



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

Thiago Silva de Paula

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

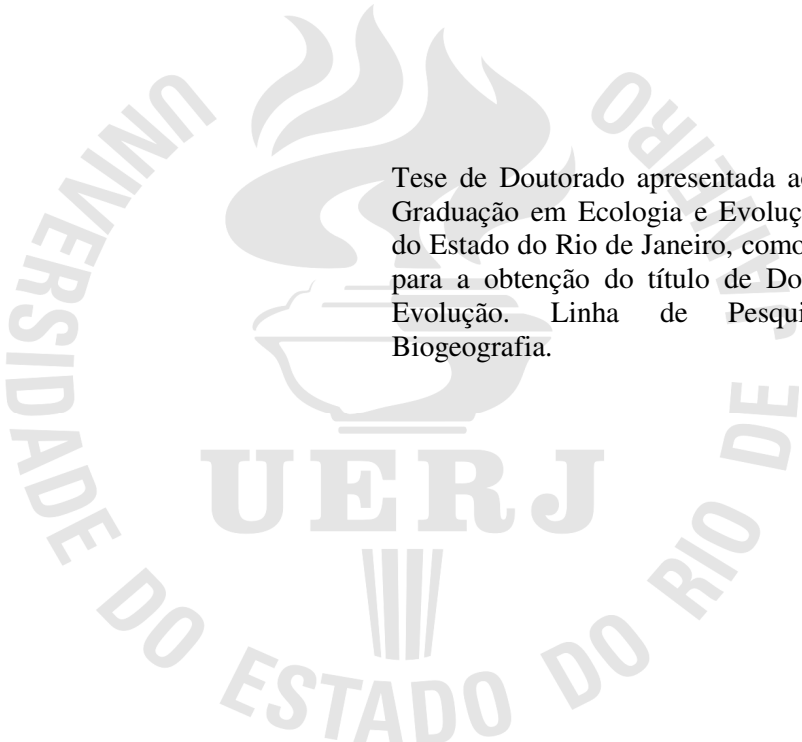
Volume 2

Rio de Janeiro  
2013

Thiago Silva de Paula

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

Volume 2



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

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Lôbo Hajdu

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Carlos Meduna Hajdu

Rio de Janeiro

2013

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

P324

De Paula, Thiago Silva

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

f: 2v.

Orientadora: Gisele Lôbo Hajdu

Coorientador: Eduardo Carlos Meduna Hajdu.

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

Inclui bibliografia.

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

CDU 575.86

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

---

Assinatura

---

Data

## SUMÁRIO

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

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

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

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

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



## 4 DA BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA

### 4.1 Introdução

#### 4.1.1 Distribuição geográficas das esponjas

As esponjas são organismos sésseis cuja capacidade dispersiva está restrita – com exceção de eventuais propagações assexuadas – à sua forma larval plantônica, a qual apresenta tempos variáveis de viabilidade na coluna d'água, sendo, na maioria dos casos, de poucos dias (MALDONADO, 2006). Adicionalmente, fatores ambientais como temperatura e salinidade limitam a atividade reprodutiva e mesmo o crescimento destes animais. Desta forma, a maioria das esponjas ocorre em áreas locais ou regionais de endemismos, cuja distribuição geográfica é um reflexo direto de suas características, onde tolerância fisiológica, período reprodutivo, produtividade e outros tantos fatores desempenham papéis cruciais em sua colonização espacial.

Devido à continuidade física das superfícies oceânicas, por muito tempo, o ambiente marinho prescindiu de barreiras dispersivas. Contudo, não só as massas de terra limitam a dispersão destes animais. Fatores como características físico-químicas de correntes marinhas, isoclinas, ressurgências, desembocaduras de rios (alterando a salinidade de áreas em torno da foz), disponibilidade e características geológicas do substrato, entre outros podem restringir a dispersão de organismos, impondo limites na área de distribuição de espécies. Estes podem ser comprovados principalmente pelo fato de que muitas espécies de esponjas serem hoje reconhecidamente introduzidas em regiões que não habitam naturalmente (e.g., COLES, 1999; 2006). Ou seja, embora estas espécies sejam capazes de habitar uma gama de ambientes diferentes, estas somente o podem fazer partir da assistência antrópica nas suas vias de dispersão.

Mas mesmo assim, ao longo de tempo evolutivo, as esponjas conseguiram se adaptar a praticamente todos os habitats marinhos, provavelmente por meio de um processo lento de especiação alopátrica. Hoje elas são encontradas, verticalmente, desde zonas eulitorais até profundidades hadais, horizontalmente, desde os trópicos até às maiores latitudes, e, localmente, desde substratos consolidados a fundos lodosos e habitats dulciaquícolas sazonais.

Padrões de distribuição abrangentes já foram propostos a partir de análises baseadas na distribuição global de espécies de demosponjas e hexactinélidas por meio do rastreamento destes táxons sobre áreas de endemismo pré-estabelecidas (VAN SOEST, 1994; TABACHNICK, 1994). Contudo, ao longo dos anos, muitos outros estudos taxonômica- e geograficamente mais restritos, com diferentes abordagens metodológicas, propuseram padrões de distribuição para estes animais (ver referências em VAN SOEST *et al.*, 2012), nos quais grandes áreas de endemismo são reconhecidas.

Mais recentemente, padrões globais de distribuição das esponjas foram publicados por van Soest e colaboradores (2012). Neste trabalho, os autores fizeram uso de uma base de dados *online* abrangente para estabelecer relações hierárquicas entre áreas em diversos níveis geográficos (reinos, províncias e ecorregiões) por meio de análises de agrupamento com base na presença e ausência de espécies nestas. Dentre os resultados encontrados, os autores identificaram agrupamentos de áreas que correspondem ou a grandes oceanos ou a uma distribuição bipolar/antitropical (Figura 4.1). Contudo, os próprios autores argumentam que os resultados obtidos provavelmente refletem o conhecimento acumulado ao longo dos anos da distribuição das espécies de esponjas, apresentando uma clara tendência amostral. Por exemplo, os reinos com menores registros de esponjas, além de agruparem juntos, apresentaram menor similaridade. Além disso, as análises de níveis geográficos inferiores (*i.e.*, províncias e ecorregiões), em geral, falharam em recuperar agrupamentos que condissessem com as áreas mais abrangentes consideradas (reino e províncias, respectivamente). Ainda, a maioria dos agrupamentos entre províncias se deu por adjacência geográfica, sendo que aquelas com um alto número de registros seguiram melhor a posição dos oceanos do que as com um número inferior de registros.

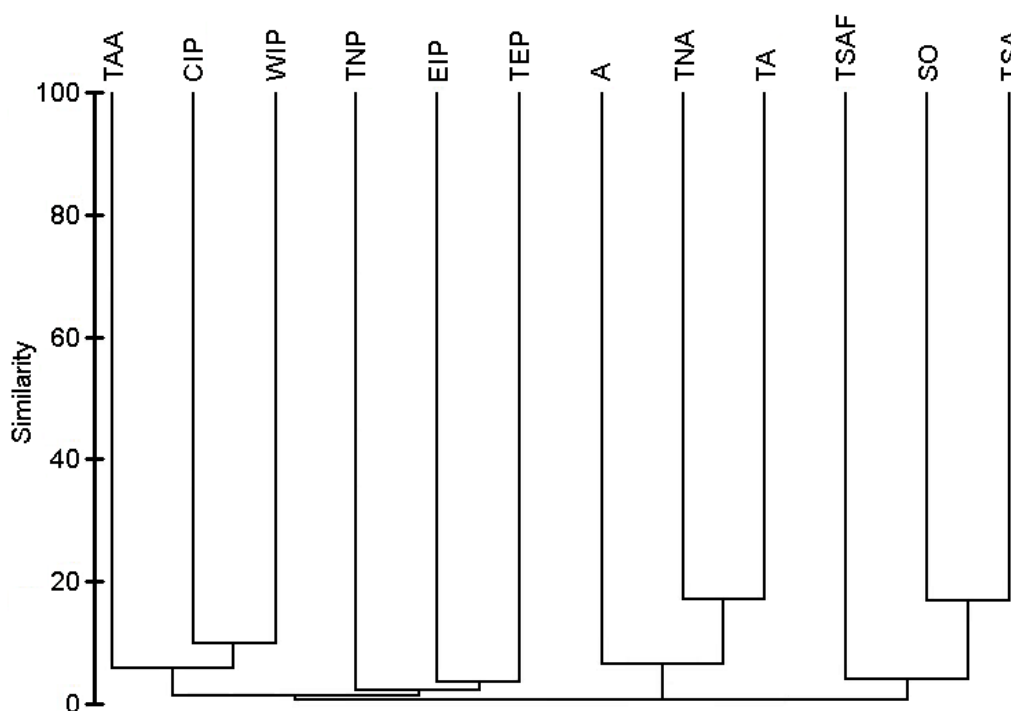


Figura 4.1. Dendrograma das relações hierárquicas entre reinos marinhos com base na distribuição geográfica de espécies obtido por van Soest e colaboradores (2012). Esta topologia foi obtida de esponjas por meio de análise de agrupamento a partir de dados de presença/ausência de espécies. As siglas correspondem às áreas: África do Sul Temperada (TSAF); América do Sul Temperada (TSA); Ártico (A); Atlântico Norte Temperado (TNA); Atlântico Tropical (TA); Australásia Temperada (TAA); Indo-Pacífico Central (CIP); Indo-Pacífico Ocidental (WIP); Indo-Pacífico Oriental (EIP); Oceano Sul (SO); Pacífico Norte Temperado (TNP); Pacífico Oriental Tropical (TEP). Redesenhado de van Soest e colaboradores (2012).

#### 4.1.2 Biogeografia de *Mycale* Gray, 1867

Embora muitos trabalhos tratem de aspectos biogeográficos de espécies ou grupos pertencentes ao gênero *Mycale* Gray, 1867 até hoje, somente um trabalho publicado propôs formalmente uma reconstrução biogeográfica para o grupo (HAJDU, 1995). Neste trabalho, o autor utilizou diferentes métodos biogeográficos para inferir às relações de áreas, como Análise de Parcimônia de Brooks (BPA, *Brooks Parsimony Analysis*; BROOKS, 1985; WILEY, 1988), Análise de parcimônia de Endemismos (PAE, *Parsimony Analysis of Endemicity*; Rosen, 1984), panbiogeografia (CROIZAT, 1958; CRAW *et al.*, 1999), e outros. Contudo, o autor focou suas discussões nos resultados obtidos pela Análise sem pressuposto (No Assumption Analysis; VAN SOEST, 1996; VAN SOEST e HAJDU, 1997) por

considerar esta mais apropriada dadas a expectativa de múltiplos padrões existirem e a natureza difusa dos reinos marinhos e sua falta de barreiras geográficas efetivas.

Hajdu (1995) encontra padrões biogeográficos considerados clássicos (Figura 4.2), como os traços trans-Pacífico, que se estendem pelo mar em dois sentido, Leste-Oeste e Norte-Sul (grupo 1), e Tethiano (grupo 2). O autor encontrou como clado irmão deste último um grupo predominante de áreas frias e temperadas (grupo 3), e apontou que as áreas 'primitivas' do grupo trans-Pacífico também correspondiam predominantemente à áreas frias/temperadas, indicando que, nestes grupos, as áreas basais correspondem a relictos Gondwanicos. Tal interpretação levaria, então, a crer que muitas das esponjas tropicais atuais são originárias de ancestrais gondwanicos. Dentro desta perspectiva, Hajdu (1999) considerou que relações de parentesco entre espécies de águas quentes e frias, como os grupos-irmãos de sua análise *Mycale (M.) arenaria* e *M. (M.) thielei*, respectivamente, seriam indícios desta afinidade gondwanica, a qual seria reforçada por relações encontradas entre as biotas do Chile com áreas frias, Antártica e Malvinas (HAJDU e DESQUEYROUX-FAÚNDEZ, 1994).

