monofilético se incluída *Euchelipluma pristina* Topsent, 1909, cujas placoquelas sugerem indubitável afinidade com as demais Guitarridae, porém o hábito carnívoro aponta para afinidade com Cladorhizidae. Não se pode, entretanto, descartar a possibilidade de que o acréscimo de espécies adicionais de cada gênero acima, especialmente nos mais especiosos (p.ex. *Chondrocladia*, *Hamacantha*), altere este resultado.

A BA só recuperou a família Cladorhizidae e 10 gêneros monofiléticos: *Amphilectus*, *Coelodischela* Vacelet, Vasseur & Lévi, 1976, *Diacarnus*, *Guitarra*, *Isodictya*, *Neofibularia*, *Podospongia*, *Pozziella*, *Sigmaxinella* e *Tetrapocillon*. Cladorhizidae segundo o método BA não inclui as espécies de *Esperiopsis* reportadas como carnívoras ou possivelmente carnívoras, nem sequer *Esperiopsis koltuni* Ereskovsky & Willenz, 2007, codificada aqui como sendo carnívora. Os agrupamentos internos obtidos por BA se mostraram distintos daqueles recuperados por MP e NJ. O clado é suportado por sete caracteres, dentre os quais, apenas a ausência de um sistema aquífero (5.1) é uma sinapomorfia plena.

Nesta análise, *Guitarra* foi recuperada como monofilética sem inclusão de *Euchelipluma*, que por outro lado agrupou-se com espécies possivelmente carnívoras de *Esperiopsis*. *Esperiopsis flagrum* Lehnert, Stone & Heimler, 2006, apesar de não ter sido ainda mencionada na literatura como um registro dúbio para o gênero, apresenta as mesmas características que fazem de algumas *Esperiopsis* candidatas à transferência para *Abyssocladia*: hábito ereto, pedunculado, frequentemente flabelado; isoquelas tendendo a arcuadas, e no caso de *E. flagrum*, sigmas que são na verdade sigmancistras.

O NJ obteve como monofiléticas as mesmas três famílias e os mesmos 13 gêneros recuperados por MP. Novamente o monofiletismo de *Guitarra* está condicionado à inclusão de *Euchelipluma*.

Segundo van Soest (2006), a Família Cladorhizidae parece ser polifilética pelo amplo conjunto de microscleras e por sua definição incluir carnivoría, que está presente também em algumas espécies de *Esperiopsis*. Segundo nossos resultados, incluir *Esperiopsis* com base na presença de carnivoría, a primeira vista, parece sensato, entretanto, este hábito alimentar ainda é pouco conhecido e não foi amplamente explorado em outros grupos de esponjas que habitam o mar profundo. Afinal, esta característica pode ser convergente pela pressão ambiental, isto é, zonas profundas do mar não recebem luz, logo a sua produtividade primária é baixa, os organismos que habitam estas zonas normalmente são carnívoros ou carniceiros (predadores) (BOETIUS *et al.*, 1996).

Assim sendo, a falta de mais dados sobre o hábito de carnivoría, uma das mais importantes características utilizadas para definir a Família Cladorhizidae, não pode ser amplamente explorada. Por outro lado, a nossa topologia de NJ mostra a Família como um grupo monofilético, sem a presença de *Esperiopsis* e com uma sinapomorfia bem definida: perda secundária do sistema aquífero (5:0). Este caráter é extremamente importante, pois é pelo sistema aquífero que as esponjas absorvem oxigênio e liberam gás carbônico, obtém alimento, captam e liberam células reprodutivas, secretam e excretam produtos e subprodutos do metabolismo primário e secundário. Enquanto novos dados não estão disponíveis, aceitamos aqui a família como monofilética.

A relação de Cladorhizidae com outras famílias permanece obscura com base nos dados de filogenia de espécies pelos métodos de MP e BA, já que outras famílias não se mostraram monofiléticas. Segundo a análise de MP o grupo irmão de Cladorhizidae é um complexo: *Ulosa*, *Semisuberites* (Esperiopsidae), *Mycale nodulosa* Goodwin, Jones, Neely & Brickle, 2011 (Mycalidae), *Microtylostylifer anomalus*, *Neofibularia* (Desmacellidae), *Isodictya* (Isodictyidae) e Haplosclerida, um agrupamento anômalo resultado de uma matriz e / ou de uma análise pouco robusta(s). Segundo a análise de NJ, aceitar o monofiletismo da Família Cladorhizidae, tal como definida hoje, torna *Esperiopsis* parafilético. Por outro lado, só há sinapomorfia para a inclusão de *Esperiopsis koltuni*, ou seja, carnivoría (4:1); a inclusão das demais espécies de *Esperiopsis* seria suportada por duas homoplasias,

ausência de esqueleto ectossomal perpendicular (35:0) e ausência de esqueleto coanossomal plumoreticulado (41:0). Estes dados, contrários às proposições de Hajdu *et al.* (1994a) e van Soest (2006), que sugeriam proximidade entre Cladorhizidae e Mycalidae, estão de acordo, em algum nível, com as proposições de van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1988), que sugeriram uma relação próxima entre Esperlopsidae (estes autores discordavam quanto a composição interna desta família, ver tabela 3) e Cladorhizidae, entretanto, nenhum autor havia proposto a fusão de ambas as famílias.

Ainda segundo a análise de NJ, na base do agrupamento Cladorhizidae + *Esperiopsis* aparece *Sigmaxinella* (Desmacellidae), seguida por *Amphilectus* (Esperiopsidae). A presença de *Sigmaxinella* é suportada por três homoplasias: presença de sigmas (26:1), presença de uma única categoria de sigmas (27:1) e presença de esqueleto coanossomal comprimido (44:1). Entretanto, neste agrupamento *Sigmaxinella* é o único gênero desprovido de quelas. *Ulosa* e *Semisuberites*, ambas Esperlopsidae, agrupam-se num clado, politômico, saindo do mesmo nó que os grupos discutidos. Aqui não proponho tal fusão, Cladorhizidae + Esperlopsidae, entretanto, seguindo Lopes *et al.* (no pelo) sugiro a transferência de *Esperiopsis koltuni* para o gênero *Abyssocladia* Lévi, 1964.

A Família Mycalidae não se mostrou monofilética em nenhum dos três métodos de reconstrução. Na topologia gerada pelo método BA, apenas *Mycale jasoniae* Lehnert, Stone & Heimler, 2006, *Phlyctaenopora bocagei* Lévi & Lévi, 1983 e *Phlyctaenopora halichondrioides* van Soest & Stentoft, 1988 aparecem agrupadas. O clado é suportado por cinco homoplasias: presença de anisoquelas (14:1), anisoquelas em uma categoria (15:1), ausência de sigmas (26:0), presença de ectossoma tangencial (33:1) e presença de esqueleto coanossomal plumoso (40:1). As demais *Mycale* utilizadas nesta análise apresentam sigmas, provavelmente por isso foram excluídas do clado, entretanto, é difícil afirmar, já que a forma como a análise bayesiana é executada não é facilmente intuída (ARCHIBALD *et al.*, 2003) como uma análise de máxima parcimônia. Observando a topologia gerada por MP, apenas *Mycale pachysigmata* Pulitzer-Finali, 1996 e *M. nodulosa*, aparecem fora do clado Mycalidae. *M. pachysigmata* aparece agrupada com *Esperiopsis flagrum* Lehnert, Stone & Heimler, 2006, esse agrupamento já foi sugerido no passado por Bergquist e Fromont (1988), que sugeriram a inclusão de *Esperiopsis* dentro da Família Mycalidae. Segundo a análise filogenética realizada em Hajdu e

Desqueyroux-Faúndez (1994) *Esperiopsis* é parafilético com espécies do grupo *E. villosa* (Carter, 1874) constituindo-se no grupo irmão de *Mycale*.

Ainda segundo Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994), *Mycale* seria monofilético tendo como sinapomorfia a presença de anisoquelas. Nas minhas análises de MP utilizando a matrix de espécies, à exceção de *Mycale pachysigmata*, todas as demais Mycalidae (*Mycale* spp. + *Phlyctaenopora* spp.) agruparam-se num clado suportado por duas homoplasias, presença de anisoquelas (14:1) e uma ou mais categorias de anisoquelas (15:1). Ambos caracteres também aparecem em *Abyssocladia dominalba* Vacelet, 2006, *Asbestopluma agglutinans* Vacelet, 2006, *Asbestopluma formosa* Vacelet, 2006, *Cladorhiza corona* Lehnert, Watling & Stone, 2005, *C. pteron* Reiswig & Lee, 2007e *C. segonzaci* Vacelet, 2006, todas são pertencentes à família Cladorhizidae. Entretanto, em *Mycale* as anisoquelas possuem uma cabeça mais cumprida que a base, já em *Abyssocladia* o estado aniso não deriva desta característica (Hajdu, comunicação pessoal) e em *Asbestopluma* as anisoquelas são de outro tipo que não palmada. A minha matriz não reflete tal detalhamento e precisa ser revisitada. Mesmo assim, é compreensível a proposição de estreita relação entre Mycalidae e Cladorhizidae como proposta por van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1988). Grosso modo, a topologia de NJ não apresentou resultado muito diferente do que encontrado pela MP. *Mycale nodulosa* e *M. pachysigmata* não se agrupam com as demais Mycalidae e a família é suportada pelas mesmas duas homoplasias (14:1 e 15:1).

As relações de Mycalidae com as outras famílias permanecem obscuras. Segundo a MP há uma tricotomia que envolve *Dragmatella aberrans* (Topsent, 1890), *Pozziella* spp. e Mycalidae. Já a topologia de NJ coloca *Pozziella* como grupo irmão de Mycalidae, com *D. aberrans* na base. O clado Mycalidae + *Pozziella* é suportado por uma homoplasia: hábito incrustante (1:1). Este caráter é muito difundido dentro da classe Demospongiae, desta forma é um aspecto muito fraco e dá pouca credibilidade ao agrupamento. *Pozziella* é bastante derivado, apresentando um esqueleto bem diferenciado, presença de cirtancistras e exotilotos. Nenhuma destas características é encontrada em Mycalidae. Desta forma, segundo a topologia de NJ, as relações de Mycalidae com outras famílias permanecem obscuras.

A Família Hamacanthidae não aparece como grupo polifilético em nenhum dos métodos de reconstrução utilizados aqui. A forma correta de codificação,

provavelmente, seria criar um caráter diancistra e derivados (ausente/diancistra/cirtancistra). Da forma como está codificado, os gêneros supra citados não se agrupam. Segundo a topologia de NJ, *Hamacantha* spp. aparece como grupo irmão de *Microtylostylifer anomalus* Dendy, 1924 + *Mycale nodulosa*, cujo suporte é uma homoplasia, hábito incrustante (1:3). Já segundo a MP, *Hamacantha* spp. e *Microtylostylifer aruensis* (Hentschel, 1912) formam um clado suportado por três homoplasias: hábito tubuliforme (1:4), presença de quelas (21:1) e presença de esqueleto ectossomal reticulado (37:1). Já *Pozziella*, como discutido acima, aparece como grupo irmão de Mycalidae. É provável que Hamacanthidae seja monofilética e uma codificação inadequada criou relações artefactuais. Mesmo estando separados, os gêneros tendem a ficar próximos de Mycalidae e Desmacellidae, proposta feita em 1994 por Hajdu. Este autor propôs Mycalidae como grupo irmão de Hamacanthidae suportados por uma homoplasia: rosetas de quelas. Na base deste agrupamento estaria Desmacellidae, suportado por duas sinapomorfias: sigmodragmas e toxodragmas. Outros autores como van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1998) também propuseram uma estreita relação entre Desmacellidae e Hamacanthidae, com base na interpretação das sigmas como sendo a forma de onde derivaram as cirtancistras e as diancistras.

A Família Desmacellidae apresentou-se completamente desestruturada nas topologias de MP, BA e NJ, com uma ou mais espécies aparecendo em quase todos os cladogramas formados. Nem mesmo o monofiletismo dos seus gêneros pôde ser confirmado. Isso pode ser explicado pela falta de uma sinapomorfia e, por outro lado, pela diversidade de tipos espiculares (óxeas, estilos e estrôngilos), e de arquitetura esquelética (plumoso, plumorreticulado, halicondróide confuso e com compressão axial), possíveis para as espécies da família.