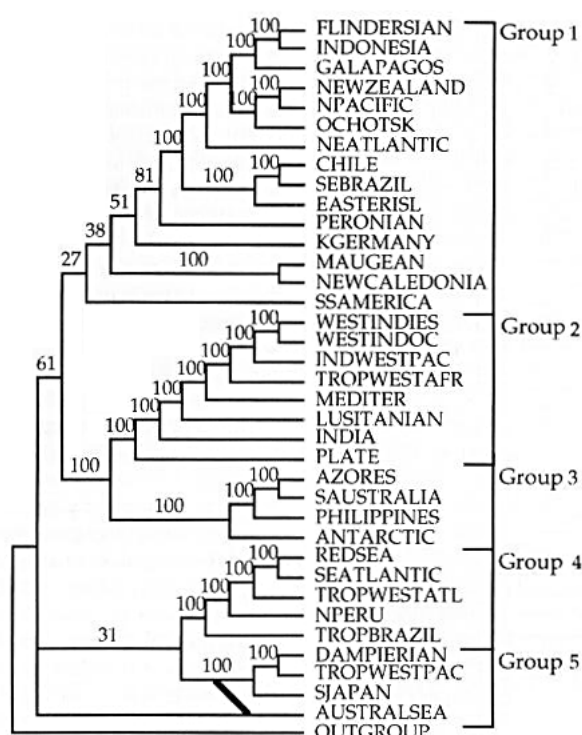


Figura 4.2. Cladograma geral de área com base nas relações filogenéticas do gênero *Mycale* Gray, 1867 obtido por Hajdu (1995). Para filogenia-base e descrição das áreas, ver trabalho original. Extraído de Hajdu (1995).

#### 4.1.3 Objetivos

- Estabelecer uma hipótese biogeográfica para *Mycale* com base nas reconstruções filogenéticas moleculares por meio de análise de três itens (3ia, *Three-item analysis*);
- Determinar padrões de distribuição geográfica do gênero *Mycale* a partir da ocorrência de espécies.

## 4.2 Material e métodos

As relações biogeográficas de *Mycale* foram inferidas segundo os pressupostos da biogeografia cladística, tendo como base as topologias reconstruídas a partir de dados moleculares (ver Capítulo 1). Para gerar os cladogramas táxon-área, dois cladogramas de táxons foram utilizados separadamente, derivados de hipóteses filogenéticas recuperadas por dois critérios: o primeiro define uma hipótese conservadora, e o segundo uma mais abrangente (Figura 4.3). A hipótese mais conservadora (A) foi determinada pelo resultado das relações evolutivas obtidas com altos valores de suporte por meio dos dados combinados de 16S e 28S. Por sua vez, a mais abrangente (B) teve como base a topologia anterior, mas inclui táxons não representados anteriormente, sendo que as posições destes derivam das relações filogenéticas obtidas independentemente entre os diferentes marcadores, conforme o caso, desde que apresentassem alto suporte e não fossem conflitantes entre si (as informações conflitantes entre os marcadores foram definidas por politomias de base).

As áreas de endemismo das espécies foram definidas em relação aos reinos marinhos, conforme as ecorregiões delimitadas por Spalding e colaboradores (2007), a partir das localidades de coleta das amostras utilizadas nas análises moleculares. A saber, os reinos marinhos abrangem as seguintes áreas: Ártico (A); Atlântico Norte Temperado (TNA); Pacífico Norte Temperado (TNP); Atlântico Tropical (TA); Indo-Pacífico Ocidental (WIP); Indo-Pacífico Central (CIP); Indo-Pacífico Oriental (EIP); Pacífico Oriental Tropical (TEP); América do Sul Temperada (TSA); África do Sul Temperada (TSAF); Australásia Temperada (TAA); e Oceano Sul (SO) (Figura 4.4). As áreas de endemismo, relativas às localidades de coletas das amostras, de cada espécie, podem se vistas na Tabela 4.1.

Para a inferência das relações entre as áreas, foi empregada a análise de três itens (3ia, do inglês, *Three-item analysis*, ou TTS, do inglês *Three-taxon analysis*; NELSON e PLATNICK, 1991; ZARAGÜETA-BAGILS e BOURDON, 2007). Nesta, cada hipótese de homologia primária é decomposta em afirmações de três itens (3is, *three item statements*) – *i.e.*, enunciados na forma "A e B são mais estreitamente relacionados entre si que a C", ou seja, C (A B) – as quais correspondem à informação hierárquica mínima possível dos dados, para, em seguida, construir uma árvore que é consistente com o maior número de afirmações de três itens possível (ZARAGÜETA-BAGILS e BOURDON, 2007). As análises foram realizadas utilizando o programa LisBeth (Zaragüeta-BAGILS *et al.*, 2012), onde foram fornecidos o cladograma dos táxons, conforme cada uma das hipóteses aceitas (A e B) – o qual provê a evidência das relações entre as áreas – e uma lista de táxons e as áreas de

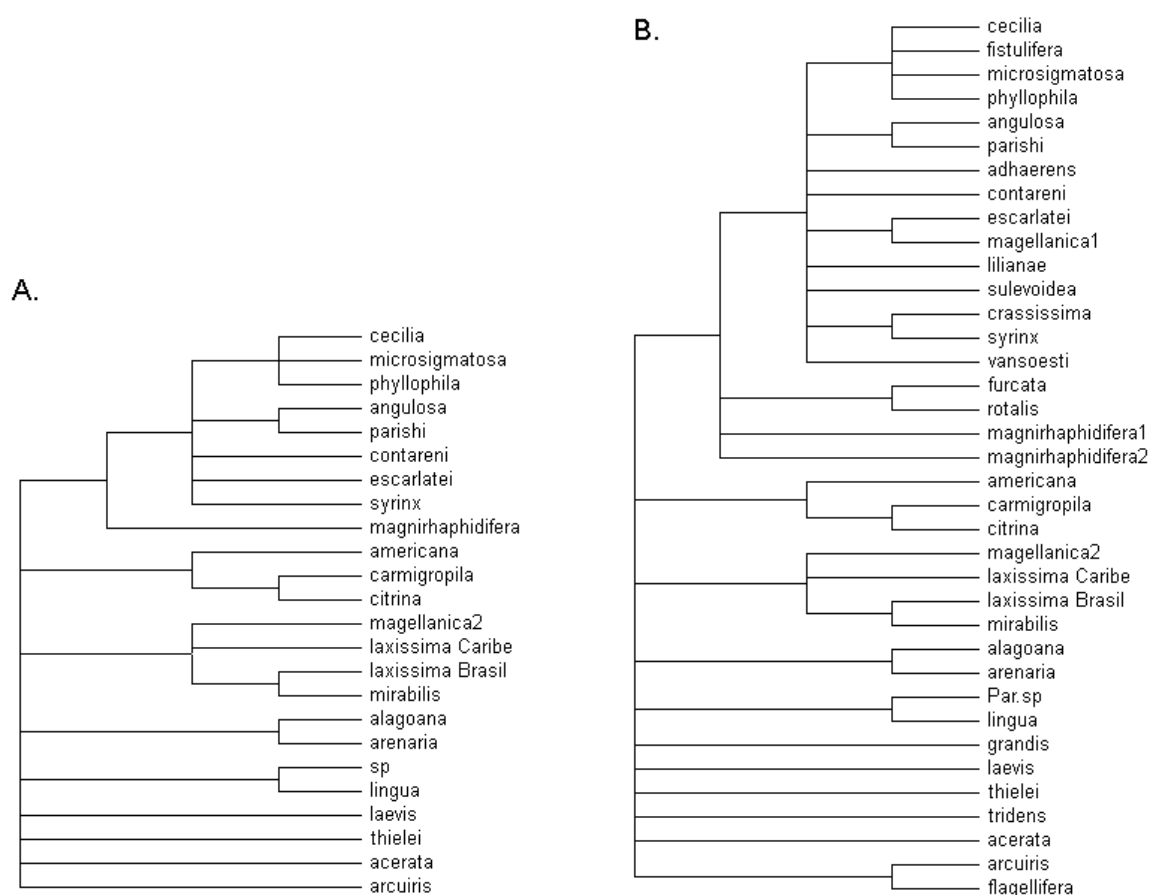


Figura 4.3. Cladogramas de táxons utilizados para as análises biogeográficas de *Mycale* Gray, 1867. A topologia destes deriva de hipóteses filogenéticas determinadas por dois critérios, no qual, o primeiro define uma hipótese conservadora (A), e o segundo uma mais abrangente (B). A hipótese conservadora foi baseada nas reconstruções filogenéticas de dados moleculares combinados enquanto que a hipótese abrangente inclui táxons não representados anteriormente cujas posições derivam das relações filogenéticas obtidas independentemente entre os diferentes marcadores. Os ramos terminais são indicados pelos epítetos das espécies. As potenciais espécies crípticas são indicadas por números ou localidades correspondentes após o epíteto. Ver texto e Capítulo 1 para mais detalhes.

endemismo onde cada táxon foi encontrado – dada a abrangência do cladograma. Brevemente, a análise realizada pelo programa, inicialmente, traduz o cladograma de táxons em um cladograma táxon-área substituindo os táxons terminais por suas áreas de endemismo correspondentes, para, em seguida, gerar as 3is que são utilizadas como características para a reconstrução de uma árvore de interseção. O programa emprega a análise de sub-árvores livres de paralogia (*Paralogy-free Subtree analysis*; NELSON e LADIGES, 1996) e o método transparente

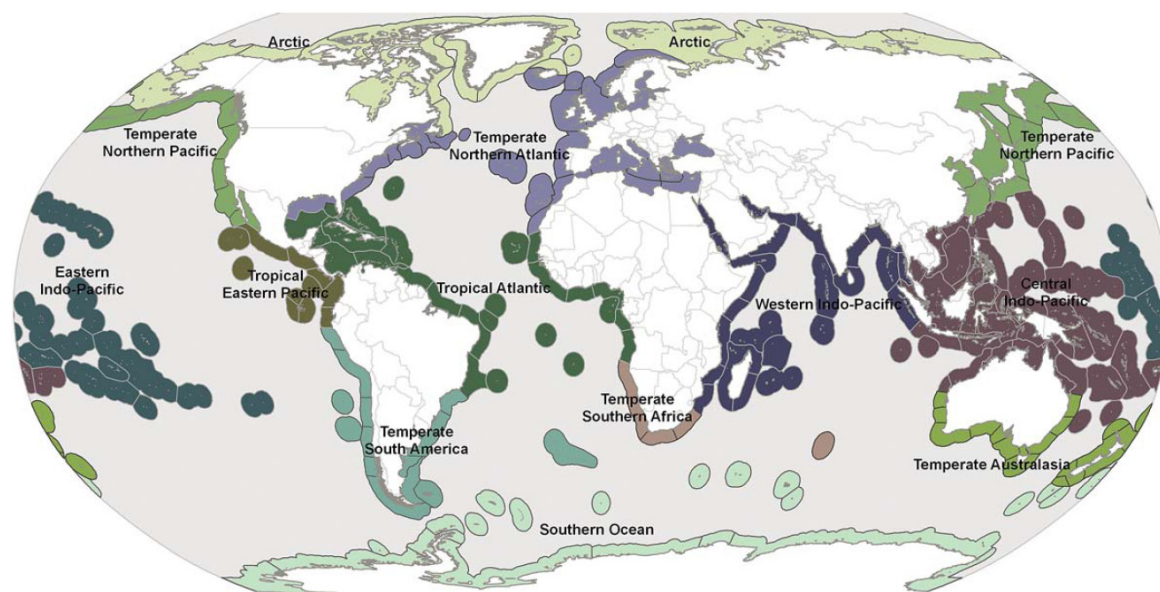


Figura 4.4. Reinos biogeográficos conforme definidos por Spalding e colaboradores (2007). A saber, os reinos marinhos abrangem as seguintes áreas: Ártico (A); Atlântico Norte Temperado (TNA); Pacífico Norte Temperado (TNP); Atlântico Tropical (TA); Indo-Pacífico Ocidental (WIP); Indo-Pacífico Central (CIP); Indo-Pacífico Oriental (EIP); Pacífico Oriental Tropical (TEP); América do Sul Temperada (TSA); África do Sul Temperada (TSAF); Australásia Temperada (TAA); e Oceano Sul (SO).

(*Transparent method*; EBACH *et al.*, 2005) para resolver os problemas gerados por áreas redundantes e táxons com distribuições amplas.

Adicionalmente, padrões de distribuição geográfica foram inferidos para o gênero *Mycale* a partir da totalidade dos registros de espécies descritas válidas para o mesmo (VAN SOEST *et al.*, 2012). Para tal, somente foram consideradas as espécies com alocação subgenérica, tendo sido as demais descartadas. Além disso, foram também descartadas as espécies que se mostraram filogeneticamente distantes de *Mycale* a partir de análises anteriores (Capítulo 1), dentre estas *M. (A.) titubans* e *M. (A.) phillipensis*. A partir dos registros das espécies de *Mycale*, estes táxons foram tabulados binariamente (ausência = 0, presença = 1) em relação a áreas de endemismo, delimitadas por reinos marinhos conforme Spalding e colaboradores (2007). A matriz resultante foi submetida a análises de agrupamento e bayesiana. A análise de agrupamento foi realizada por meio do método de agrupamento de vizinhos próximos (NJ, do inglês *Neighbour Joining*)) a partir das distâncias estimadas por meio da fórmula  $1 / (N_{ij} + 1)$ , onde N é o número de espécies em comum entre as áreas i e j, utilizando os programas StatSoft® STATISTICA® 7 e MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). A análise bayesiana foi realizada por meio de um modelo binário submetido a  $10^6$  gerações de



Tabela 4.1. Áreas de endemismo das espécies utilizadas na inferência biogeográfica de *Mycale* Gray, 1867. As áreas de endemismo das espécies foram definidas com base nas localidades de coleta das amostras utilizadas nas análises moleculares, e em relação aos reinos marinhos, conforme as ecorregiões delimitadas por Spalding e colaboradores (2007), a saber: Atlântico Norte Temperado (TNA); Pacífico Norte Temperado (TNP); Atlântico Tropical (TA); Indo-Pacífico Ocidental (WIP); Indo-Pacífico Central (CIP); Indo-Pacífico Oriental (EIP); América do Sul Temperada (TSA); Australásia Temperada (TAA); e Oceano Sul (SO).

<b>Espécie</b>	<b>Área</b>	<b>Espécie</b>	<b>Área</b>
<i>M. (Aeg.) adhaerens</i>	TNP	<i>M. (C.) magnirhaphidifera</i>	TA/TSA
<i>M. (Aeg.) americana</i>	TSA	<i>M. (C.) microsigmata</i>	TA/TSA
<i>M. (Aeg.) carmigropila</i>	TA	<i>M. (M.) alagoana</i>	TA
<i>M. (Aeg.) citrina</i>	TA	<i>M. (M.) arenaria</i>	TSA
<i>M. (Aeg.) contarenii</i>	TNA	<i>M. (M.) grandis</i>	CIP
<i>M. (Aeg.) crassissima</i>	CIP	<i>M. (M.) immitis</i> .group	TA
<i>M. (Aeg.) escastratei</i>	TSA	<i>M. (M.) laevis</i>	TA
<i>M. (Aeg.) furcata in press</i>	CIP	<i>M. (M.) lingua</i>	TNA
<i>M. (Are.) laxissima - Brasil</i>	TSA	<i>M. (M.) phyllophila</i>	EIP
<i>M. (Are.) laxissima - Caribe</i>	TA	<i>M. (M.) thielei</i>	TSA
<i>M. (Aeg.) liliana</i>	EIP	<i>M. (M.) tridens</i>	SO
<i>M. (Aeg.) magellanica 2</i>	TSA	<i>M. (M.) vansoesti</i>	CIP
<i>M. (Are.) mirabilis</i>	CIP	<i>M. (N.) arcuiris</i>	TSA
<i>M. (Aeg.) rostralis</i>	TNA	<i>M. (N.) flagellifera</i>	CIP
<i>M. (Aeg.) sulevoidea</i>	CIP	<i>M. (O.) acerata</i>	SO
<i>M. (Aeg.) syrix</i>	TNA	<i>M. (P.) sp.citrina</i>	TA
<i>M. (Aeg.) tunicata</i>	TNA	<i>M. (Z.) angulosa</i>	TA/TSA
<i>M. (C.) cecilia</i>	EIP	<i>M. (Z.) parishi</i>	EIP
<i>M. (C.) fistulifera</i>	WIP		

cadeias de Markov via Monte Carlo, sendo amostradas a cada 100 gerações, e descartando, ao final, 25% dos dados obtidos nas primeiras cadeias, utilizando o programa MrBayes v3.1 (RONQUIST e HUELSENBECK, 2005).

### 4.3 Resultados

As afirmações de três itens (3is) gerados nas inferências biogeográficas por meio de análise de três itens (3ia), assim como o número de nós internos a partir do qual estes foram deduzidos e o número inteiro do peso fracionário exato (iFW, *exact (integer) fractional weight*) de cada 3is podem ser vistos na Tabela 4.2. A análise com base no cladograma representante da hipótese filogenética mais conservadora (A) gerou 15 3is, com uma soma dos iFW igual a 530. Por sua vez, a baseada na hipótese mais abrangente (B) resultou em 58 3is, com soma dos iFW de 14.418. As árvores de interseção, construídas com base nos 3is produzidos em cada análise, compreendendo as relações entre as áreas de endemismo (Figura 4.5), apresentaram um índice de retenção\* (RI, *retention index*) total de 0,972 e 0,950 e um índice de completude\*\* (Compl, *completeness index*) de 60 % e 83,9 %, respectivamente para as hipóteses filogenéticas A e B.

A biogeografia com base na hipótese filogenética mais conservadora de *Mycale* retrata um cenário no qual o Oceano Sul (SO) corresponde à área de endemismo mais primitiva para o gênero, e todas as demais derivam de uma mesma área ancestral. Neste cenário, o Atlântico Norte Temperado (TNA) diverge das demais áreas localizadas abaixo do Trópico de Câncer, e, curiosamente, retrata uma relação mais próxima entre a América do Sul Temperada (TSA) e o Índio-Pacífico Central (CIP), enquanto que o Índio-Pacífico Oriental (EIP) estaria mais relacionado com o Atlântico Tropical (TA). Por sua vez, a biogeografia com base na hipótese filogenética mais abrangente de *Mycale* também recupera uma relação basal entre o Oceano Sul (SO) com as demais áreas, a partir das quais duas grandes divisões biogeográficas podem ser observadas. A primeira retrata um cenário no qual os Índio-Pacíficos Oriental (EIP) e Ocidental (WIP) se relacionam por ancestralidade com o TA, sendo que TSA seria a área ancestral mais basal desta. Na segunda divisão biogeográfica se observa uma afinidade entre CIP e TNA, sendo o Pacífico Norte temperado (TNP) uma área basal em relação às duas anteriores.

---

\* O índice de retenção (RI) da árvore de interseção, na análise de três itens (3ia) é calculado pela fórmula  $RI = \sum_{(R \cap I)} iFW_i / \sum_R iFW_i$ , onde R é o conjunto dos valores de iFW dos 3is deduzidos da lista de características, I é o conjunto dos 3is presentes na árvore de interseção, e  $iFW_i$  é o valor de iFW do *i*-ésimo 3is de cada conjunto. No caso, o RI das árvores de interseção das relações entre as áreas de endemismo dadas as hipóteses A e B são iguais a 515/530 e 13691/14418, respectivamente.

\*\* O índice de completude (Compl) da árvore de interseção, na análise de três itens (3ia) é calculado pela fórmula  $Compl = n(R \cap I) / n(R)$ , onde  $n(X)$  é o número de elementos no conjunto em questão. No caso, o índice de completude das árvores de interseção das relações entre as áreas de endemismo dadas as hipóteses A e B são iguais a 12/20 e 47/50, respectivamente.

Tabela 4.2. Lista das afirmações de três itens (3is) produzida pela inferência biogeográfica por meio de análise de três itens (3ia) a partir do cladograma abrangendo as hipóteses filogenéticas mais conservadora (A) e abrangente (B) de *Mycale* Gray, 1867. As afirmações de três itens (3is) são listadas, no formato C (A B), sendo A e B mais estreitamente relacionados entre si que a C, e A, B e C as áreas endemismo em relação aos reinos marinhos, a saber: Atlântico Norte Temperado (TNA); Pacífico Norte Temperado (TNP); Atlântico Tropical (TA); Indo-Pacífico Ocidental (WIP); Indo-Pacífico Central (CIP); Indo-Pacífico Oriental (EIP); América do Sul Temperada (TSA); Australásia Temperada (TAA); e Oceano Sul (SO). Para cada 3is, é reportado o número de nós internos a partir do qual estes foram deduzidos (#) e o número inteiro do peso fracionário exato (iFW). Ver texto para mais detalhes.