Guitarridae aparece como monofilética, bem como seus gêneros, *Coelodischela* e *Tetrapocillon*, nas topologias de MP e NJ. A Família, segundo a topologia de MP, é suportada por duas sinapomorfias, presença de quelas com fimbria interna (19:1) e presença de quelas com alas completamente fundidas (20:1); e uma homoplasia, ausência de sigmas (26:0). Segundo a topologia de NJ a Família é suportada pelas mesmas sinapomorfias; entretanto, por duas outras homoplasias, pedúnculo e corpo indiferenciados (2:4) e pedúnculo com e sem ramos laterais (3:0+1).

Coelodischela (uma Guitarridae) possui como sinapomorfias, presença de uma categoria de tilotos (10:1) e presença de disquelas (24:1); e como homoplasias, hábito massiço (amorfo não incrustante) (1:3), presença de sigmas (26:1), uma ou duas categorias de sigmas (27:1), e presença de esqueleto ectossomal tangencial (33:1). O gênero *Tetrapocillon* é suportado pela sinapomorfia presença de tetrapocila (23:1) e, adicionalmente, a topologia baseada em NJ apresenta uma homoplasia como suporte, hábito incrustante (1:1). *Guitarra* e *Euchellipluma* aparecem juntas, e apesar de *Guitarra sepia* ter sido excluída do grupo suportado pela presença de placoquelas, podemos entender como uma perda secundária nesta espécie; haja vista a predominância deste caráter nas demais espécies, além de ser um caráter restrito a estes dois gêneros. A principal diferença entre *Euchellipluma* e *Guitarra* é a presença de sigmancistras e ausência de isoquelas espinadas na primeira; e ausência de sigmancistras e presença de isoquelas espinadas na segunda. Guitarridae é um dos grupos mais bem suportados com base em elementos espiculares dentro da Subordem Mycalina. Uriz e Carballo (2001) implementaram uma análise filogenética da Família Guitarridae, e tal como encontrado aqui, propuseram o seu monofiletismo. As relações internas entre os gêneros não ficaram bem definidas, principalmente pelo número muito superior de espécies de *Guitarra* em contraste com os demais gêneros. Segundo estes autores o monofiletismo da Família é suportado por duas sinapomorfias, presença de sigmancistras e presença de placoquelas. Meus dados corroboram essa interpretação, já que utilizei elementos da micromorfologia das placoquelas como caracteres, tais como fimbria interna e fusão das alas. A convergência de ambos os resultados reforça a idéia proposta por Hajdu (1995), de monofiletismo dos gêneros que possuem placoquelas e derivados.

Podospongiidae, bem como cada qual de seus gêneros (*Diacarnus*, *Negombata*, *Podospongia*, *Sigmosceptrella*), aparece como um grupo monofilético segundo a topologia de MP e NJ, apesar das relações internas e externas serem sensivelmente diferentes. Segundo a análise de MP, o grupo irmão da Família são duas espécies da ordem Hadromerida (*Timea clippertoni* Van Soest, Kaiser & Van Syoc, 2011 e *Protosuberites denhartogi* van Soest & de Kluijver, 2003), que aparecem como um grupo interno em Mycalina. O grupo Podospongiidae + (*T. clippertoni*, *P. denhartogi*) é suportado pela sinapomorfia, coanossoma formado por feixes ascendentes (47:1) e pela homoplasia, ausência de sigmas (26:0). A Família é

suportada por três sinapomorfias: presença de espinorrábdos (32:1), presença de esqueleto ectossomal formado exclusivamente por microscleras (38:1), e esqueleto coanossomal radial (46:1). Segundo a topologia de NJ, as sinapomorfias que suportam a família são as mesmas, exceto a 46:1, que não está presente em *Negombata*. Este gênero aparece na base da família, diferente da topologia de MP, onde ele aparece como um dos táxons mais derivados. Duas homoplasias compartilhadas entre *Negombata* e *Diacarnus* são responsáveis por essa discrepância entre as análises: ausência de estilos, tilóstilos, subtilóstilos, e micaloestilos (6:0) e presença de esqueleto coanossomal reticulado (42:1). Outro fator que explica esta divergência é a interpretação da ausência de arquitetura radial em *Negombata*, interpretada como basal na topologia de NJ, e como derivada (perda) na MP. A primeira alternativa parece mais parcimoniosa, aceitar o surgimento deste caráter na base e sua perda posterior em *Negombata*. Sim-Smith e Kelly (2011) adicionaram dois novos gêneros, *Neopodospongia* e *Diploporospongia*. O primeiro é definido por ser finamente incrustante com esqueleto formado de estrongilóxea e ectossoma formado por espinorrábdos (aciculoespinorrábido). O segundo é finamente incrustante, com esqueleto formado por anisóxeas e ectossoma de espinorrábdos (diploespinorrábido). Ambos possuem um ectossoma formado exclusivamente por microscleras, espinorrábdos. Estes novos gêneros não foram acrescentados nas análises feitas aqui, porém a sinapomorfia (47:1) está presente nestes gêneros e desta forma continua válida para a família.

A Família Podospongiidae não apresenta sigmas ou quelas e, como visto nas análises, pode facilmente ser agrupadas com a Ordem Hadromerida, devido ao seu esqueleto simples e a ausência de características normalmente atribuídas a Poecilosclerida, motivo pelo qual foi inserida em Mycalina como uma Família *incertae sedis* (KELLY; SAMAAI, 2002). Entretanto, os protorrábdos (a forma juvenil dos espinorrábdos) são sigmóides, muito parecido com uma isoquela palmada simples, caráter interpretado como evidência de sua relação com Poecilosclerida/Mycalina (KELLY-BORGES; VACELET 1995; KELLY; SAMAAI 2002) e aceita aqui como tal.

A Família Isodictyidae (*Coelocarteria* + *Isodictya*) é fonte de controvérsia como explicitado na introdução. Na análise de MP e NJ, a família aparece como monofilética. Neste último método (NJ) aparece unida por uma homoplasia, a presença de isoquelas palmadas em uma única categoria (16:1). Em ambas as

análises a Ordem Haplosclerida + Família Isodictyidae aparece bem suportada como um grupo monofilético. Segundo a topologia de MP, esse agrupamento, aparece como um grupo interno de Poecilosclerida, definido por duas sinapomorfias, presença de uma categoria de óxeas charutiformes (12:3) e presença de esqueleto coanossomal isodictial (45:1), além de uma homoplasia, ausência de esqueleto coanossomal reticulado (42:0). Já a topologia de NJ coloca Haplosclerida + Isodictyidae como um grupo irmão de Poecilosclerida, suportado pelas mesmas sinapomorfias presentes na MP (12:3 e 45:1), e uma homoplasia, presença de esqueleto ectossomal tangencial (33:1), que é perdido em *Isodictya*. A topologia baseada na análise de BA também mostra Haplosclerida + Isodictyidae como um grupo monofilético com base nas mesmas sinapomorfias.

A relação de Haplosclerida como grupo irmão de Poecilosclerida já foi proposta por Hajdu *et al.* (1994a) e Samaai *et al.* (1999). Entretanto, estes autores divergiam quanto à posição de *Isodictya*. Hajdu *et al.* (1994a) sugeriram que este gênero fosse alocado em Haplosclerida, com base em seu esqueleto e na forma de suas óxeas. Samaai *et al.* (1999) sugeriram a alocação em Poecilosclerida, com base na presença de quelas. A análise de NJ corrobora, em parte, a proposição de Hajdu *et al.* (1994a), entretanto, quelas não aparecem como a sinapomorfia basal de Poecilosclerida + Haplosclerida, como havia sido proposto por esses últimos autores. Segundo a reconstrução utilizando NJ, Poecilosclerida é monofilética se incluídas duas espécies de Hadromerida (*Protosuberites denhartogi* e *Timea clippertoni*), e se aceitarmos que Isodictyidae pertence à Haplosclerida como proposto por Hajdu *et al.* (1994a), contrariando a análise filogenética feita em Kelly e Samaai (1999) e a classificação proposta por van Soest (1994) e Bergquist e Fromont (1988) que aceitava *Isodictya* como Esperipsidae e Desmacionidae respectivamente, essas duas últimas famílias seriam equivalentes, apesar de possuírem nomes diferentes (ver tabela 3).

Apesar do enorme esforço empreendido nesta análise os resultados foram menos informativos que o esperado. O número de caracteres foi baixo em face do número de táxons analisados. A estratégia de obter a maior resolução possível prejudicou a qualidade das mesmas. Alguns caracteres como, por exemplo, (hábito) pedunculado corpo (2); (hábito) pedúnculo (3); dentre outros são pouco informativos e claramente evoluíram de forma convergente, desta forma não deveriam fazer parte

do elenco da serie de homólogos, por outro lado a presença de caracteres como esse aumenta a resolução da árvore, sobretudo nos cladogramas terminais.

5.1.2 Filogenia de gêneros

Foram feitas três análises com base em três metodologias: máxima parcimônia (MP), Bayesiana (BA) e *Neighbor Joining* (NJ), utilizando uma matriz com caracteres codificados para gêneros de Mycalina (Figura 14, MP; Figura 15, BA; e Figura 16, NJ). Nestas análises foram recuperadas quatro famílias monofiléticas: Cladorhizidae, Isodictyidae, Mycalidae e Podospongiidae. Segundo a topologia MP, a Família Cladorhizidae, tal como na topologia de MP para filogenia de espécies, só pode ser considerada monofilética se incluído *Esperiopsis*. As sinapomorfias, presença de carnivorina (2:1) e ausência de sistema aquífero (3:0), corroboram o clado, em consonância com os resultados vistos na MP da filogenia de espécies. Adicionalmente à presença de sigmancistras (15:1), além de duas homoplasias, hábito pedunculado (1:2) e presença de sigmas (20:1). Os gêneros *Asbestopluma*, *Cladorhiza* e *Chondrocladia* formam um clado suportado pela sinapomorfia presença de quelas ancoradas (12:1), esse clado forma uma tricotomia basal junto com *Esperiopsis* e *Abyssocladia*. Assim como proposto por Hajdu e Desqueyroux-Faúndez (1994) trabalhar com *Esperiopsis* I e II, o último posteriormente denominado *Amphilectus* (VAN SOEST E HAJDU, 2002b), aqui se poderia ter optado por subdivisão adicional de *Esperiopsis* I em espécies do grupo *villosa* (espécie-tipo) e espécies possivelmente carnívoras, e potencialmente pertencentes à *Abyssocladia* (LOPES *et al.*, no prelo; discussão acima). Se o agrupamento obtido aqui faz sentido em face dos caracteres exibidos por espécies como *E. koltuni*, é difícil imaginar que *E. villosa* possa pertencer a este clado expandido de Cladorhizidae.

Já em NJ Cladorhizidae é monofilética, porém suportada apenas por homoplasias: esqueleto ectossomal ausente (5:0) e presença de óxeas simples (10:1). *Esperiopsis* aparece na base como grupo irmão, com este clado (*Esperiopsis* + Cladorhizidae) suportado pelas mesmas sinapomorfias apresentadas para a topologia de MP (2:1, 3:0 e 15:1).

Em relação aos grupos internos, há uma boa correlação entre as duas metodologias, onde *Asbestopluma*, *Cladorhiza* e *Chondrocladia* formam um clado

suportado pela presença de quelas ancoradas, apesar destas serem raras em *Asbestopluma*. A topologia baseada em BA mostra os gêneros desta Família como uma politomia basal junto com diversos outros gêneros, apesar de compartilharem diversos estados de caráter (1:2, 2:1, 3:0, 4:5, 5:0, 6:1, 15:1). Apesar das análises BA terem tido pouca resolução, há uma forte convergência de resultados entre a filogenia de espécies e de gêneros em relação à Família Cladorhizidae, o que está em acordo com as proposições feitas por outros autores na literatura, como já discutido.