Hipótese conservadora (A) (3is = 15; $\sum$ iFW = 530)			Hipótese abrangente (B) (3is = 58; $\sum$ iFW = 14418)								
3is	#	iFW	3is	#	iFW	3is	#	iFW	3is	#	iFW
SO (CIP TA)	8	40	CIP (EIP TA)	8	278	SO (TA WIP)	5	153	TA (TNP WIP)	1	19
SO (CIP TSA)	8	40	CIP (EIP TSA)	8	278	SO (TNA TNP)	16	300	TA (TSA WIP)	1	28
SO (EIP TA)	7	35	CIP (EIP WIP)	8	222	SO (TNA TSA)	12	221	TNA (EIP TA)	8	278
SO (EIP TNA)	12	56	CIP (TA WIP)	4	111	SO (TNA WIP)	8	143	TNA (EIP TSA)	8	278
SO (EIP TSA)	8	36	CIP (TSA WIP)	4	111	SO (TNP TSA)	12	221	TNA (EIP WIP)	8	222
SO (TA TNA)	15	71	EIP (CIP TNA)	16	667	SO (TNP WIP)	8	143	TNA (TA WIP)	4	111
SO (TA TSA)	19	91	SO (CIP EIP)	16	300	SO (TSA WIP)	6	141	TNA (TSA WIP)	4	111
SO (TNA TSA)	8	36	SO (CIP TA)	19	599	TA (CIP EIP)	2	40	TNP (CIP TNA)	16	667
TA (CIP TSA)	8	40	SO (CIP TNA)	24	1000	TA (CIP TNA)	11	458	TNP (EIP TA)	8	278
TA (EIP TNA)	1	5	SO (CIP TNP)	16	300	TA (CIP TNP)	2	40	TNP (EIP TSA)	8	278
TA (EIP TSA)	1	5	SO (CIP TSA)	28	887	TA (CIP TSA)	10	373	TNP (EIP WIP)	8	222
TA (TNA TSA)	1	5	SO (CIP WIP)	8	143	TA (CIP WIP)	1	19	TNP (TA WIP)	4	111
TNA (EIP TA)	6	30	SO (EIP TA)	10	361	TA (EIP TNA)	2	40	TNP (TSA WIP)	4	111
TNA (EIP TSA)	6	30	SO (EIP TNA)	16	300	TA (EIP TNP)	2	40	TSA (CIP TNA)	12	500
TSA (EIP TA)	2	10	SO (EIP TNP)	16	300	TA (EIP TSA)	2	69	TSA (EIP TA)	4	139
			SO (EIP TSA)	12	339	TA (EIP WIP)	1	28	TSA (EIP WIP)	2	56
			SO (EIP WIP)	8	222	TA (TNA TNP)	2	40	TSA (TA WIP)	2	56
			SO (TA TNA)	19	599	TA (TNA TSA)	2	40	WIP (CIP TNA)	8	333
			SO (TA TNP)	10	224	TA (TNA WIP)	1	19			
			SO (TA TSA)	22	811	TA (TNP TSA)	2	40			

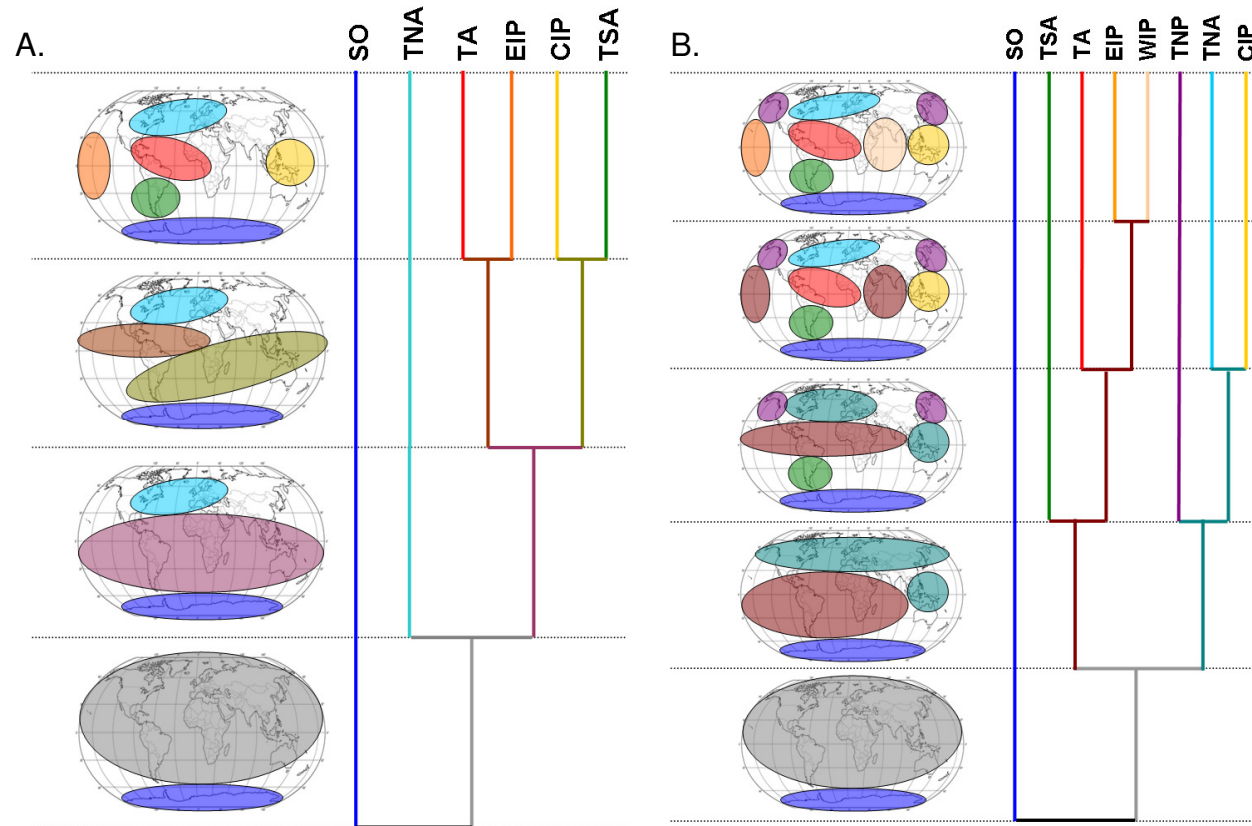


Figura 4.5. Inferência biogeográfica entre as áreas de endemismo das espécies de *Mycale* Gray, 1867 a partir das hipóteses filogenéticas mais conservadora (A) e abrangente (B) por meio de análise de três itens (3ia). As áreas de endemismo estão representadas no mapa mundo (à direita) em relação aos ramos da árvore de interseção obtida por meio da análise de três itens (à esquerda). As áreas ancestrais correspondem a extrapolações do somatório das áreas derivadas. Áreas de endemismo em relação aos reinos marinhos, a saber: Atlântico Norte Temperado (TNA); Pacífico Norte Temperado (TNP); Atlântico Tropical (TA); Indo-Pacífico Ocidental (WIP); Indo-Pacífico Central (CIP); Indo-Pacífico Oriental (EIP); América do Sul Temperada (TSA); Australásia Temperada (TAA); e Oceano Sul (SO). Ver texto para mais detalhes.

A matriz gerada a partir a partir da tabulação dos dados de presença e ausência das espécies de *Mycale* em relação às áreas de endemismo pode ser encontrada no Apêndice H. O número total de espécies por área e entre pares de áreas pode ser visto na Tabela 4.3. O número de ocorrência de espécies diferiu significativamente entre as áreas ( $\chi^2 = 90,1$ ;  $df = 11$ ;  $p = 0,000$ ), com um valor médio de  $21,9 \pm 13,4$  espécies (spp.) por área, sendo que das 194 espécies tabuladas, somente 62 foram encontradas em mais de uma área. As áreas com maior número de espécies registradas foram CIP (46 spp.), TNP (37 spp.) e TAA (36 spp.) enquanto que as com menor número de registros foram EIP (4 spp.), TEP (4 spp.) e SO (8 spp.). A partir da análise de agrupamento (Figura 4.6.A) três grandes grupos podem ser identificados, o primeiro agrupa dois subgrupos compreendendo (SO + TSAF) e (WIP + (CIP + TAA)), o segundo as áreas TNA, TNP e A, no qual as duas últimas são mais próximas entre si, e o terceiro grupo, mais próximo do segundo, abarca as áreas restantes, sendo que dentro deste é possível observar dois agrupamentos menores, unindo (TA + TSA) e (EIP + TEP). Por sua vez, na análise bayesiana foram recuperados somente três agrupamento com altos valores de suporte. Este grupos compreendem os pares de áreas CIP + TAA, TA + TSA e A + TNP, sendo que não houve resolução das relações entre as demais áreas.

Tabela 4.3. Matriz quadrada indicando o número de espécies reportadas ocorrer nas mesmas áreas. A linha diagonal indica o número total de espécies e, em colchetes, o número de espécies exclusivas (endêmicas) daquela área. Os números absolutos de espécies em comum são reportados abaixo da linha diagonal, e a distância estimada pode ser vista acima desta. As siglas correspondentes às áreas são: África do Sul Temperada (TSAF); América do Sul Temperada (TSA); Ártico (A); Atlântico Norte Temperado (TNA); Atlântico Tropical (TA); Australásia Temperada (TAA); Indo-Pacífico Central (CIP); Indo-Pacífico Ocidental (WIP); Indo-Pacífico Oriental (EIP); Oceano Sul (SO); Pacífico Norte Temperado (TNP); Pacífico Oriental Tropical (TEP). Ver texto para mais detalhes.

	<b>TNA</b>	<b>CIP</b>	<b>TAA</b>	<b>TEP</b>	<b>WIP</b>	<b>TNP</b>	<b>A</b>	<b>TA</b>	<b>TSA</b>	<b>TSAF</b>	<b>SO</b>	<b>EIP</b>
<b>TNA</b>	<b>19 [13]</b>	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	0,250	0,250	1,000	0,500	1,000	1,000
<b>CIP</b>	0	<b>46 [14]</b>	0,032	1,000	0,250	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500
<b>TAA</b>	0	30	<b>36 [5]</b>	1,000	0,333	0,500	1,000	1,000	1,000	0,500	0,500	0,500
<b>TEP</b>	0	0	0	<b>6 [3]</b>	0,500	1,000	1,000	0,500	0,500	1,000	1,000	0,500
<b>WIP</b>	0	3	2	1	<b>27 [22]</b>	1,000	1,000	1,000	0,500	0,500	0,500	1,000
<b>TNP</b>	1	1	1	0	0	<b>37 [28]</b>	0,125	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500
<b>A</b>	3	0	0	0	0	7	<b>14 [4]</b>	0,333	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>TA</b>	3	0	0	1	0	0	2	<b>30 [15]</b>	0,091	0,500	1,000	1,000
<b>TSA</b>	0	0	0	1	1	0	0	10	<b>20 [8]</b>	1,000	1,000	0,500
<b>TSAF</b>	1	0	1	0	1	0	0	1	0	<b>16 [13]</b>	0,500	1,000
<b>SO</b>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	<b>8 [7]</b>	1,000
<b>EIP</b>	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	<b>4 [1]</b>

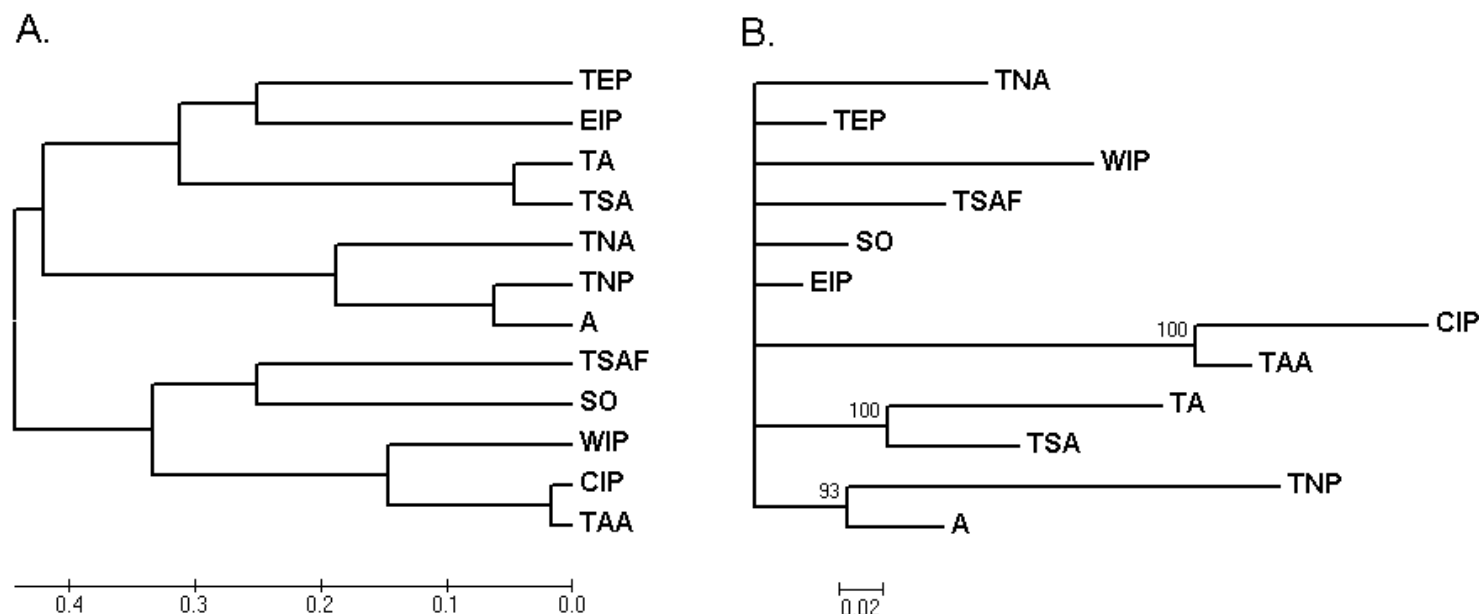


Figura 4.6. Padrões de distribuição geográfica inferidos a partir da totalidade dos registros de espécies válidas descritas para o gênero *Mycale* Gray, 1867. As análises foram realizadas com base na presença e ausência de espécies em relação a áreas de endemismo, delimitadas por reinos marinhos conforme Spalding e colaboradores (2007), a saber: África do Sul Temperada (TSAF); América do Sul Temperada (TSA); Ártico (A); Atlântico Norte Temperado (TNA); Atlântico Tropical (TA); Australásia Temperada (TAA); Indo-Pacífico Central (CIP); Indo-Pacífico Ocidental (WIP); Indo-Pacífico Oriental (EIP); Oceano Sul (SO); Pacífico Norte Temperado (TNP); Pacífico Oriental Tropical (TEP). A. Relação entre áreas obtida por análise de agrupamento realizada utilizando o método de agrupamento de vizinhos próximos e distâncias estimadas por meio da fórmula  $1 / (N_{ij} + 1)$ , onde  $N$  é o número de espécies em comum entre as áreas  $i$  e  $j$ . B. Relação entre áreas obtida por análise bayesiana realizada por meio de um modelo binário submetido a  $10^6$  gerações de cadeias de Markov via Monte Carlo. As siglas correspondem às áreas: Ver texto para mais detalhes.

## 4.4 Discussão

### 4.4.1 Biogeografia histórica

As inferências biogeográficas obtidas por meio da análise de três itens (3ia) apresentaram uma grande divergência conforme a hipótese filogenética subjacente. Enquanto que a inferência baseada na hipótese conservativa recuperou uma relação entre o Indo-Pacífico Central (CIP) e a América do Sul Temperada (TSA), na hipótese mais abrangente o CIP se relaciona com o Atlântico Norte Temperado (TNA), estando TSA mais próxima de outras áreas como Atlântico Tropical (TA) e Indo-Pacífico Oriental (EIP). As diferenças entre as duas reconstruções biogeográficas é marcante, com somente poucas relações em comum. A primeira delas é a posição basal do Oceano Sul (SO) em relação às demais áreas. A outra similaridade se dá na relação TA + EIP, a qual só diverge entre as duas análises pela presença da área Indo-Pacífico Ocidental (WIP) na análise com base na filogenia mais abrangente.

Com base em cada uma destas é possível inferir eventos históricos distintos durante a diversificação do gênero *Mycale*. Porém, ambas as análises remontam a um cenário de diversificação a partir de áreas mais remotas ao sul. A primeira análise – com base na filogenia conservadora – une todas as áreas, com exceção do SO, no que poderia ser interpretado como uma afinidade Tethyana, a partir da qual se diversifica, primeiramente, uma fauna do Norte que viria a colonizar o TNA. Em seguida, pode-se interpretar as relações das áreas seguintes como anteriores a abertura entre o Atlântico Sul e Norte. Esta suposição levaria a uma afinidade entre a fauna do TA com o EIP, provavelmente, devido à união destas áreas antes do soerguimento do Istmo do Panamá. Concomitantemente, a afinidade entre o TSA e o CIP se daria pela conectividade entre o Atlântico Sul e o Índico. Porém, a segunda análise – baseada na filogenia mais abrangente – remonta a um cenário hipotético diferente, no qual se deduz uma diversificação Leste-Oeste, provavelmente anterior à abertura do Atlântico, na qual se identificaria uma afinidade à Oeste, unindo o Norte Temperado e o Índico, e outra à Leste, unindo o Proto-Caribe e o Pacífico Sul Oriental. Neste último, a fauna mais primitiva seria originária do Sul, que posteriormente colonizaria o TSA e o Atlântico Tropical, sendo que este, em seguida se diversificaria após o fechamento do Istmo do Panamá, levando à origem de uma fauna do Pacífico ancestral, que se diversificaria novamente, colonizando o EIP e o WIP. Ambos os cenários apresentam uma grande parcela de incongruência, sobretudo a inferência biogeográfica derivada da filogenia abrangente. Nesta, as faunas do Índico apresentam origens diferentes, sendo que a porção central desta região teria uma origem, e as faunas ocidentais e orientais outra, implicando em um evento no

qual – se a hipótese de uma origem Atlântica for considerada válida – uma fauna hipotética do Pacífico Tropical derivada do fechamento do Istmo, após colonizar o EIP, deveria cruzar a fauna do Indo-Pacífico Central para colonizar o WIP. Uma terceira incongruência desta análise é a maior afinidade entre o Atlântico Norte Temperado e o CIP. Se a hipótese de uma origem oriental desta fauna for considerada válida, deveria de ter havido primeiro uma diversificação da fauna ocidental do Norte Temperado, permitindo a união do Índico com o Norte Oriental, a partir do qual se diversificaria as faunas do TNA e CIP.

Todavia, como a análise biogeográfica histórica é dependente da hipótese filogenética aceita, o nível de resolução e completude desta implica diretamente em relações biogeográficas diversas. Desta forma ambas as inferências, por se basear em filogenias cuja amostragem de táxons é bem inferior a real diversidade conhecida do gênero, e, além disso, apresentarem muitas relações mal resolvidas (politomias), estão aquém de serem verossímeis à história biogeográfica de *Mycale*.

#### 4.4.2 Padrões de distribuição geográfica

Por sua vez, as análises com base na presença e ausência de táxons nas áreas de endemismo estabelecidas resultaram em padrões bem similares de distribuição geográfica, mas diferindo em relação às suas resoluções. Tanto na análise de agrupamento quanto na bayesiana foi possível recuperar relações de afinidade entre os pares de áreas Indo-Pacífico Centra (CIP) e Australásia Temperada (TAA), Atlântico Tropical (TA) e América do Sul Temperada (TSA), e Ártico (A) e Pacífico Norte Temperado, apresentando alta similaridade e suporte. Estas relações recuperadas entre áreas geograficamente próximas provavelmente remonta a uma diversificação recente entre estas, na qual uma grande parcela dos táxons em comum, muito provavelmente, se deve a eventos de dispersão de espécies, dada a conectividade entre as áreas.

O cenário biogeográfico expressado pela análise de agrupamento apresenta considerações interessantes a serem destacadas. Em primeiro lugar, esta evidencia uma relação de proximidade entre o Indo-Pacífico Ocidental (WIP) com a já mencionada afinidade CIP e TAA, sugerindo uma origem comum da fauna do Índico e da Austrália. Como esta região veio a ser formada principalmente pela deriva de dois subcontinentes, o australiano e o indiano, banhados pelo Mar de Tethys, a relação de proximidade entre TAA e CIP sugere que a fauna de *Mycale* destas áreas derivaram do primeiro, enquanto que a do WIP do segundo subcontinente. Uma outra relação interessante foi a obtida entre a África do Sul Temperada e



o Oceano Sul. Tanto evidências geológicas quanto atuais podem ser utilizadas para suportar esta relação, uma vez que estas regiões eram próximas no início da separação de Gondwana e a Corrente de Benguela, atualmente, banha a costa Sul da África com águas frias oriundas do continente Antártico. Contudo, a explicação histórica ganha ainda mais força devido à relação entre as faunas australiana e índica com as sulafricana e antártica. Esta afinidade remonta diretamente a uma relação gondwanica, porém, excluindo a fauna sulamericana (ver abaixo). Outra relação de destaque remonta a uma afinidade laurasiana, unindo o Ártico (A), Pacífico Norte Temperado (TNP) e Atlântico Norte Temperado. A grande conectividade atual entre A e TNP é evidenciada em uma relação de proximidade entre estas áreas, e provavelmente, uma fauna ancestral a estas duas deu origem a do TNA após a abertura do Atlântico Norte. Por fim, as demais áreas remontam a uma afinidade Tropical, anterior à abertura do Atlântico e ao soerguimento do Istmo do Panamá. Aqui é possível observar uma diversificação Norte-Sul, na qual a fauna da América do Sul Temperada diverge em relação ao Atlântico Tropical, sugerindo uma colonização do continente sulamericano a partir do Proto-Caribe. É possível também observar uma diversificação Leste-Oeste, a qual remonta a uma origem comum entre o Pacífico Oriental Tropical e o Indo-Pacífico Oriental.

Contudo, este tipo de análise é extremamente sensível à amostragem taxonômica, o que é demonstrado pela baixa resolução encontrada na análise bayesiana e pela baixa similaridade entre as áreas. Como pode ser visto na Tabela 4.3, a maior parte das espécies de *Mycale* registradas era endêmica, e somente cerca de 30 % destas são encontradas em mais de uma área. As relações encontradas na análise bayesiana parecem refletir diretamente o esforço amostral nestas áreas, haja visto que somente foram recuperadas relações com suporte entre áreas com um alto número de espécies registradas. Outra consideração se deve ao fato das duas áreas com menor número de espécies reportadas (TEP e EIP) terem agrupado na análise de similaridade, levantando a possibilidade de que este agrupamento se deva a um artefato de análise.

Este tipo de análise também é sensível à delimitação de áreas de endemismo. Muitas das espécies registradas apresentaram distribuições referentes a países ao invés de áreas. Neste sentido, caso uma espécie seja reportada para um país que apresente sua área de costa localizada em diferentes áreas de endemismo estabelecidas, como Brasil e Austrália, pode ser que tal promova artefatos de análise. Por exemplo, muitas espécies que ocorrem ao longo da costa do Brasil têm uma área de distribuição limítrofe no Sudeste deste país. Contudo, esta região é definida como pertencente à TSA, o que promove a coocorrência destas espécies

também no TA. Como no caso desta análise, o número de espécies registradas para o Brasil foi superior ao registrado em outras regiões da América do Sul (dados não mostrados), a relação resultante da informação de presença de espécies nas duas áreas (TSA + TA) pode ter sido promovida mais por um erro de delimitação de áreas – associado à amostragem diferencial dos registros ao longo da costa do continente – do que uma afinidade faunística real. Por outro lado, a região do Sudeste do Brasil é alegadamente uma zona de transição biogeográfica (SOLÉ-CAVA *et al.*, 1981; PALACIO, 1982), e a fauna de esponjas desta região apresenta afinidade com o Atlântico Tropical Ocidental. Deste modo, provavelmente a delimitação entre as áreas de endemismo TA e TSA apresentou um forte peso na recuperação de uma relação entre estas áreas, a qual deveria ser revista, ou mesmo, esta zona poderia ser tratada como uma área à parte. Um exemplo similar também é dado pelos registros de espécies da Austrália. Este país abrange duas regiões recuperadas como afins (TAA + CIP), e a maioria de suas espécies é registrada ocorrer ao longo de toda a costa do país. Novamente, isto promove um alto número de coocorrência para estas áreas, o que possibilita a recuperação de artefatos.