Segundo a topologia de MP, o grupo irmão de Cladorhizidae é o agrupamento Haplosclerida + “Isodictyidae” + *Amphilectus*. Esta relação é suportada por uma sinapomorfia, esqueleto ectossomal ausente (5:0), que se torna reticulado (5:1) em Haplosclerida + “Isodictyidae”. Este caráter é pouco expressivo e precisa ser revisto, uma vez que Cladorhizidae possui um esqueleto ectossomal; porém difícil de ser interpretado haja vista seu hábito carnívoro, provavelmente, selecionou e manteve os grupos que possuíam quelas abundantes na superfície para prover a captura da presa. Assim sendo, codificar seu ectossoma como “ectossoma formado exclusivamente por microscleras (5:4)” criaria uma ligação artificial com Podospongiidae que possui um ectossoma formado por espinorrábidos, uma alternativa seria excluir o estado de caráter citado (5:4) e criar dois outros: ectossoma exclusivamente formado por quelas e ectossoma exclusivamente formado por espinorrábidos. Além disso, a separação entre coanossoma e ectossoma, em alguns casos de Cladorhizidae é difícil, por não haver região subectossomal clara com canais (ausência de sistema aquífero). Desta forma, esta relação (Cladorhizidae (Haplosclerida, Isodictyidae, *Amphilectus*)) provavelmente é um artefato de codificação dos caracteres.

Segundo a topologia de NJ, o grupo irmão de Cladorhizidae é *Euchelipluma*, suportado por duas homoplasias, presença de tilóstilos e subtilóstilos (6:1) e presença de quelas palmadas (11:1). Apesar do suporte baixo, *Euchelipluma* é uma Guitarridae e a relação entre as duas famílias já foi sugerida por Hajdu *et al.* (1994b) (espécie *Euchelipluma* e a Família Cladorhizidae) incluindo ainda Mycalidae, por compartilharem quelas palmadas. Mas, contraria outros autores, como van Soest (1984) e Bergquist e Fromont (1988), e os dados da filogenia de espécies, previamente discutidos.

O clado encontrado na análise de MP, Haplosclerida + Isodictyidae (parafilética) + *Amphilectus* é interessante. Ele é apoiado pela sinapomorfia coanossoma com reticulação isodictial (4:4), e pela homoplasia ausência de tilóstilos e subtilóstilos (6:0). O agrupamento aparece pela primeira vez em nossas análises e não foi sugerido por nenhum autor prévio, que aqui aparece como uma Haplosclerida. Apesar de inesperado, já que todas as outras análises previamente discutidas mostram *Amphilectus* relacionado com outras Esperlopsidae ou Desmacellidae, a sinapomorfia que aponta relação com Haplosclerida é pertinente, pois essa arquitetura esquelética só é encontrada em *Isodictya* e algumas Haplosclerida, sendo um caráter estável.

Ainda segundo a topologia de MP, é possível interpretar *Isodictya* e *Coelocarteria* como uma Haplosclerida, como mostrado na filogenia de espécies. Segundo a topologia de NJ, esse agrupamento é corroborado, entretanto a Ordem Haplosclerida aparece como grupo irmão de Poecilosclerida e não como grupo interno (como visto em MP). Em ambas as filogenias, de espécies e de gêneros, “Isodictyidae” aparece como uma Haplosclerida, reforçando a hipótese de Hajdu *et al.* (1994a).

A Família Guitarridae aparece como monofilética na topologia de MP apoiada pela presença de duas sinapomorfias, quelas com fimbria interna (13:1) e presença de placoquelas e derivados (18:1). Já a topologia de NJ, mostra a Família como polifilética, uma vez que *Euchelipluma* agrupou-se com Cladorhizidae + *Esperiopsis* + *Sigmaxinella*. O agrupamento sem *Euchelipluma* é apoiado por uma sinapomorfia: quelas palmadas espinadas (11:2), um caráter de considerável complexidade. O agrupamento da Família mostrado na topologia de MP, bem como as sinapomorfias apresentadas, são consonantes com as análises de filogenia de espécies. As relações de Guitarridae com outras Mycalina não são claras, mas há uma tendência de relação como Cladorhizidae, como já discutido.

A Família Mycalidae aparece como monofilética em MP e NJ, inclusive em relação à filogenia de espécies. Entretanto, suas relações com outras Mycalina permanecem obscuras. Segundo a topologia de MP, Mycalidae tem Merliidae como grupo irmão; já em NJ, o grupo irmão é *Biemna* + *Neofibularia* (Desmacellidae em parte). Ambos relacionamentos são pouco prováveis, nenhum dos supostos grupos irmãos possuem quelas palmadas e Merliidae possui clavidiscos, o que aponta para

afinidade com Hamacanthidae, com base na série de transformações (Figura 8) sugerida em Hajdu (1994).

A Família Hamacanthidae aparece como monofilética, pela primeira vez e exclusivamente na topologia de NJ, suportada por uma sinapomorfia: presença de diancistras e derivados (16:1). A topologia de MP coloca *Hamacantha* relacionada com parte de Desmacellidae (*Biemna* + *Neofibularia*). Este agrupamento improvável possui como grupo irmão *Tethya* + Podospongiidae. O suporte para tal agrupamento é uma homoplasia, presença de tilóstilos e subtilóstilos (6:1), um caráter que surge em diversos táxons e se perde em tantos outros.

A Família Desmacellidae não aparece monofilética, nem nesta análise nem em qualquer outra feita neste trabalho. Segundo a árvore de MP o gênero *Microtylostylifer* aparece na base da árvore suportado por uma homoplasia presença de estilo (7:1), este caráter aparece e desaparece ao longo da topologia. *Desmacella* agrupa com *Suberites* (Hadromerida) com base na ausência de estilos (7:0), são agrupamentos com suporte fraco. *Sigmaxinella* aparece na base do agrupamento (*Hamacantha* (*Biemna*, *Neofibularia*)), suportada pelas homoplasias presença de sigma (20:1), que também ocorre em Cladorhiziade, *Coelosdischela*, *Desmacella*, *Euchelipluma*, *Mycale*, *Niphates* Duchassaing & Michelotti, 1864 e *Phlyctaenopora*, bem como a presença de micróxea (21:1) que adicionalmente ocorre em *Mycale* e *Phlyctaenopora*. Já *Biemna* e *Hamacantha* são suportadas por uma sinapomorfia presença de comma lisa (23:1), agrupamento recorrente em outras análises, inclusive de espécies. A Família Podospongiidae aparece como monofilética em todas as análises, sempre suportada pela presença de espinorrábidos; entretanto, as relações com outras Mycalina também não são claras. A topologia de NJ propõe a Família como grupo basal de Mycalina; já a topologia de MP propõe que Podospongiidae seja o grupo irmão de *Tethya* Lamarck, 1815 (uma Hadromerida), tal como na filogenia de espécies (MP).

A rigor, a Ordem Poecilosclerida não aparece como um grupo monofilético; a topologia de NJ apresenta dois gêneros de Hadromerida no grupo interno. Já a topologia de MP, adicionalmente, apresenta gêneros de Haplosclerida como grupo interno. Segundo o NJ, o agrupamento Poecilosclerida + Hadromerida é suportado por duas homoplasias, esqueleto coanossomal plumoso (4:1) e esqueleto ectossomal perpendicular (5:3); já a topologia de MP apresenta uma homoplasia

para o agrupamento Poecilosclerida + Hadromerida + Haplosclerida, presença de estilos.

Em relação à filogenia de espécies, a filogenia de gêneros se mostrou menos informativa. Parte deste fato pode ser explicada pela maior dificuldade de explorar os caracteres. A questão recorrente na composição da série de homólogos foi: um caráter raro ou que ocorre em apenas uma única espécie do gênero deve ser codificada como pertencente ao gênero como um todo?

Há argumentos contra e favorável para uma possível resposta sim e uma possível resposta não. Caso a resposta seja sim, a presença de uma característica rara pode ser uma informação residual rumo ao desaparecimento na história evolutiva daquele grupo, podendo representar o “elo perdido” que explicaria a sua relação com os demais grupos próximos, por exemplo, os protorrábidos dos espinorrábidos ocorrem apenas em algumas espécies de Podospongiidae, se essa característica fosse abandonada seria perdida a principal ligação que explica a origem dos espinorrábidos a partir das quelas e desta forma sua relação com Poecilosclerida. Por outro lado, caracteres raros podem ser resultado de uma classificação errônea, ou seja, uma determinada espécie que deveria estar classificada no gênero “A” foi classificada no gênero “B” por isso apresenta um determinado caráter que não é compartilhado pelas demais espécies e esse caráter raro é então codificado como pertencente ao gênero. Esse tipo de erro introduz um ruído na matriz diminuindo sua robustez e gerando resultados ambíguos.

A decisão pela melhor estratégia é complicada e muito dependente da experiência do taxonomista e da quantidade de informações acerca das homologias do grupo a ser analisado. Em se tratando de Porifera é extremamente difícil tomar essa decisão *a priori* haja vista que o nosso conhecimento acerca das homologias, primárias e ainda mais das secundárias, é parco. Neste trabalho, considerando a dificuldade de se obter caracteres a partir de esponjas e falta de parâmetros outros, optou-se por usar os caracteres raros, o que explica em parte a baixa robustez da matriz.

5.1.3 Filogenia de famílias

Assim como nos níveis de universalidade de espécies e gêneros apresentados acima, para famílias de Mycalina também foram efetuadas três

análises com base em três metodologias: máxima parcimônia (MP), Bayesiana (BA) e *Neighbor Joining* (NJ) (Figura 17, MP; Figura 18, BA; e Figura 19, NJ).

As análises da filogenia de famílias apresentaram os melhores índices, quando comparados aos índices da filogenia de espécies e de gêneros. A matriz, consideravelmente menor, possibilitou a aplicação de distintas técnicas de buscas, busca exaustiva e pesagem sucessiva dos caracteres com base no índice de consistência reescalado, o que não fôra possível aplicar nas matrizes de espécies e gêneros em virtude de seu tamanho e limitações algorítmicas e computacionais.

Na topologia de MP Cladorhizidae integra a tricotomia (Cladorhizidae, Esperlopsidae, (Guitarridae (Hamacanthidae, Merliidae))). Este grande clado é suportado por ectosoma formado por microscleras (10:2). Já por NJ obteve-se a tricotomia (Cladorhizidae, Esperlopsidae, Guitarridae), suportada pela mesma sinapomorfia anterior, 10:2, além de presença de esqueleto coanossomal axial (9:5). Como já discutido anteriormente, Cladorhizidae possui estreita relação com Esperlopsidae (*Esperlopsis*) e Guitarridae, relações propostas anteriormente por diversos autores e recuperada em nossas análises.

A topologia de MP propõe a relação Guitarridae como grupo irmão do clado (Merliidae, Hamacanthidae), suportada pela sinapomorfia presença de sigmancistra (12:2) e pela homoplasia esqueleto ectossomal tangencial (10:0). O clado (Merliidae, Hamacanthidae) é suportado pela sinapomorfia presença de cirtancistra / diancistra e pela homoplasia ausência de quela (perda secundária). O grupo irmão deste grande clado é Mycalidae, o que é suportado pela sinapomorfia presença de micaloestilos (8:1) e pela homoplasia quela palmada (1:1). Também foi observado o agrupamento *Merlia-Mycale* nas topologias de MP e BA na filogenia de gêneros.

Ainda segundo a topologia de MP, vemos Podospongiidae na base de Mycalina (excluindo Desmacellidae e Isodictyidae). Esta relação é suportada por uma homoplasia, ausência de microsclera monaxônica (2:0), o que é considerado um caráter fraco haja vista sua condição instável, surgindo e desaparecendo em diversos táxons de Poecilosclerida e Demospongiae em geral.

Desmacellidae aparece fora de Mycalina, em uma tricotomia basal que inclui Mycalina e Haplosclerida (+ Isodictyidae), tanto em MP quanto em NJ. A família, como já explanado, apresenta uma grande variedade de formas de esqueleto e megascleras comuns à Mycalina e outros táxons. Porém, caracteres importantes, amplamente difundidos em Mycalina, como quelas, não estão presentes nas

espécies da família, e para tornar sua compreensão ainda mais difícil, a presença de mais de um tipo de microsclera monaxônica como toxas e ráfides, por exemplo, que são pouco comuns em Mycalina, é amplamente difundida dentro da família.