#### 4.4.3 Biogeografia de *Mycale* e padrões de distribuição das esponjas

As análises biogeográficas de *Mycale*, além de apresentar uma grande divergência entre métodos, também diverge em relação aos padrões globais de distribuição de esponjas. O padrão de distribuição proposto por van Soest e colaboradores (2012) determina uma afinidade entre os Indo-Pacíficos Central e Ocidental, seguido pela Australásia Temperada. Nesta relação, as duas áreas tropicais estariam mais relacionadas do que o sul temperado. Contudo, nos resultados obtidos por meio da análise de agrupamento – metodologia, esta, similar à empregada pelos autores – a relação entre estas áreas se mostrou invertida, refletindo uma coesão faunística do continente australiano. Como discutido anteriormente, esta relação obtida aqui poderia advir de erros no registro de espécies, determinando distribuições maiores do que às reais, mas também encontra suporte na origem geológicas destas regiões, como evidencia a deriva dos subcontinentes indiano e australiano. No mais, a maior parte das demais relações de áreas propostas por van Soest e colaboradores (2012) difere em grande parte das obtidas aqui. Por exemplo, os autores recuperam em seu trabalho uma afinidade entre o Oceano Sul e a América do Sul Temperada – uma afinidade de fauna reconhecida por muitos autores (e.g., DESQUEYROUX-FAÚNDEZ, 1994; HAJDU, 1995) – as quais, por fim, se relacionam com a África do Sul Temperada. Contudo, os resultados do presente

trabalho sugerem uma maior semelhança entre a fauna da TSA e uma fauna ancestral do Proto-Caribe (mas ver discussão acima). Com a exceção da TSA, a afinidade entre o Oceano Sul e a África do Sul Temperada também foi recuperada neste trabalho, o que reforça uma origem em comum para estas faunas (quer seja por vicariância ou dispersão). Os padrões de distribuição geográfica de van Soest e colaboradores (2012), assim, neste trabalho (análise de similaridade), sugere uma afinidade entre o Indo-Pacífico Oriental e o Pacífico Oriental Tropical. Contudo, os autores assinalam o Pacífico Norte Temperado como área mais relacionada a estas, ao contrário do que foi encontrado aqui. Os resultados desta tese sugerem que a fauna de *Mycale* destas áreas (EIP e TEP) esteja relacionada à uma fauna tropical proto-caribenha. E que a fauna de *Mycale* do Pacífico Norte Temperado estaria relacionada com a fauna do Ártico, uma área que, por sua vez, no trabalho de van Soest e colaboradores (2012) se relaciona com o Atlântico Tropical e Norte Temperado.

## 5 DA METABOLÔMICA COMPARADA

### 5.1 Introdução

#### 5.1.1 Produtos naturais de esponjas: importância farmacológica e papel ecológico

Produtos naturais, metabólitos secundários, ou não-primários são produtos de processos regulatórios celulares produzidos por organismos vivos cujos níveis podem ser considerados como a resposta máxima dos sistemas biológicos a alterações genéticas ou ambientais. Estes têm sido explorados pela humanidade para uma gama de propósitos diferentes, incluindo seu uso como comida, fragrâncias, pigmentos, inseticidas e remédios. O ambiente marinho é uma fonte rica de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais possuem características estruturais não encontradas em produtos naturais de origem terrestre. Todos os anos, um número cada vez maior de novos metabólitos marinhos é relatado na literatura, indicando que este ambiente potencialmente continue a ser uma fonte abundante de novos produtos naturais por muitos anos vindouros (BLUNT *et al.*, 2012, LEAL *et al.*, 2012a, b; SACRISTÁN-SORIANO *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, as esponjas têm se tornado uma das fontes predominantes na descoberta novos produtos naturais biologicamente ativos, principalmente devido a sua prevalência no ambiente marinho, fácil coleta e capacidade de sintetizar uma variedade de produtos naturais de diversas classes estruturais. No período de cinco anos, entre 1986 e 1991, mais de 400 novos compostos com atividade citotóxica foram descritos na literatura obtidos a partir de esponjas (SCHMITZ *et al.*, 1993; LEAL *et al.*, 2012a, b). Estes compreendem as mais diversas classes químicas, como nucleosídeos, terpenos, esteróis, peptídeos cíclicos, alcalóides, ácidos graxos, peróxidos e aminoácidos derivados (frequentemente halogenados). A maioria dos compostos bioativos encontrados nas esponjas podem ser classificados como anti-inflamatórios, anti-tumorais, imuno- ou neuro-supressores, anti-virais, anti-maláricos, anti-bióticos ou anti-encrustantes (TRAMPER, 1999).

Entretanto, muitos destes compostos são na verdade produzidos por organismos associados às esponjas, como bactérias e fungos, os quais utilizariam os mesmos como forma de proteção contra organismos agressores estranhos (THAKUR *et al.*, 2003). A própria noção de simbiose é de certa forma dirigida por restrições bióticas ambientais, onde o organismo hospedeiro, no caso, a esponja, sintetiza compostos bioativos que proporcionam proteção contra organismos invasores (*e.g.*, RICHELLE-MAURER *et al.*, 2003). Os fungos e bactérias simbióticos com as esponjas também produzem metabólitos secundários que agem como antibióticos ou citostáticos (*e.g.*, PETTIT *et al.*, 2000; BRINGMANN e LANG, 2003). Em demospongias, esta associação entre microrganismos e hospedeiros é altamente específica, gerando também uma alta especificidade na produção de compostos bioativos (ver THOMAS *et al.*, 2010; ROZAS *et al.*, 2011). Funcionalmente, estes compostos agem apenas como meios de defesa química (ver THOMAS e SCHUPP, 2007). Contudo, outras classes de moléculas podem apresentar um papel duplo, envolvendo tanto defesa quanto ativação de vias metabólicas importantes na auto-defesa, com moléculas similares e/ou homólogas àquelas presentes no sistema imune inato e adaptativo de metazoários derivados (MÜLLER *et al.*, 1999, 2004).

### 5.1.2 Metabolômica comparativa

O conhecimento produzido a respeito do conteúdo metabólico das esponjas até agora se deve basicamente a triagem de compostos de interesse farmacológico. Leia-se, das muitas espécies de esponjas estudadas sob o ponto de vista bioquímico, somente uma fração mínima dos compostos que apresentaram resposta farmacológica tiveram suas pesquisas aprofundadas. Desta forma, pouco ou nada se sabe a respeito da aparente complexa estrutura metabólica das esponjas, uma vez que os trabalhos normalmente descrevem apenas novos produtos potencialmente exploráveis. Questões como o papel evolutivo desses compostos estão apenas começando a serem exploradas (ver tópico acima), mas outras permanecem incertas, como: i) quão filogeneticamente distribuídos são estes compostos?; ii) que estados fisiológicos desencadeiam a produção dos mesmos?; iii) qual o papel dos diferentes fatores ambientais na síntese desses metabólitos?; dentre outras.

Com a recente era das “ômicas”, na qual um volume maciço de informações biológicas pode ser gerado rapidamente, e relativamente a baixo custo, estas questões estão começando a ser investigadas. Com a possibilidade praticamente ilimitada de rastreamento de metabólitos, gerando fenótipos metabólicos tanto qualitativos quanto quantitativos, a

comparação destes entre diferentes amostras permitirá um grande avanço no conhecimento dessas vias, levando tanto a uma maior compreensão da função e evolução destes compostos quanto a uma identificação dos mesmos para fins práticos (FIEHN, 2002; WECKWERTH e MORGENTHAL, 2005). Embora a metabolômica comparada seja amplamente aplicada em biomedicina, fitoquímica e microbiologia (NIELSEN e JEWETT, 2007), poucos trabalhos já foram feitos envolvendo invertebrados que não sejam espécies usadas como modelo animal.

Em esponjas, há praticamente um único trabalho sob este prisma: um estudo recente que aplicou o princípio de impressão digital metabólica – *i.e.*, a identificação de fenótipos metabólicos por meio da comparação de padrões multiparamétricos obtidos a partir de rastreamento em larga escala de compostos de um grande número de amostras – como indicador de biodiversidade em *Homoscleromorpha* (IVANIŠEVIĆ *et al.*, 2011). Os autores, usando uma abordagem de impressão digital metabólica por meio de HPLC–DAD–ELSD–MS (do inglês, *High performance liquid chromatography - Diode Array Detector - Evaporative Light Scattering Detector - Mass Spectrometry*), primeiramente, mediram a variabilidade intraespecífica da diversidade metabolômica entre duas espécies de *Oscarella* Vosmaer, 1884, a qual se mostrou significativamente menor do que a variabilidade interespecífica, porém indicando que 95% do perfil metabolômico entre elas é aparentemente idêntico. Ainda, por meio da classificação gerada a partir da comparação entre os perfis metabólicos de dez espécies de *Homoscleromorpha*, os autores encontraram uma alta congruência com reconstruções filogenéticas obtidas a partir de dados moleculares, sendo capazes de demonstrar a existência de dois grupos distintos dentro deste táxon (Figura 5.1). Este estudo comprovou que determinados metabólitos em *Homoscleromorpha* atuam como características quimiotaxonômicas, sendo compartilhados evolutivamente entre as espécies. No caso, os autores confirmam a presença de plakinaminas, alcalóides esteroidais, como sinapomorfia entre *Corticium* Schmidt, 1862 e *Plakina* Schulze, 1880.