Em NJ, Mycalina (sem Desmacellidae e Isodictyidae) aparece dividida em dois clados. O primeiro, já discutido, inclui Mycalidae, Cladorhizidae, Esperlopsidae e Guitarridae, que entendo como uma linhagem definida por suas quelas bastante derivadas em relação a um padrão básico (quela palmada). O segundo clado inclui a tricotomia (Podospongiidae, Merliidae e Hamacanthidae) suportada pela sinapomorfia presença de cirtancistra / diancistra (12:3), perdido em Podospongiidae (12:0) e se transforma nos clavidisco (12:4) de Merliidae, e pela homoplasia esqueleto ectossomal tangencial (10:0). Esse segundo grupo entendo como a linhagem caracterizada pela evolução de microscleras sigmóides, não queliformes. Para este clado interpreto que tanto as sigmas quanto as microscleras monaxônicas tiveram sua origem na forma mais simples e mais difundida em Demospongiae, as óxeas, ou de forma mais genérica, uma espícula de tamanho reduzido rabdiforme. Aceitando essa visão faz sentido a exclusão de Desmacellidae ou sua posição basal em Mycalina, já que esta família possui apenas quelas e microscleras monaxonais. Essa microsclera simples, rabdiforme, provavelmente, deram origem às sigmas, o que justifica sua ampla difusão dentro de Mycalina (também em outros grupos de Poecilosclerida e seu provável grupo irmão, Haplosclerida), uma vez que surgiu na base do grupo. Esta seguiu dois caminhos distintos, (1) dando origem às quelas e essa se derivou ao longo do primeiro clado supracitado e, (2) dando origem às sigmancistras das quais se derivaram diancistras, cirtancistras e os clavidiscos de Merliidae (Figura 8), cuja série de transformação já havia sido proposta (ver HAJDU, 1994b).

As três famílias de Haplosclerida mais Isodictyidae aparecem agrupadas, pelos três métodos de reconstrução utilizados, nas outras análises, de espécies e gêneros, apenas na topologia baseado em BA na filogenia de gêneros, esse agrupamento não foi recuperado. Esse clado é suportado pela sinapomorfia presença de megasclera (óxea) charutiforme (14:1). A inclusão de *Isodictyidae*, parece plausível e bem suportada, como proposto por Hajdu *et al.* (1994a), e contrariando Samaai *et al.* (1999) e Hajdu e Lôbo-Hajdu (2002) em parte que consideravam o gênero uma Poecilosclerida. A inclusão de Isodictyidae em Haplosclerida é suportada tanto pela presença de óxeas charutiformes, quanto pela

presença de esqueleto isodictial. A proposição defendida aqui leva ao questionamento de como interpretar o surgimento das quelas. Num cenário onde *Isodictyidae* (que possui quelas palmadas) estivesse dentro de Haplosclerida e esta fosse grupo irmã de Poecilosclerida, possuiriam sigmas e quelas, desta forma essas microscleras teriam surgido no ancestral de ambas as ordens (Figura 5). Uma segunda consequência seria aceitar Mycalina (que possui quelas do tipo palmada) numa posição basal, já que de outra forma implicaria em aceitar o surgimento independente das quelas palmadas. Desta forma optamos por aceitar a proposição de Hajdu *et al.* (1994a) seguindo o que foi mostrado em nossas hipóteses.

Apesar de todos os problemas citados, intrínsecos a uma análise filogenética morfológica de Porifera e de um grande número de táxons, não há até a presente data nenhum trabalho sobre filogenia de Mycalina, tão amplo e que tenha seguido estritamente o método filogenético, sendo este o primeiro.

5.2 Dificuldades no uso de material biológico preservado em museus

Os museus de história natural são fonte vasta de informação, abrigando coleções preservadas com décadas ou até centenas de anos. A perspectiva original destas instituições estava relacionada à preservação da informação morfológica, mas, a descoberta do DNA, e o posterior desenvolvimento das técnicas de manipulação desta macromolécula, apontaram para o potencial das coleções de história natural, como fontes de registro da biodiversidade também ao nível genético.

Entretanto, o DNA está sujeito à degradação por diversos agentes físicos, químicos e biológicos. Por exemplo, espécimes que foram fixados e conservados em formol (normalmente formaldeído 3,7%, pH ~4,5) possuem um DNA com uma taxa muito alta de depurinização (remoção das bases púricas, adenina e guanina). O mesmo acontece com materiais mantidos em álcool sem troca frequente. Com o passar do tempo esse conservante se acidifica lesionando o DNA (ZIMMERMANN *et al.*, 2008). Espécimes que foram fixados e preservados em álcool apresentam uma menor taxa de degradação, entretanto, em poucos anos a capacidade de amplificação de fragmentos maiores que 500 pares de bases (pb) se torna muito difícil, resultado da fragmentação do DNA por hidrólise (GRAHAM, 2007). Segundo os modelos descritos em Zimmermann *et al.* (2008), após sete anos, o DNA de espécimes preservados em álcool, estaria quebrado em fragmentos com 200 pb de

comprimento em média. A figura 27 resume as principais formas de degradação do DNA e onde elas atuam. Neste trabalho, quase que a totalidade das espécies foram provenientes de coleções zoológicas.

Além dos efeitos evidentes destes danos, o subproduto destas reações químicas são, normalmente, inibidores da atividade da polimerase (PÄÄBO *et al.*, 1989). Por outro lado o DNA cujo principal tipo de degradação foi a fragmentação, em teoria, estaria livre destes inibidores e seria passível de amplificação. Porém, Golenberg *et al.* (1996) alertaram para a competição entre os pequenos fragmentos e os iniciadores (*primers*) pelos recursos da reação (cátions, polimerase, deoxinucleotídeos trifosfatados e fita molde), produzindo ampliações inespecíficas e/ou rendimento insuficiente para ser utilizado em análises subsequentes.

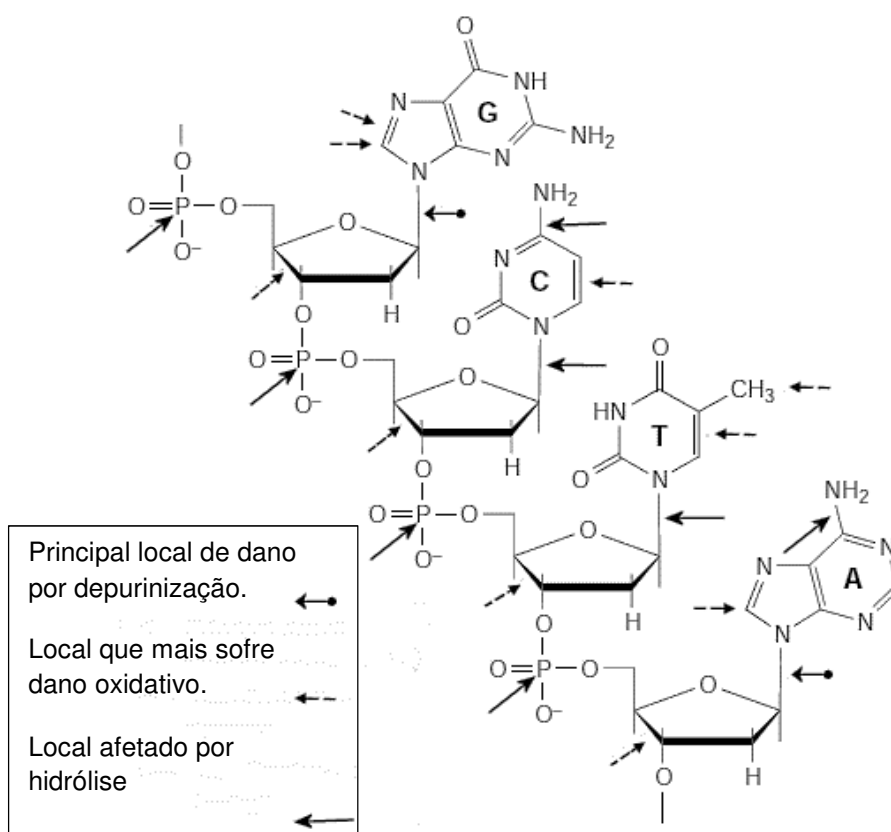


Figura 27 - Um pequeno segmento de uma vertente da dupla hélice do DNA com as quatro bases comuns. Os principais sítios de danos são indicados por setas. (G), guanina; (C), citosina; (T), timina; e (A), adenina. Modificado de Hofreiter *et al.* (2001).

A amplificação por PCR das amostras utilizadas neste trabalho, que só funcionavam via reamplificação (PCRs em sequencia), estava provavelmente sendo prejudicada pela competição entre pequenos fragmentos e iniciadores pelos recursos da reação, como descrito acima. Uma forma de resolver essa questão seria eliminar os fragmentos pequenos. Por outro lado, se os pequenos fragmentos competem com os iniciadores, logo, eles podem funcionar como tal. Dai surgiu a ideia de fazer um PCR sem iniciadores e permitir que esses pequenos fragmentos se alongassem. Uma técnica parecida, cujo objetivo era produzir um fragmento de 1800pb a partir de dois fragmentos menores já existia e foi descrita como polimerização reconstitutiva por Golenberg *et al.* (1996). Neste trabalho apresentamos uma técnica reconstitutiva baseada em polimerização, mas com objetivo diferente, utilizando uma estratégia de amplificação diferente, apesar de a técnica aqui descrita tenha sido idealizada de forma independente e tenha um objetivo diferente é parecida com o que já havia sido descrito na literatura, desta forma optamos por manter o nome cunhado em Golenberg *et al.* (1996). Os primeiros testes mostraram que era possível amplificar amostras que antes não haviam funcionado, ou melhorar o rendimento das que já haviam sido amplificadas. Entretanto, a técnica ainda exigiria muitos testes até que se estabelecesse e validasse a metodologia para o material utilizado neste trabalho. A polimerização reconstitutiva é promissora e, visto que o protocolo foi estabelecido neste trabalho, será empregada futuramente no estudo de DNA degradado oriundo de coleções de história natural.

Outro problema encontrado foi a comunidade simbiótica, abundante, densa e diversa (revisão em TAYLOR *et al.*, 2007; WEBSTER; TAYLOR 2011). Em uma extração padrão de DNA, como a utilizada neste trabalho, não há segregação entre o que é ou não DNA de esponja. A subsequente amplificação do DNA só é um método seletivo se os iniciadores forem capazes de se ligar apenas ao DNA do organismo de interesse. Dentre os iniciadores disponíveis na literatura, úteis para amplificar organismos tão diversos quanto uma subordem inteira, nenhum deles é específico para Porifera, mesmo que tenham sido desenhados para tal (ver Figura 28). Por exemplo, se fizermos uma *blast* (busca utilizando uma sequência de DNA/proteína, a fim de encontrar sequências similares dentro do banco de sequências do GenBank do NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) com os iniciadores utilizados neste trabalho, fica evidente a capacidades de

amplificar outros filios. A tabela 10 apresenta os táxons presentes nas cinco primeiras posições retornadas nas buscas. Todos os iniciadores apresentaram, pelo menos, 50 táxons de diferentes filios com 100% de identidade em relação aos iniciadores. Em alguns casos, como exemplificado na figura 21, é visível a mistura de genomas.

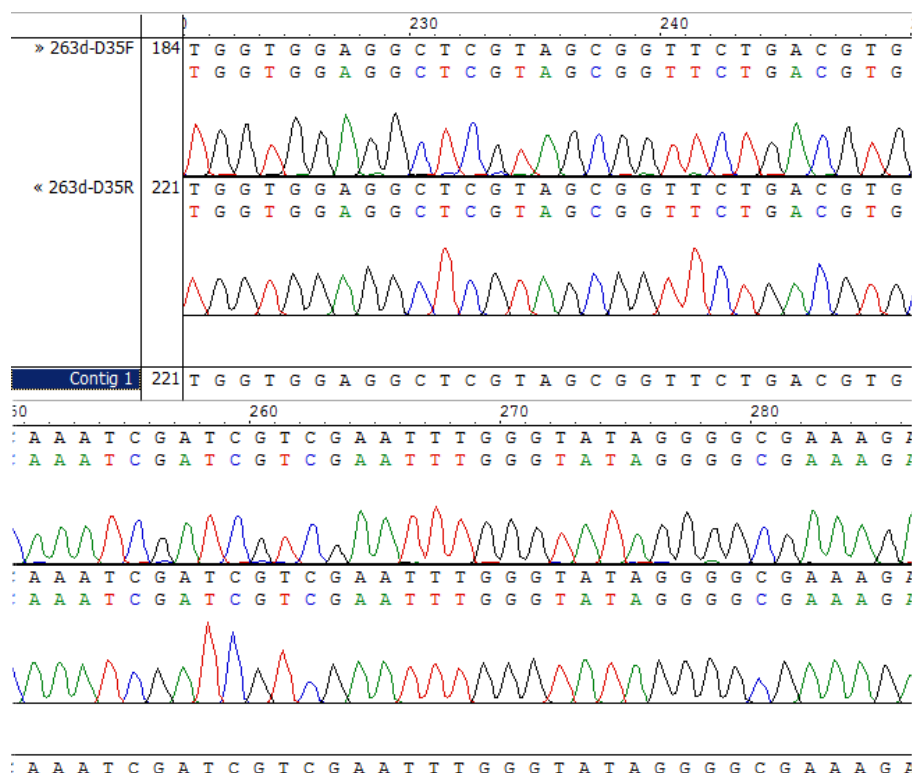


Figura 28 - Eletroferograma da sequência do espécime ID 263. O gráfico correspondente a sequência de bases está bem definido e não se percebe mistura de genomas, entretanto, a *blast* retornou identidade de 100% para um fungo. As cores correspondem as seguintes bases do DNA: preto, guanina(G); azul, citosina(C); vermelho, timina(T); e verde, adenina(A).

Tabela 10 - *Blast* dos táxons retornados na busca nas cinco primeiras posições.

Iniciador	Táxons	Identidade	Táxon superior
C'1	<i>Nelumbo nucifera</i>	100%	Nelumbonaceae (Viridiplantae)
	<i>Nelumbo nucifera</i>	100%	Nelumbonaceae (Viridiplantae)
	<i>Nelumbo nucifera</i>	100%	Nelumbonaceae (Viridiplantae)
	<i>Nelumbo nucifera</i>	100%	Nelumbonaceae (Viridiplantae)
	<i>Puntius ticto</i>	100%	Cyprinidae ("Pisces")
Ep3	<i>Terpios granulosa</i>	85%	Suberitidae (Porifera)
	<i>Suberites massa</i>	85%	Suberitidae (Porifera)
	<i>Suberites pagurorum</i>	85%	Suberitidae (Porifera)
	<i>Suberites ficus</i>	85%	Suberitidae (Porifera)
	<i>Pseudosuberites sulphureus</i>	85%	Suberitidae (Porifera)
D2R	<i>Ochrolechia androgyna</i>	100%	Pertusariaceae (Fungi)
	<i>Pertusaria pertusa</i>	100%	Pertusariaceae (Fungi)
	<i>Pertusaria amara</i>	100%	Pertusariaceae (Fungi)
	<i>Pertusaria amara</i>	100%	Pertusariaceae (Fungi)
	<i>Ochrolechia tartarea</i>	100%	Pertusariaceae (Fungi)
NL2F	<i>Tannerella forsythia</i>	100%	Proteobacterium (Bacteria)
	<i>Brucella canis</i>	100%	Bacteroidetes (Bacteria)
	<i>Brucella canis</i>	100%	Bacteroidetes (Bacteria)
	<i>Brucella abortus</i>	100%	Bacteroidetes (Bacteria)
	<i>Brucella abortus</i>	100%	Bacteroidetes (Bacteria)
NL2R	<i>Miracinae sp.</i>	100%	Hymenoptera (Arthropoda)
	<i>Microtypus wesmaelii</i>	100%	Hymenoptera (Arthropoda)
	<i>Epsilogaster sp</i>	100%	Hymenoptera (Arthropoda)
	<i>Rhysipolis sp</i>	100%	Hymenoptera (Arthropoda)
	<i>Meteoridea sp</i>	100%	Hymenoptera (Arthropoda)
RD3a	<i>Fredericella sultana</i>	100%	Fredericellidae (Bryozoa)
	<i>Lecidea fuscoatra</i>	100%	Lecideaceae (Fungi)
	<i>Uncultured Glomus</i>	100%	Glomerales (Fungi)
	<i>Uncultured Glomus</i>	100%	Glomerales (Fungi)
	<i>Periplaneta americana</i>	100%	Neoptera (Arthropoda)
RD5B2	<i>Marasmius siccus</i>	100%	Agaricomycetidae (Fungi)
	<i>Marasmius</i>	100%	Agaricomycetidae (Fungi)
	<i>Clavaria neonigrita</i>	100%	Agaricomycetidae (Fungi)
	<i>Lophiostoma compressum</i>	100%	Pleosporomycetidae (Fungi)
	<i>Lophiostoma compressum</i>	100%	Pleosporomycetidae (Fungi)
Por28S-830F	<i>Brachypodium distachyon</i>	100%	Brachypodieae (Viridiplantae)
	<i>Brachypodium distachyon</i>	100%	Brachypodieae (Viridiplantae)
	<i>Brachypodium distachyon</i>	100%	Brachypodieae (Viridiplantae)
	<i>Brachypodium distachyon</i>	100%	Brachypodieae (Viridiplantae)
	<i>Brachypodium distachyon</i>	100%	Brachypodieae (Viridiplantae)
Por28S-1520R	<i>Schizoporella dunkeri</i>	100%	Membraniporoidea (Bryozoa)
	<i>Conopeum reticulum</i>	100%	Schizoporellidae (Bryozoa)
	<i>Umbonula littoralis</i>	100%	Umbonulidae (Bryozoa)
	<i>Bugula plumosa</i>	100%	Buguloidea (Bryozoa)
	<i>Callopora lineata</i>	100%	Calloporoidea (Bryozoa)

Para os problemas descritos, aumentar a temperatura de pareamento dos iniciadores ou aplicar a estratégia de *touchdown* (consiste em configurar os primeiros ciclos de amplificação da PCR para temperatura altas de pareamento e decrescer até a temperatura ótima, com o intuito de aumentar o número de cópias do DNA de interesse, sobrepujando a amplificação do DNA não alvo, de simbiontes, por exemplo) não apresentaram resultados satisfatórios. Outra saída seria a clonagem, porém para este trabalho esta opção foi julgada inapropriada, haja vista o aumento nos custos e no tempo de execução para obtenção das sequências. Utilizando os resultados obtidos neste trabalho associados aos de outros trabalhos, principalmente os de Morrow *et al.* (2011), há neste momento sequências de Mycalina suficientes para servir de base para o delineamento de iniciadores mais específicos, diferentemente de quando este trabalho foi iniciado.

5.3 Filogenia Molecular

Foram feitas análises com base em quatro métodos de reconstrução, Máxima Parcimônia (MP), Bayesiana (BA), *Neighbor Joining* (NJ), Máxima Verossimilhança (ML, do inglês “Maximum Likelihood”) e evolução mínima (ME, do inglês “Minimum Evolution”). A amostragem de táxons incluiu membros de quatro Famílias de Mycalina: Esperipsidae, Desmacellidae, Mycalidae e Podospongiidae, além de espécies das ordens Hadromerida e Haplosclerida.

O gênero *Mycale* se mostrou monofilético em todas as metodologias de reconstrução utilizadas, corroborando os resultados de Kober e Nichols (2007) e Mitchell *et al.* (2011). A sequência AY026376 identificada como *M. fibrexilis* no GenBank, provavelmente não é uma *Mycale*, como pudemos observar em análises preliminares, desta forma não considere a mesma para efeito de comparação. Loh *et al.* (2011) utilizaram diversas sequências de espécies de *Mycale* para estudar a variabilidade morfológica de *Mycale laevis*. Um possível monofiletismo do gênero não pôde ser inferido, haja vista a falta de outros táxons de Mycalina na análise daqueles autores. Entretanto, minhas análises filogenéticas utilizando dados morfológicos sugerem o monofiletismo tanto do gênero *Mycale* quanto da Família Mycalidae (Figuras 22 a 26).

A Família Desmacellidae foi representada por dois gêneros, *Desmacella* e *Biemna*. Nenhuma de nossas análises, sejam morfológicas ou moleculares, corroboraram o monofiletismo da Família e põe em dúvida a sua posição dentro da Subordem Mycalina. Os dados mostram cinco espécies de *Biemna* formando um clado, cuja posição é basal em relação às demais Mycalina em ME, ML e NJ, porém bem aninhada na subordem através de BA e MP. É possível que este gênero não pertença à Mycalina, porém minhas análises não exploraram amplamente outras (sub)ordens, o que torna prematura qualquer conjectura acerca de suas afinidades. Em Kober e Nichols (2007), a única Desmacellidae utilizada, uma *Neofibularia*, aparece como um grupo interno de Hadromerida. Em Morrow *et al.* (2011), a topologia baseada no marcador COI apresenta *Biemna* e *Neofibularia* formando um clado cuja posição é fora de Poecilosclerida, numa politomia com diversas ordens de Porifera. Já a topologia baseada em 28S dos mesmos autores, apresenta *Biemna* como uma Tetractinellida e *Desmacella* aparecem agrupada com outras Mycalina, entretanto no clado denominado por esses autores como Poecilosclerida, há uma mistura grande entre as três Subordens. Desta forma, a organização interna deste clado parece pouco verossímil, a informação que julgo confiável, com base nos índices de probabilidade posterior e *bootstrap*, é a inclusão de *Desmacella* em Poecilosclerida. Em Mitchell *et al.* (2011), uma espécie de *Biemna* se agrupa com uma espécie de *Sigmaxinella*, e outra espécie se agrupa com *Neofibularia*; este último agrupamento é bem suportado e tem como grupo irmão um clado que reúne as ordens Spirophorida e Halichondrida.

O polifiletismo de *Desmacellidae*, bem como a estreita relação de *Neofibularia* com *Biemna* e a relação distante destes com *Desmacella*, são corroborados pelos dados morfológicos e moleculares apresentados aqui. Por outro lado, os dados morfológicos deixam em dúvida a posição de *Desmacella* dentro de Poecilosclerida. Os dados moleculares mostram *Desmacella* agrupada com uma espécie da Ordem Hadromerida, mas a sua posição dentro de Mycalina é bem suportada pela MP (Figura 22), NJ (Figura 24), ML (Figura 25) e ME (Figura 26). Desta forma acredito que *Desmacella*, seja de fato uma Poecilosclerida.

Os gêneros *Biemna* e *Neofibularia* provavelmente não são Poecilosclerida, contudo suas posições não são claras; já que há dados que corroboram sua estreita relação com a Ordem Hadromerida, a Família Axinellidae (Ordem Halichondrida) e / ou Tetractinellida (Ordens Spirophorida +Astrophorida). Na minha interpretação, este

último grupo parece ser o candidato mais plausível, já que se aceitarmos *Biemna* e *Neofibularia* como Hadromerida ou Axinellidae, implica em aceitar também o surgimento independente das sigmas. Por outro lado, Spirophorida possui uma microsclera espinada chamada sigmaspira, amplamente difundida na ordem. A posição de *Biemna* e *Neofibularia* na base de Tetractinellida permitiria a interpretação das sigmas, destes gêneros, como sigmaspiras lisas, com posterior desenvolvimento de microespiniação na Ordem Spirophorida. O valor sinapomórfico das sigmas de Poecilosclerida e Haplosclerida seria mantido e Tetractinellida ganharia mais uma sinapomorfia, bem como a origem das sigmaspiras estaria mais clara. Entretanto, esta hipótese precisa ser testada com dados independentes a fim de ser corroborada ou refutada.

As análises moleculares mostram que os gêneros de Podospongiidae não se agruparam e aparecem em posições díspares nas topologias. *Negombata* aparece sempre agrupada com *Hamacantha* (Hamacanthidae), um agrupamento difícil de explicar. Morfologicamente são muito distintos e acredito que seja um artefato. McCormack *et al.* (2002) e Nichols (2005) relataram agrupamentos claramente anômalos gerados por sequências de 28S, por exemplo, neste último autor, o aninhamento de *Geodia* (Astrophorida) dentro do Clado Poecilosclerida.