### 5.1.3 Metabólitos de *Mycale* Gray, 1867

Mais de 160 compostos já foram descobertos a partir de espécies do gênero *Mycale* Gray 1867, sendo a maior parte destes exclusivos (ver Apêndice I). O primeiro composto relatado na literatura isolado a partir de uma espécie de *Mycale* revelou uma nova classe estrutural de nucleosídeos, cujo nome mycalisina A, faz alusão a sua origem (KATO *et al.*, 1985). A partir de então, uma miríade de novos compostos nomeados em função de seu isolamento a partir de extratos de *Mycale* spp., começaram a ser relatados na literatura, como:

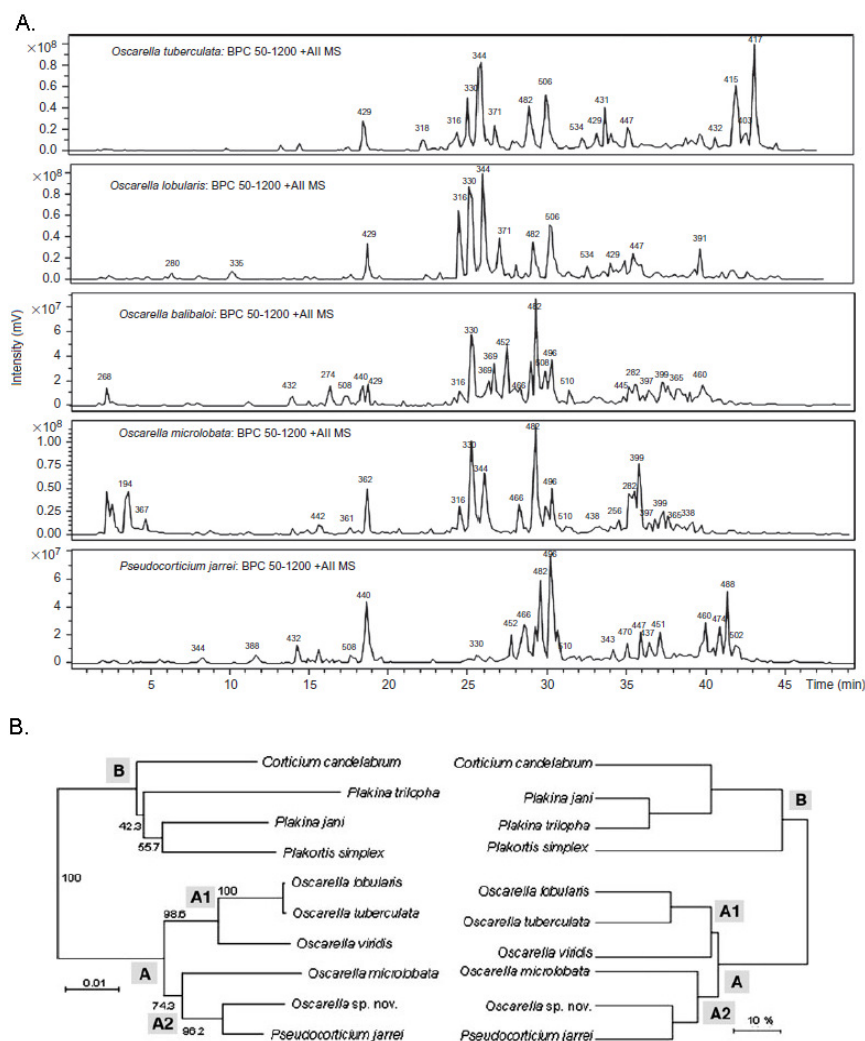


Figura 5.1. Perfis metabólicos de espécies de Homoscleromorpha e classificação gerada a partir de dados moleculares e metabolômicos. A. Espectrometria de espécies de Homoscleromorpha obtidos por meio de HPLC–DAD–ELSD–MS. B. Constraste entre classificação gerada a partir de dados moleculares (a esquerda) e metabolômicos (a direita). As letras indicam os grupos congruentes entre as duas análises. Extraído de Ivanišević *et al.*, 2011.

mycalamidas, mycalazais, mycalazóis, mycalenitrilas, mycaleoxinas, mycalolilídeos, mycalosídeos, mycaperóxidos, mycapolióis, além de muitos outros compostos específicos pertencentes a outras classes, como panteaminas, tedanolídeos, hiburipiranonas, acetogeninas, alquil-pirróis e outros (Figura 5.2). Estes produtos apresentam as mais diversas atividades biológicas, de amplo interesse farmacológico, agindo como agentes citostáticos e espermostáticos (mycalisinas; KATO *et al.*, 1985; mycalosídeos, ANTONOV *et al.*, 2003), anti-virais (mycalamidas, PERRY *et al.*, 1988; PERRY *et al.*, 1990; mycaperóxidos,

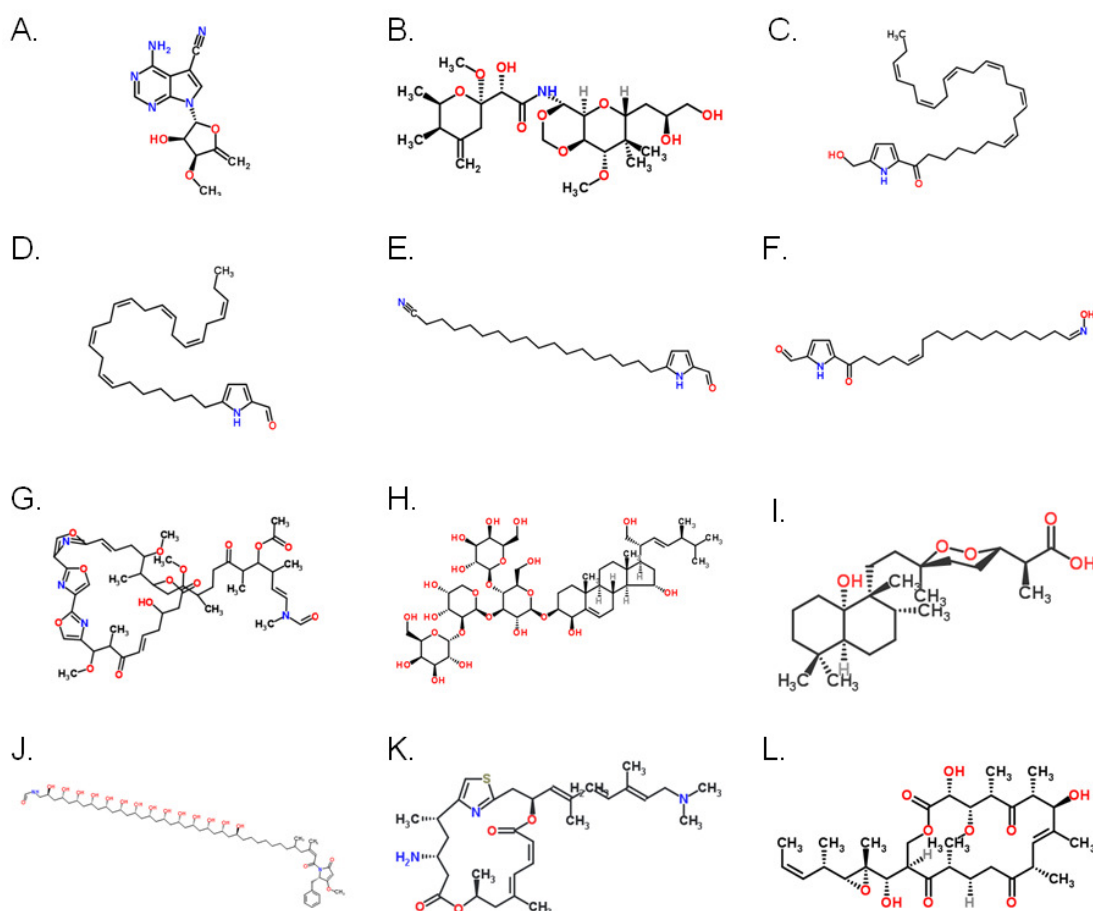


Figura 5.2. Estrutura química de alguns dos principais compostos químicos isolados a partir de espécies do gênero *Mycale* Gray, 1867. A. Mycalisina A. B. Mycalamida A. C. Mycalazal 1. D. Mycalazol 1. E. Mycalenitrila 1. F. Mycaleoxina. G. Mycalolida A. H. Mycalosida A. I. Mycaperóxido A. J. Mycapoliol A. K. Panteamina A. L. 13-deoxytedanolida. Para uma lista completa dos produtos naturais de *Mycale*, assim como referências, ver Apêndice I.

TANAKA *et al.*, 1993), e citotóxicos e anti-tumorais (mycalolídeos, FUSETANI *et al.*, 1989; mycaperóxidos, TANAKA *et al.*, 1993; mycalazóis, ORTEGA *et al.*, 1997; mycalazais e mycalenitrilas, ORTEGA *et al.*, 2004; tiomycalolídeos, MATSUNAGA *et al.*, 1998a), citando só alguns exemplos.

Contudo, ainda pouco se sabe a respeito do papel destes compostos na ecologia química dessas esponjas, ou mesmo da representatividade destes em relação às associações com microrganismos. Um dos poucos trabalhos neste sentido comparou as comunidades bacterianas, assim como sua influência na incrustação de poliquetos, de duas espécies de *Mycale* oriundas de localidades distintas: *Mycale adhaerens* de Hong Kong e *Mycale*



*laxissima* das Bahamas (LEE *et al.*, 2007). Os autores concluem que as espécies de *Mycale* das duas regiões diferem em sua microbiota tanto em número quanto em espécies isoladas, sendo a de Hong Kong mais diversa. Ainda, quando os extratos das duas esponjas foram incubados com bactérias isoladas a partir da referência proveniente de Hong Kong, as nativas apresentaram inibições de crescimento contra uma ampla variedade destas, enquanto que no extrato da estrangeira não foi observado qualquer efeito contra as mesmas. No mesmo estudo, ensaios de colonização, usando larvas de poliquetos nativos de Hong Kong, mostraram que o extrato da esponja da mesma localidade era capaz de inibir a fixação do poliqueta, mas os da esponja de Bahamas não mostraram qualquer efeito observável. Por meio de HPLC-MS, foi mostrado que o perfil metabólico entre as espécies diferia significativamente, tendo *M. adhaerens* apresentado maior diversidade de ácidos graxos. Os autores concluem que as espécies de *Mycale* geograficamente distintas apresentam especificidade tanto em suas comunidades bacterianas associadas à superfície quanto na sua atividade anti-incrustante, a qual possivelmente se deve as diferenças na composição química de seus ácidos graxos. E que diferentes comunidades bacterianas associadas às esponjas podem refletir diferenças de hábitat nas suas comunidades simpátricas tanto bacteriana quanto bêntica (LEE *et al.*, 2007).

#### 5.1.4 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear na identificação de moléculas

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN ou NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*) é uma técnica que explora as propriedades de certos núcleos atômicos para determinar as propriedades físicas e químicas de átomos ou moléculas. Assim como outras técnicas, como a espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) seja ela acoplada à cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas chromatography*) ou à cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês *High-performance liquid chromatography*), a espectroscopia por RMN é largamente utilizada para a determinação estrutural de produtos naturais. Mais recentemente, essas técnicas estão sendo combinadas para produzir análises mais refinadas e robustas para a identificação de compostos em misturas complexas, possibilitando análises de extratos brutos, não-purificados. Por exemplo, as técnicas modernas para análise metabolômica utilizam correlações de sinais obtidos tanto por RMN quanto por GC-MS (SAITO e MATSUDA, 2010).

#### 5.1.4.1 Deslocamento químico

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear se baseia no fato de que núcleos ativos em RMN (*spin* diferente de zero), como  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  absorvem radiação eletromagnética em uma frequência característica de acordo com o isótopo. A frequência ressonante, a energia de absorção e a intensidade do sinal são proporcionais à força do campo magnético. Por exemplo, em um campo magnético de 21 Tesla, os hidrogênios ressonam a 900 MHz, sendo, portanto, comum se referir a um magneto de 21 T como sendo um magneto de 900 MHz, embora diferentes núcleos ressonem em uma frequência diferente nesta força de campo em proporção aos seus momentos magnéticos nucleares. Para núcleos com *spin*  $\frac{1}{2}$ , colocados na presença de um campo magnético externo, haverá dois estados de *spin*: um alinhado na direção do campo magnético, com menor energia (+1/2), e outro na direção oposta ao campo magnético, de maior energia (-1/2). A diferença de energia ( $\Delta E$ ) entre os dois estados de *spin* aumenta conforme a força do campo magnético, sendo normalmente muito pequena, o que leva à necessidade de altos campos magnéticos. A diferença de energia entre dois estados de *spin* num dado campo magnético é proporcional a seus momentos magnéticos (Figura 5.3). Contudo, apesar de todos os núcleos em uma molécula possuírem os mesmos momentos magnéticos, eles não irão entrar em ressonância na mesma frequência. Isto porque estes valores dependem da densidade eletrônica ao redor do núcleo, gerando campos magnéticos locais. Estes campos magnéticos locais formam uma região de blindagem (a favor do campo magnético) ou desblindagem (contra o campo magnético) em torno do núcleo que irá afetar a frequência na qual o núcleo entra em ressonância. Tais variações no campo magnético são muito pequenas, na faixa de Hz, enquanto as diferenças de frequência entre núcleos diferentes são na ordem de MHz. Para padronizar as frequências de ressonância geradas em espectrômetros de RMN com diferentes campos magnéticos foi criada a escala medida em partes por milhão (ppm) relacionando a frequência em Hz com a frequência em MHz (ou seja Hz/MHz), para designar as diferentes frequências de um mesmo núcleo em uma molécula, denominada de deslocamento químico ( $\delta$ ). Por exemplo, um núcleo que entre em ressonância a uma frequência de 2500 Hz em um espectrômetro de 500 MHz terá um deslocamento químico de 5 ppm. O mesmo valor em ppm será observado se este núcleo for analisado em um espectrômetro de 900 MHz onde teria uma frequência de ressonância de 4500 Hz.