Sigmoceptrella normalmente aparece na base do clado que reúne Esperlopsidae, *Desmacella*, *Hamacantha* e *Negombata*, já *Diacarnus* aparece normalmente associado a *Mycale*. Neste ponto os dados moleculares e morfológicos estão em completo desacordo, por outro lado, eles concordam que Podospongiidae é uma Mycalina e não mais deveria ser considerada uma Família *incertae sedis*, estes dados corroboram os dados apresentados em Morrow *et al.* (2011).

A Família Esperlopsidae está representada por três gêneros e normalmente aparece como monofilética nas topologias baseadas em dados moleculares, contrariando a maioria dos dados morfológicos. Entretanto, o gênero *Amphilectus* aparece como polifilético, com *A. fucorum* como Esperlopsidae e *A. americanus* e *Amphilectus* sp. como Haplosclerida. O gênero *Amphilectus* é polimórfico e possui características que permitem a inclusão dele na Ordem Haplosclerida ou em Poecilosclerida. O gênero possui estilos como megascleras, isoquelas palmadas e sigmas como microscleras, e o esqueleto pode ser halicondróide, reticulado ou isodictial; tal como em *Isodictya*, porém, sem as óxeas charutiformes. As sequências de DNA de *Amphilectus* sp. e *A. americanus* são muito divergentes da sequência de

A. fucorum, e desta forma é difícil aceitar que pertençam ao mesmo gênero. *Amphilectus fucorum* é a espécie tipo do gênero, assim, não posso propor a transferência do gênero para a Ordem Haplosclerida até que a identificação de todas as três espécies tenha sido minuciosamente averiguada. Caso se confirme a identificação das espécies, seria necessário revisar o gênero para determinar sua real constituição. Por outro lado, van Soest e Hajdu (2002b) já haviam levantado a suspeita de que *A. fucorum* fosse um complexo de espécies. Apesar de uma eventual identificação dos espécimes de *Amphilectus* como pertencentes a outro gênero, o simples fato de ambas possuírem quelas palmadas e terem sido alocadas em Haplosclerida, com excelente suporte, constitui um dado novo importante. Em relação aos dados morfológicos, a topologia de NJ para a filogenia de gêneros mostra *Amphilectus* como uma Haplosclerida, suportado por uma sinapomorfia, esqueleto isodictial (4:4). Desta forma, apesar de inesperado o agrupamento não é improvável.

Nunca se testou com dados moleculares a hipótese de que *Isodictya* pertence à Ordem Haplosclerida, como sugerido por Hajdu *et al.* (1994a). Uma das principais consequências deste agrupamento seria na interpretação do valor sinapomórfico das quelas. Com os dados moleculares apresentados aqui posso corroborar a interpretação da evolução destas microscleras, como proposta por estes autores, ou seja, sinapomórficas para as ordens Poecilosclerida e Haplosclerida.

Como explicitado, extrair, amplificar e sequenciar DNA degradado de um bicho que abriga o seu equivalente em massa de outros organismos é uma tarefa difícil e seu sucesso é dependente de uma série de fatores, desde a otimização dos processos à utilização de iniciadores específicos e reagentes de boa qualidade, sobretudo uma DNA polimerase com boa resistência a inibidores. Os dados moleculares aqui apresentados além de mostrar um pouco da evolução de *Mycalina*, mostra que análises robustas necessitam de um número maior de sequências maiores, entretanto de um gene ou região do DNA com uma taxa evolutiva adequada para responder a pergunta alvo. Novas sequências e regiões adicionais do LSU devem ser exploradas em associação com as aqui apresentadas afim de ter um panorama mais claro da evolução molecular de *Mycalina*.

6 CONCLUSÕES

Segundos os dados morfológicos e moleculares discutidos neste trabalho concluimos que:

As famílias Cladorhizidae, Guitarridae e Mycalidae são monofiléticas.

A Família Hamacanthidae é monofilética e a série de transformação sigmancistra > cirtancistra > diancistra > clavidisco se confirmou segundo os dados morfológicos.

A posição da Família Podospongiidae dentro de Mycalina é bem corroborada porém precisa ser melhor estudada com dados moleculares para determinar, ou não, o seu monofiletismo.

Esperiopsidae precisa ser melhor estudada com base em dados morfológicos e o Gênero *Amphilectus* precisa ser revisado, provavelmente uma parte deste seria melhor alocado em Haplosclerida.

Isodictyidae provavelmente não é uma Mycalina e deveria ser transferida para Haplosclerida.

A Família Desmacellidae não é monofilética, bem como *Biemna* e *Neofibularia*, provavelmente, não são Poecilosclerida e deveriam ser transferidas para uma posição próxima de Tetractinellida. *Desmacella* é uma Mycalina com posição basal na Subordem. Os demais gêneros precisam ser estudados com base em dados moleculares.

A Ordem Haplosclerida provavelmente é o grupo irmão da Ordem Poecilosclerida e a série de transformação sigmas > quelas foi observada com base em dados morfológicos e moleculares.

A Subordem Mycalina não é monofilética como definida em Hajdu e van Soest (2002a).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDIS, J. S.; PETERSON, K. J. Phylogenetic relationships of freshwater sponges (Porifera, Spongillina) inferred from analyses of 18S rDNA, COI mtDNA, and ITS2 rDNA sequences. *Zoologica Scripta*, v. 34, n. 6, p. 549-557, 2005.
- ALJANABI, S.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 15 1997.
- ALVAREZ, B.; CRISP, M. D.; DRIVER, F.; HOOPER, J. N. A.; VAN SOEST, R. W. M. . Phylogenetic relationships of the family Axinellidae (Porifera: Demospongiae) using morphological and molecular data. *Zoologica Scripta*, v. 29, n. 2, p. 169-198, 2000.
- ARCHIBALD, J. K.; MORT, M. E.; CRAWFORD, D. J. Bayesian inference of phylogeny : a non-technical primer. *Taxon*, Vol. 52, No. 2, p. 187-191, 2003.
- BERGQUIST, P. R. The Marine Fauna of New Zealand: Porifera, Demospongiae, Part 2 (Axinellida and Halichondrida). *New Zealand Oceanographic Institute Memoiry*, v. 197, n. 51, p. 1-85, 1970.
- BERGQUIST, P. R. Sponges. California: University of California Press, 1978. p. 268.
- BERGQUIST, P. R. The ordinal and subclass classification of the Demospongiae (Porifera); appraisal of the present arrangement, and proposal of a new order. *New Zealand journal of zoology*, v. 7, n. 1, p. 1-6, 1980.
- BERGQUIST, P. R.; FROMONT, J. The marine fauna of New Zealand: Porifera, Demospongiae, Part 4 (Poecilosclerida). *New Zealand Oceanographic Institute Memoir*, n. 96, p. 1-197, 1988.
- BOETIUS, A.; SCHEIBEJ, S.; TSELEPIDES, A.; THIEL, H. Microbial biomass and activities in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean: trenches are benthic hotspots. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, v. 43, n. 9, p. 1439-1460, 1996.
- BORCHIPELLINI, C.; BOURY-ESNAULT, N.; VACELET, J; PARCO, Y. LE. Phylogenetic analysis of the Hsp70 sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Molecular biology and evolution*, v. 15, n. 6, p. 647-655, 1998.
- BORCHIPELLINI, C.; CHOMBARD, C.; LAFAY, B. Molecular systematics of sponges (Porifera). *Hydrobiologia*, v. 420, n. 1, p. 15-27, 2000.
- BORCHIPELLINI, C.; CHOMBARD, C.; MANUEL, M. *et al.* Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 32, n. 3, p. 823-37, 2004.

BORCHIPELLINI, C.; MANUEL, M.; ALIVON, E. *et al.* Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 14, n. 1, p. 171-179, 2001.

BOURY-ESNAULT, N.; SOLE-CAVA, A. Recent contributions of genetics to the study of sponge systematics and biology. *Bolletino dei Musei de l'Istituto di Biologia della Universita di Genova*, v. 68, p. 3-18, 2004.

BOWERBANK, J. S. A Monograph of the British Spongiadae. Volume 1. Londres: Ray Society, 1864. p. i-xx, 1-290, pls I-XXXVII.

BURTON, M. Sponges. *Discovery Reports* 6, p. 237-392, pls 48-57, 1932.

BURTON, M. Sponges. *Scientific Reports of the Great Barrier Reef Expedition 1928-29*, v. 4, n. 14, p. 513-621, pls 1-2, 1934.

BURTON, M. Sponges. *Scientific Reports. John Murray Expedition 1933-1934*. Londres: British Museum (Natural History). p. 159-281. 1959.

CALENDINI, F.; MARTIN, J. F. PaupUP v1. 0.3. 1: A Free Graphical Frontend for Paup* Dos Software. URL: <http://www.agro-montpellier.fr/sppe/Recherche/JFM/PaupUp/main.htm>. [S.l.]: URL: <http://www.agro-montpellier.fr/sppe/Recherche/JFM/PaupUp/main.htm>. Disponível em: <URL: <http://www.agro-montpellier.fr/sppe/Recherche/JFM/PaupUp/main.htm>>, 2005

CARBALLO, J. L.; CRUZ-BARRAZA, J. A. A revision of the genus *Mycale* (Poecilosclerida: Mycalidae) from the Mexican Pacific Ocean. *Contributions to Zoology*, v. 79, n. 4, p. 165-191, 2010.

CARBALLO, J. L.; HAJDU, E.; OTHERS. Micromorphology in *Mycale* taxonomy (Mycalidae, Poecilosclerida, Demospongiae), with the description of two new micracanthoxea-bearing species. *Contributions to Zoology*, v. 67, n. 3, p. 187-195, 1998.

CARTER, H. J. IX.— A descriptive account of the freshwater sponges (genus *Spongilla*) in the Island of Bombay, with observations on their structure and development. *Journal of Natural History Series 2*, v. 4, n. 20, p. 81-100, 1849.

CARTER, H. J. I.— Notes introductory to the study and classification of the Spongida. *Journal of Natural History Series 4*, v. 16, n. 91, p. 126-145, 177-200, 1875.

CHOMBARD, C.; BOURY-ESNAULT, N.; SIMON, C. Reassessment of Homology of Morphological Characters in Tetractinellid Sponges Based on Molecular Data. *Systematic Biology*, v. 47, n. 3, p. 351-366, 1 set 1998.

COLLINS, A. G. Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of Bilateria: An analysis of 18S rRNA molecular evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 26, p. 15458-15463, 22 dez 1998.

- COLLINS, A. G.; SCHUCHERT, P.; MARQUES, A. C. *et al.* Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic biology*, v. 55, n. 1, p. 97-115, 2006.
- DENDY, A. Report on the sponges collected by Professor Herdman, at Ceylon, in 1902. In: HERDMAN, W. A. (Ed.). Report to the Government of Ceylon on the Pearl Oyster Fisheries of the Gulf of Manaar. Londres: Royal Society, 1905. p. 57-246, pls I-XVI.
- DENDY, A. The tetraxonid sponge spicule: a study in evolution. *Acta Zoologica*, v. 2, p. 95-152, 1921.
- DOHRMANN, M.; VOIGT, O.; ERPENBECK, D.; WÖRHEIDE, G. Non-monophyly of most supraspecific taxa of calcareous sponges (Porifera, Calcarea) revealed by increased taxon sampling and partitioned Bayesian analysis of ribosomal DNA. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 40, n. 3, p. 830-43, 2006.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- DRUMMOND, A. J.; ASHTON, B.; BUXTON, S. *et al.* Geneious Pro. . [S.l.]: <http://www.geneious.com/>. Disponível em: <[?http://www.geneious.com/??>](http://www.geneious.com/??>), 2011.
- DUCHASSAING, P.; MICHELOTTI, G. Spongiaires de la mer Caraibe, par P. Duchassaing de Fonbressin et Gioni Michelotti. [S.l.]: Harlem, 1864. p. 115, 25 pl
- EDRADA, R. A.; PROKSCH, P.; WRAY, V. *et al.* Four new bioactive manzamine-type alkaloids from the Philippine marine sponge *Xestospongia ashmorica*. *Journal of natural products*, v. 59, n. 11, p. 1056-60, 1996.
- ERESKOVSKY, A. V.; WILLENZ, P. *Esperiopsis koltuni* sp. nov. (Demospongiae: Poecilosclerida: Esperiopsidae), a carnivorous sponge from deep water of the Sea of Okhotsk (North Pacific). *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, v. 87, n. 06, p. 1379-1386, 2007.
- ERPENBECK, D.; BREEUWER, J. A. J.; VAN SOEST, R. W. M. Implications from a 28S rRNA gene fragment for the phylogenetic relationships of halichondrid sponges (Porifera: Demospongiae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 43, n. 2, p. 93-99, 2005a.
- ERPENBECK, D.; BREEUWER, J. A. J.; VAN SOEST, R. W. M. Identification, characterization and phylogenetic signal of an elongation factor-1 alpha fragment in demosponges (Metazoa, Porifera, Demospongiae). *Zoologica Scripta*, v. 34, n. 4, p. 437-445, 2005b.

ERPENBECK, D.; DURAN, S.; RÜTZLER, K. *et al.* Towards a DNA taxonomy of Caribbean demosponges: a gene tree reconstructed from partial mitochondrial CO1 gene sequences supports previous rDNA phylogenies and provides a new perspective on the systematics of Demospongiae. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, v. 87, n. 06, p. 1563-1570, 2007.

GOLENBERG, E. M.; BICKEL, A.; WEIHS, P. Effect of Highly Fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 24, n. 24, p. 5026-5033, 1996.

GOLOBOFF, P. A.; FARRIS, J. S.; NIXON, K. C. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, v. 24, n. 5, p. 774-786, 2008.

GRAHAM, E. A. M. DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, v. 3, n. 3, p. 221-225, 2007.

GRANT, R. E. Animal Kingdom. In: TODD, R. B. (Ed.). *The Cyclopaedia of Anatomy and Physiology*. London: Sherwood, Gilbert and Piper, 1836. p. 107-118.

GRAY, J. E. Notes on the arrangement of sponges, with the description of some new genera. *Proceedings of the Zoological Society of London. Anais.* [S.l.: s.n.], 1867.

GRAY, J. E. XLVIII. Notes on the classification of the sponges. *Journal of Natural History Series 4*, v. 9, n. 54, p. 442-461, 1872.

HAJDU, E. A phylogenetic interpretation of hamacanthids (Demospongiae, Porifera), with the redescription of *Hamacantha popana*. *Journal of Zoology*, v. 232, n. 1, p. 61-77, 1994.

HAJDU, E. Macroevolutionary Patterns Within the Demosponge Order Poecilosclerida. Phylogeny of the marine cosmopolitan genus *Mycale*, and an integrated approach to biogeography of the seas. [S.l.]: University of Amsterdam, 1995.

HAJDU, E. Toward a phylogenetic classification of the Mycalids with anisochelae (Demospongiae: Poecilosclerida), and comments on the status of *Naviculina* Gray, 1867. *Memoirs of the Queensland Museum*, v. 44, p. 225-238, 1999.

HAJDU, E. Family Hamacanthidae Gray , 1872. In: HOOPER, J. N. A.; VAN SOEST, R. W. M. (Eds.). *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponge*. Nova lorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. v. 1864p. 665-668.

HAJDU, E.; DESQUEYROUX-FAUNDEZ, R. A synopsis of South American *Mycale* (*Mycale*) (Poecilosclerida, Demospongiae), with description of three new species and a cladistic analysis of Mycalidae. *Revue Suisse De Zoologie*, v. 101, n. 3, p. 563-600, 1994.

HAJDU, E.; LÔBO-HAJDU, G. Family Isodictyidae Dendy , 1924. In: HOOPER, J. N. A.; VAN SOEST, R. W. M. (Eds.). *Systema Porifera: a guide to the classification of sponges*, Volume 2. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2002. p. 703-706.

HAJDU, E.; VAN SOEST, R. W. M. Family Desmacellidae Ridley & Dendy, 1886. In: HOOPER, JOHN N. A.; VAN SOEST, ROB W. M. (Eds.). *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002A. v. 2p. 642-650.

HAJDU, E.; VAN SOEST, R W M. Family Merliidae Kirkpatrick , 1908. In: HOOPER, J N A; VAN SOEST, R W M (Eds.). *Systema Porifera A Guide to the Classification of Sponges*. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002B. v. 2p. 691-693.

HAJDU, E.; VACELET, J. Family Cladorhizidae Dendy, 1922. In: HOOPER, J N A; VAN SOEST, R W M (Eds.). *Systema Porifera A Guide to the Classification of Sponges*. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. v. 2p. 636-641.

HAJDU, E.; WEERDT, W. H. DE; VAN SOEST, R W M. Affinities of the "Mermaid's Glove" sponge *Isodicta palmata*, with a discussion on the synapomorphic value of chelae microscleres. In: VAN SOEST, R W M; KEMPEN, T. M. G.; BRAEKMAN, J. C. (Eds.). *Sponges in Time and Space*. Rotterdam: Balkema, 1994A. p. 141-150.

HAJDU, E.; VAN SOEST, R W M; HOOPER, J N A. Proposal for a phylogenetic subordinal classification of poecilosclerid sponges. In: VAN SOEST, R W M ; KEMPEN, T. M. G.; BRAEKMAN, J. C. (Eds.). *Sponges in Time and Space*. Rotterdam: Balkema, 1994B. p. 123-139.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*. Anais. [S.l: s.n.], 1999

HARTMAN, W. D. Porifera. In: PARKER, S. P. (Ed.). *Synopsis and Classification of Living Organisms*. New York: McGraw-Hill, 1982. p. 641-666.

HENTSCHEL, E. Erste Unterabteilung der Metazoa: Parazoa, Porifera- Schwämme. In: KÜKENTHAL, W.; KRUMBACH, T. (Eds.). *Handbuch der Zoologie. Eine Naturgeschichte der Stämme des Tierreiches. Vol. 1, Protozoa, Porifera, Coelenterata, Mesozoa*. Berlin, Leipzi: Walter de Gruyter und Co, 1923. v. 1p. 307-418.

HOFREITER, M. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 23, p. 4793-4799, 2001.

HOOPER, J N A. *Sigmaxinella soelae* and *Desmacella ithystela*, two new desmacellid sponges (Porifera, Axinellida, Desmacellidae) from the Northwest shelf of western Australia, with a revision of the family Desmacellidae. *Northern Territory Museum of Arts and Sciences, Monograph Series*, v. 2, p. 1-58, 1984.

HOOPER, J N A; LÉVI, C. *Esperiopsis desmophora* n. sp. (Porifera: Demospongiae): a desma-bearing Poecilosclerida. *Memoirs of the Queensland Museum*, v. 27, n. 2, p. 437-441, 1989.

HOOPER, J N A; VAN SOEST, R W M. Systema Porifera: a guide to the classification of sponges. [S.l.]: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. v. 2p. 1113.

HOSHINO, T. *Merlia tenuis* n. sp. Encrusting Shell Surfaces of Gastropods, *Chicoreus*, from Japan. In: RÜTZLER, K. (Ed.). New Perspectives in Sponge Biology. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1990. p. 295-301.

HÖSS, M.; PÄÄBO, S. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. Nucleic Acids Research, v. 21, n. 16, p. 3913, 1993.

ICHIBA, T.; CORGIAT, J. M.; SCHEUER, P. J.; KELLY-BORGES, M. 8-Hydroxymanzamine A, a beta -carboline alkaloid from a sponge, *Pachypellina* sp. Journal of Natural Products, v. 5, n. 1, p. 168-170, 1994.

ICHIBA, T.; SAKAI, R.; KOHMOTO, S.; SAUCY, G.; HIGA, T. New manzamine alkaloids from a sponge of the genus *Xestospongia*. Tetrahedron Letters, v. 29, n. 25, p. 3083-3086, 1988.

JOB, G.; HAESLER, A. VON; STRIMMER, K. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. BMC evolutionary biology, v. 4, p. 18, 2004.

KELLY, M.; SAMAAI, T. Family Podospongiidae De Laubenfels , 1936. In: HOOPER, J N A; VAN SOEST, R W M (Eds.). Systema Porifera A Guide to the Classification of Sponges. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. v. 1p. 694-702.

KELLY-BORGES, M.; VACELET, J. A revision of *Diacamus* Burton and *Negombata* de Laubenfels (Demospongiae: Latrunculiidae) with descriptions of new species from the west central Pacific and the Red Sea. Memoirs of Queensland Museum, v. 38, p. 477-504, 1995.

KIRKPATRICK, R. Memoirs: On *Merlia normani*, a Sponge with a Siliceous and Calcareous Skeleton. Quarterly Journal of Microscopical Science, v. 56, n. 4, p. 657-702, 1911.

KOBAYASHI, J.; TSUDA, M.; KAWASAKI, N. 6-Hydroxymanzamine A and 3,4-hydroxymanzamine A, new alkaloids from the Okinawan marine sponge *Amphimedon* sp. Journal of Natural Product, v. 57, p. 1737-1740, 1994.

KOBER, K. M.; NICHOLS, S. A. On the phylogenetic relationships of hadromerid and poecilosclerid sponges. Journal of the Marine Biological Association of the UK, v. 87, n. 06, 2007.

KONDO, K.; SHIGEMORI, H.; KIKUCHI, Y. *et al.* Ircinins A and B from the Okinawan marine sponge *Ircinia* sp.: plausible biogenetic precursors of manzamine alkaloids. The Journal of Organic Chemistry, v. 57, n. 8, p. 2480-2483, 1992.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics (Oxford, England), v. 23, n. 21, p. 2947-8, 2007.

LAUBENFELS, M. W. DE. A discussion of the sponge fauna of the Dry Tortugas in particular and the west Indies in general, with material for a revision of the families and orders of the Porifera. Publications of the Carnegie Institute, v. 30, p. 1-225, 1936.

LEVINSEN, G. M. R. Studier over svampe-spicula: cheler og ankere. Kjøbenhavn: B. Lunos Kgl. hof-bogtrykkeri (F. Dreyer), 1893. p. 1-20

LOH, T.-L.; LÓPEZ-LEGENTIL, S.; SONG, B.; PAWLIK, J. R. Phenotypic variability in the Caribbean Orange Icing sponge *Mycale laevis* (Demospongiae: Poecilosclerida). Hydrobiologia, 2011.

LOPES, D. A.; HAJDU, E. Two new Mycalina from the south-eastern Brazilian shelf and slope collected by Programme REVIZEE (Poecilosclerida: Demospongiae). Journal of the Marine Biological Association of the UK, v. 84, n. 1, p. 25-28, 2004.

LUNDBECK, W. Porifera. (Part I.) Homorrhaphidae and Heterorrhaphidae. The Danish Ingolf- Expedition. Copenhagen ed. [S.l.]: Bianco Luno, 1902. p. 1–108, pls I–XIX, 1 map.

LUNDBECK, W. Porifera. (Part II.) Desmacidonidae (pars.). The Danish Ingolf- Expedition. Copenhagen: Bianco Luno, 1905. p. 1-219, pls I-XX.

LUNDBECK, W. Porifera. (Part III.) Desmacidonidae (pars.). The Danish Ingolf- Expedition. Copenhagen: Bianco Luno, 1910. p. 1-124, pls I-XI, 1 table.

LÉVI, C. Les clavaxinellides Démosponges Tétractinomorphes. Archives de Zoologie Expérimentale Générale. Notes et Revue, v. 92, n. 2, p. 78-87, 1955.

LÉVI, C. Spongiaires des côtes de Madagascar. Mémoires de le Institut scientifique de Madagascar, v. A, n. 10, p. 1-23, 1956.

LÉVI, C. Systématique de la classe des Demospongiaria (Démosponges). In: GRASSÉ, P. (Ed.). Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Spongiaires. Paris: Massonet Cie Paris, 1973. v. 3p. 577-631.

LÉVI, C.; LÉVI, P. Démosponges bathyales récoltées par le N/O guillemotleft Vauban guillemotright au Sud de la Nouvelle-Calédonie. Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle. Section A, Zoologie, biologie et écologie animales, v. 5, n. 4, p. 931-997, 1983.

LÔBO-HAJDU, G.; GUIMARÃES, A. C. R.; SALGADO, A. *et al.* Intragenomic, Intra- and Interspecific variation in the rDNA ITS of Porifera revealed by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). Bollettino dei Musei degli Istituti Biologici dell' Università' di Genova, v. 68, p. 413-423, 2004.

MADDISON, D. R.; MADDISON, W. P. McClade 4.05. . Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc., 2000.

- MALDONADO, M.; BENITO, J. *Crambe tuberosa* n. sp. (Demospongiae, Poecilosclerida): a new Mediterranean poecilosclerid with lithistid affinities. *Cahiers de Biologie Marine*, v. 32, n. 3, p. 323-332, 1991.
- MALDONADO, M.; CARMONA, M. C.; URIZ, M. J.; CRUZADO, A. Decline in Mesozoic reef-building sponges explained by silicon limitation. *Nature*, v. 401, n. 6755, p. 785-788, 1999.
- MANUEL, M.; BORCHIELLINI, C.; ALIVON, E. *et al.* Phylogeny and Evolution of Calcareous Sponges: Monophyly of Calcinea and Calcaronea, High Level of Morphological Homoplasy, and the Primitive Nature of Axial Symmetry. *Systematic Biology*, v. 52, n. 3, p. 311-333, 2003.
- MARSHAL, W. Ideen über die Verwandtschaftsverhältnisse der Hexactinelliden. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, v. 27, n. 1, p. 113-136, 1876.
- MCCORMACK, G. P.; ERPENBECK, D.; VAN SOEST, R W M. Major discrepancy between phylogenetic hypotheses based on molecular and morphological criteria within the Order Haplosclerida (Phylum Porifera: Class Demospongiae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 40, n. 4, p. 237-240, 2002.
- MCCORMACK, G. P.; KELLY, M. New indications of the phylogenetic affinity of *Spongosorites suberitoides* Diaz *et al.*, 1993 (Porifera, Demospongiae) as revealed by 28S ribosomal DNA. *Journal of Natural History*, v. 36, n. 9, p. 1009-1021, 2002.
- MEDINA, M.; COLLINS, A. G.; SILBERMAN, J. D.; SOGIN, M. L. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 17, p. 9707-12, 2001.
- MITCHELL, K. D.; HALL, K. A. A new species of *Sigmaxinella* Dendy, 1897 (Demospongiae, Poecilosclerida, Desmacellidae) from the Tasman Sea. *Zootaxa*, v. 34, n. 2901, p. 19-34, 2011.
- MORROW, C. C.; PICTON, B.; ERPENBECK, D. *et al.* Congruence between nuclear and mitochondrial genes in Demospongiae: A new hypothesis for relationships within the G4 clade (Porifera: Demospongiae). *Molecular phylogenetics and evolution*, n. October, 2011.
- MOTHES, B.; HAJDU, E.; LERNER, C. New species of *Ulosa* and *Biemna* (Porifera, Demospongiae, Poecilosclerida) from the N-NE Brazilian continental shelf. *Bolletino di Museo e Istituto di Biologia dell'Universita di Genova*, v. 68, p. 477-482, 2004.
- NAKAMURA, H.; DENG, S.; KOBAYASHI, J. *et al.* Keramamine-A and -B, novel antimicrobial alkaloids from the Okinawan marine sponge sp. *Tetrahedron Letters*, v. 28, n. 6, p. 621-624, 1987.

NICHOLS, S. A. An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 34, n. 1, p. 81-96, 2005.

PÄÄBO, S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, n. 6, p. 1939, 1989.

PAGE, R. D. M. NDE (NEXUS data editor for windows). <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/NDE/nde.html>. [S.l.]: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/NDE/nde.html>. , 2001.

PINNA, M. C. C. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics*, v. 7, n. 4, p. 367-394, 1991.

REVEILLAUD, J.; VAN SOEST, R W M ; DERYCKE, S. *et al.* Phylogenetic relationships among NE Atlantic Plocamionida Topsent (1927) (Porifera, Poecilosclerida): under-estimated diversity in reef ecosystems. *PloS one*, v. 6, n. 2, p. 1-10 (e16533), 2011.

RIDLEY, S. O.; DENDY, A. Report on the Monaxonida collected by H.M.S. Challenger during the years 1873-1876. Report on the Scientific Results of the Voyage of H.M.S. "Challenger", 1873-1876. *Zoology*, v. 20, n. 50, p. 1-275, 1887.

SAKAI, R.; HIGA, T.; JEFFORD, C. W.; BERNARDINELLI, G. Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *Journal of the American Chemical Society*, v. 108, n. 20, p. 6404-6405, 1986.

SAMAAI, T.; GIBBONS, M. J.; KELLY, M. Morphological phylogenetic considerations on the relationships of *Isodictya* Bowerbank, 1864. *Memoirs of the Queensland Museum*, v. 44, p. 517-523, 1999.

SCHMIDT O. Grundzüge einer Spongien-fauna des atlantischen Gebietes. Leipzig: W. Engelmann, 1870. p. 1-88

SCHMIDT O. Die Fortsetzung meiner "Spongien des Meerbusens von Mexico." *Zoologische Anzeiger*, v. 2, p. 379-380, 1879.

SCHMITT, S.; HENTSCHEL, U.; ZEA, S.; DANDEKAR, T.; WOLF, M. ITS-2 and 18S rRNA gene phylogeny of Aplysinidae (Verongida, Demospongiae). *Journal of molecular evolution*, v. 60, n. 3, p. 327-36, 2005.

SIM-SMITH, C.; KELLY, M. Two new genera in the family Podospongiidae (Demospongiae: Poecilosclerida) with eight new Western Pacific species. *ZOOTAXA*, n. 2976, p. 32-54, 2011.

SOLLAS, W. J. The Group Spongiae. *Cassells Encyclopaedia*, London, v. 6, p. 312-331, 1883.

SOLLAS, W. J. Report on the Tetractinellida collected by HMS Challenger, during the years 1873-1876. Report on the Scientific Results of the Voyage of H.M.S. "Challenger", 1873–1876. Zoology, v. 25, n. 64, p. 1-458, pls I–XLIV, 1 map, 1888.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular biology and evolution, v. 24, n. 8, p. 1596-9, 2007.

TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, v. 71, n. 2, p. 295-347, 2007.

TOPSENT, E. Une réforme dans la classification des Halichondrina. v. 7, p. 1-22, 1894.

TOPSENT, E. Matériaux pour servir à l'étude de la faune des spongiaires de France. Mémoires de la Société zoologique de France, v. 9, p. 113-133, 1896.

TOPSENT, E. Spongiaires des Açores. Résultats des campagnes scientifiques accomplies par le Prince Albert I, v. 25, p. 1-280, 1904.

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

URIZ, M. J. Mineral skeletogenesis in sponges. Canadian Journal of Zoology, v. 84, n. 2, p. 322-356, 2006.

URIZ, M. J.; CARBALLO, J. L. Phylogenetic relationships of sponges with placochelae or related spicules (Poecilosclerida, Guitarridae) with a systematic revision. Zoological Journal of the Linnean Society, v. 132, n. 4, p. 411-428, 2001.

VACELET, J; KELLY, M.; SCHLACHER-HOENLINGER, M. Two new species of *Chondrocladia* (Demospongiae: Cladorhizidae) with a new spicule type from the deep south Pacific, and a discussion of the genus *Meliiderma*. Zootaxa, v. 2073, p. 57-68, 2009.

VACELET, JEAN. New carnivorous sponges (Porifera , Poecilosclerida) collected from manned submersibles in the deep Pacific. Zoological Journal of the Linnean Society, n. 2002, p. 553-584, 2006.

VACELET, JEAN. Diversity and evolution of deep-sea carnivorous sponges. Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. MR Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hadju and G. Muricy. Rio de Janeiro, Museu Nacional. [S.l: s.n.], 2007. p. 107–115.

VACELET, JEAN; BORCHIellini, C.; PEREZ, T. Morphological, chemical and biochemical characterization of a new species of sponge without skeleton (Porifera, Demospongiae) from the Mediterranean Sea. *Zoosystema*, v. 22, n. 2, p. 313-326, 2000.

VAN SOEST, R W M . Marine sponges from Curaçao and other Caribbean localities. Part III. Poecilosclerida. In: HUMMELINCK, P. W.; STEEN, L. J. DER (Eds.). *Uitgaven de Natuurwetenschappelijke Studiekring voor Suriname en de Nederlandse Antillen*. No. 112. Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean Islands. [S.l.: s.n.], 1984. v. 62p. 1-173.

VAN SOEST, R W M . Marine sponges from Curaçao and other Caribbean localities. Part III. Poecilosclerida. *Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean Islands*, v. 66, n. 199, p. 1-167, 1984.

VAN SOEST, R W M . Phylogenetic exercises with monophyletic groups of sponges. In: VACELET, J; BOURY-ESNAULT, N. (Eds.). *Taxonomy of Porifera from the N.E. Atlantic and Mediterranean Sea*. NATO ASI Series G13. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1987. v. 13p. 227-241.

VAN SOEST, R W M. Toward a phylogenetic classification of sponges. In: RUETZLER, K. (Ed.). *New perspectives in sponge biology*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1990. p. 344-350.

VAN SOEST, R W M; BEGLINGER, E. J. A new species of *Biemna* (Porifera, Poecilosclerida) from the Sultanate of Oman. *Beaufortia*, v. 52, n. 2, p. 15-24, 2002.

VAN SOEST, R. W. M.; HAJDU, E. Suborder Mycalina Hajdu, Van Soest & Hooper, 1994. In: HOOPER, J. N. A.; VAN SOEST, R. W. M. (Eds.). *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponge*. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002a. v. 2p. 633-635.

VAN SOEST, R W M; HAJDU, E. Family Mycalidae Lundbeck , 1905. In: HOOPER, J N A; VAN SOEST, R. W. M. V. (Eds.). *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponge*. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002b. v. 2p. 669-690.

VAN SOEST, R W M; HAJDU, E. Family Esperiopsidae Hentschel , 1923. In: HOOPER, J N A; VAN SOEST, R W M (Eds.). *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponge*. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002c. v. 2p. 656-664.

VAN SOEST, R W M; HOOPER, J N A; BEGLINGER, E.; ERPENBECK, D. Affinities of the family Sollasellidae (Porifera, Demospongiae). I. Morphological evidence. *Contributions to Zoology*, v. 75, 3/4, p. 133-144, 2006.

VAN SOEST, R W M.; KAISER, K. L.; SYOC, R. Sponges from Clipperton Island, East Pacific. *Zootaxa*, v. 46, n. 2839, p. 1-46, 2011.

VOSMAER, G. C. J. Spongien (Porifera). In: BRONN, H. G. (Ed.). Die Klassen und Ordnungen des Thierreichs. 2. Leipzig, Heidelberg: CF Winter, 1887. v. 2p. i–xii, 1–496, pls I–XXXIV.

WEBSTER, N. S.; TAYLOR, M. W. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environmental microbiology*, 28 mar 2011.

WIEDENMAYER, F. The Nepheliospongiidae Clarke 1900 (Demospongea, Upper Devonian to Recent), an ultraconservative, chiefly shallow-marine sponge family. *Eclogae geologicae Helvetiae*, v. 70, n. 3, p. 885-918, 1977.

WIEDENMAYER, F. Demospongiae (Porifera) from northern Bass Strait, southern Australia. *Memoirs of the Museum of Victoria*, v. 50, n. 1, p. 1-242, pls 1-38, 1989.

WÖRHEIDE, G.; NICHOLS, S. A.; GOLDBERG, J. Intragenomic variation of the rDNA internal transcribed spacers in sponges (Phylum Porifera): implications for phylogenetic studies. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 33, n. 3, p. 816-30, 2004.

WÖRHEIDE, G.; SOLÉ-CAVA, A.; HOOPER, J N A. Biodiversity, molecular ecology and phylogeography of marine sponges: patterns, implications and outlooks. *Integrative and comparative biology*, v. 45, n. 2, p. 377-85, 2005.

XIA, X. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Journal of Heredity*, v. 92, n. 4, p. 371-373, 2001.

ZIMMERMANN, J.; HAJIBABAEI, M.; BLACKBURN, D. C. *et al.* DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assessment. *Frontiers in zoology*, v. 5, p. 18, 2008.

ZITTEL, K. A. Zur Stammes-Geschichte der Spongien. Ludwig-Maximilians Universität, München, p. 1-20, 1878.