Uma vez que os deslocamentos dos hidrogênios são primariamente determinados por efeitos de blindagem simples eles podem ser preditos e tabelados, como demonstrado por uma calculadora *on line* que prevê deslocamentos químicos de hidrogênio em cadeias alifáticas,

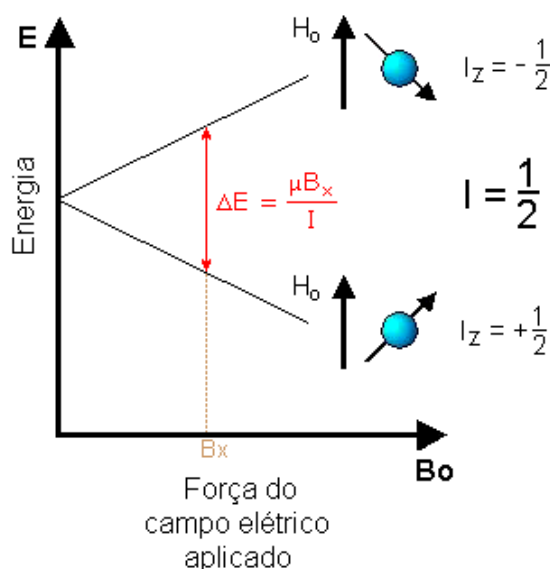
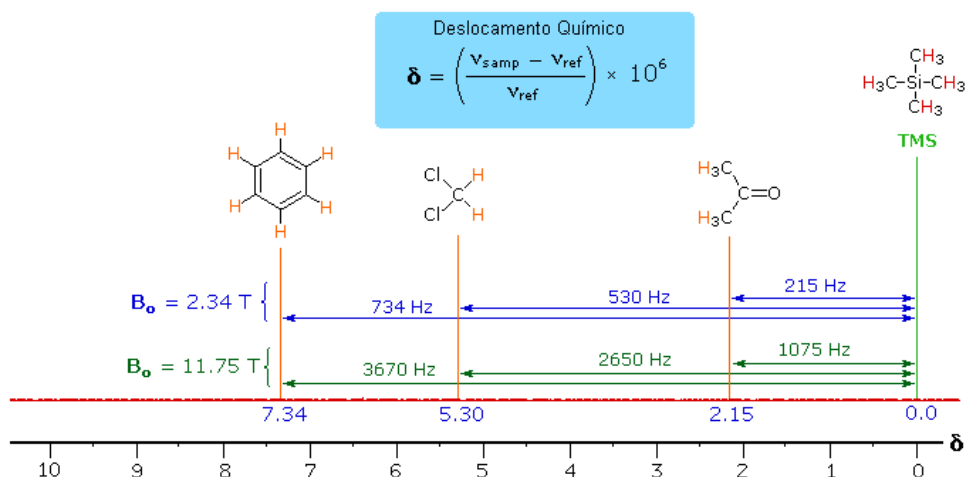


Figura 5.3. Princípio da espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN). Uma carga *spinning* gera um campo magnético, e o *spin*-magneto resultante possui momento magnético ( $\mu$ ) proporcional ao *spin*. Na presença de um campo magnético externo ( $B_0$ ), existem dois estados de *spin*,  $+1/2$  e  $-1/2$ . O momento magnético do estado  $+1/2$  de menor energia está alinhado com o campo externo, mas o estado de *spin*  $-1/2$  de maior energia está oposto a ele. Note que a flecha representando o *campo externo* aponta para o Norte. A diferença de energia ( $\Delta E$ ) entre os dois estados de *spin* é dependente do campo magnético externo, e é sempre muito pequena. O diagrama ilustra que os dois estados de *spin* possuem a mesma energia quando o campo magnético externo é zero, mas diverge conforme ele aumenta. Num campo magnético  $B_x$ , a fórmula para a diferença de energia é dada ( $I = 1/2$ , e  $\mu$  é o momento magnético do núcleo no campo, por exemplo:  $^1\text{H } \mu = 2,7927$ ;  $^{19}\text{F } \mu = 2,6273$ ;  $^{31}\text{P } \mu = 1,1305$ ; e  $^{13}\text{C } \mu = 0,7022$ ).

desenvolvida na Faculdade de Colby, (<http://www.colby.edu/chemistry/NMR/H1pred.html>). Os valores dos deslocamentos químicos fornecem informações a respeito dos diferentes ambientes químicos dos núcleos em uma molécula. A correlação entre os valores de deslocamento químico observados no espectro com a estrutura molecular é chamada atribuição de espectros (do inglês, *assigning spectra*) (Figura 5.4). No caso dos espectros de hidrogênio, a análise da intensidade dos sinais (integração) fornece informações sobre o número de hidrogênios que dão origem ao sinal, podendo ser base para análises quantitativas. A análise deve integrar os picos, e não apenas medir sua altura, uma vez que estes também têm largura. Sendo assim, seu tamanho depende da sua área, e não da altura.

A.



B.

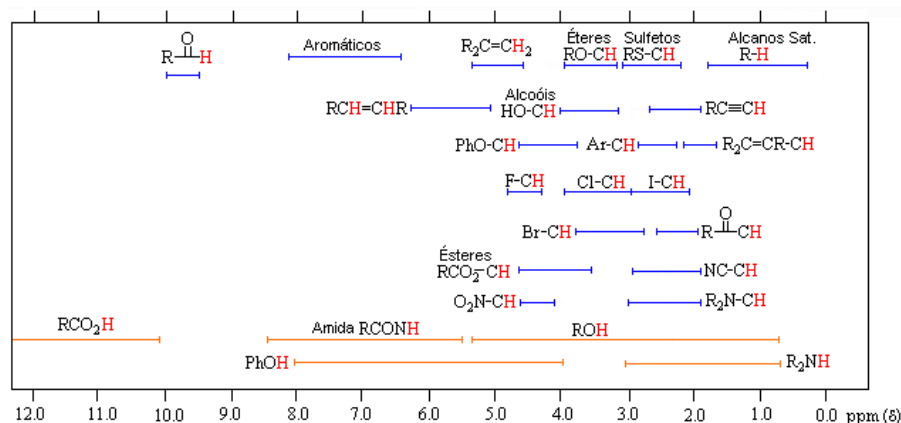


Figura 5.4. Intensidade de sinais de frequência obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) em função do deslocamento químico. A. Sinais de RMN  $^1\text{H}$  para alguns compostos diferentes. A fórmula do deslocamento químico é dada. Note que dependendo do campo magnético aplicado ( $B_0$ ) a frequência entre os sinais muda. Da direita para a esquerda: benzeno, diclorometano, propanona, e tetrametilsilano (TMS, usado normalmente como padrão de sinal, indicado aqui na cor verde). B. Distribuição geral de deslocamentos químicos de prótons associados a diferentes grupos funcionais. Os intervalos são aproximados, e podem não compreender todos os compostos. Note que os intervalos para os prótons dos grupos OH e NH (laranja) são maiores do que aqueles dos grupos CH (azul), devido principalmente a variações na ligação do hidrogênio em concentrações de amostras diferentes. Intervalos para amostras em solução de  $\text{CDCl}_3$ , e escala de deslocamento químico relativa a TMS  $\delta = 0$ .

#### 5.1.4.2 Acoplamento escalar

Algumas das informações mais úteis para elucidação de estruturas vêm do acoplamento escalar (ou acoplamento J, do inglês, *J-coupling*) entre núcleos ativos de RMN.

Este acoplamento se dá a partir da interação de diferentes estados de *spin* através das ligações químicas de uma molécula, resultando numa divisão do sinal de RMN. Estes padrões divididos podem ser complexos ou simples, proporcionando uma visão detalhada sobre a conectividade de átomos em uma molécula.

O acoplamento para o equivalente a  $n$  núcleos com *spin*  $\frac{1}{2}$  separa o sinal em um  $n+1$ , gerando um multipletto com razões de intensidade seguindo o triângulo de Pascal. O acoplamento com *spins* adicionais levará a mais quebras de cada componente do multipletto. Por exemplo, o acoplamento para dois núcleos com *spin*  $\frac{1}{2}$  com constantes de acoplamento significativamente diferentes resultará em uma dupla de dupletos (abreviatura: dd). Note que o acoplamento entre os núcleos que são quimicamente equivalentes (isto é, têm o mesmo deslocamento químico) não tem nenhum efeito sobre os espectros de RMN e os acoplamentos entre os núcleos que são distantes (normalmente mais do que três ligações separadas para hidrogênio em moléculas flexíveis) são geralmente muito pequenos para causar divisões observáveis. Acoplamentos a mais de três ligações podem muitas vezes ser observados em compostos cíclicos e aromáticos (normalmente ocorrem quando há ligações duplas e simples alternadas, onde há maior eficiência da sobreposição dos orbitais  $p$  permitindo a transferência da informação), resultando em padrões mais complexos de divisão (Figura 5.5).

O acoplamento combinado com o deslocamento químico (e a integração para hidrogênio) revela não só o ambiente químico dos núcleos, mas também o número de núcleos ativos de RMN vizinhos no interior da molécula.

#### 5.1.4.3 Espectroscopia por RMN do etanol: um exemplo

Para o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), é esperado um sinal para cada um dos três deslocamentos químicos: um para o grupo  $-\text{CH}_3$ , um para o grupo  $-\text{CH}_2$  e um para o grupo  $-\text{OH}$ . Um típico grupo  $-\text{CH}_3$  possui um deslocamento por volta de 1 ppm, um  $-\text{CH}_2$  ligado a um  $-\text{OH}$  possui um deslocamento de cerca de 4 ppm e um  $-\text{OH}$  possui um deslocamento de cerca de 2-3 ppm dependendo do solvente utilizado. Devido ao movimento molecular à temperatura ambiente, os três hidrogênios do  $-\text{CH}_3$  chegam a uma média durante o curso do experimento (que tipicamente requer alguns milissegundos). Estes hidrogênios se tornam degenerados e formam um sinal no mesmo deslocamento químico. A forma e área dos picos também são indicativas da estrutura química. No exemplo em questão, o sinal do  $-\text{CH}_3$  teria três vezes a área do sinal de  $-\text{OH}$ . Similarmente o sinal do  $-\text{CH}_2$  teria o dobro da área de  $-\text{OH}$  mas apenas  $\frac{2}{3}$  da área do sinal de  $-\text{CH}_3$ . Contudo, devido ao acoplamento escalar, o

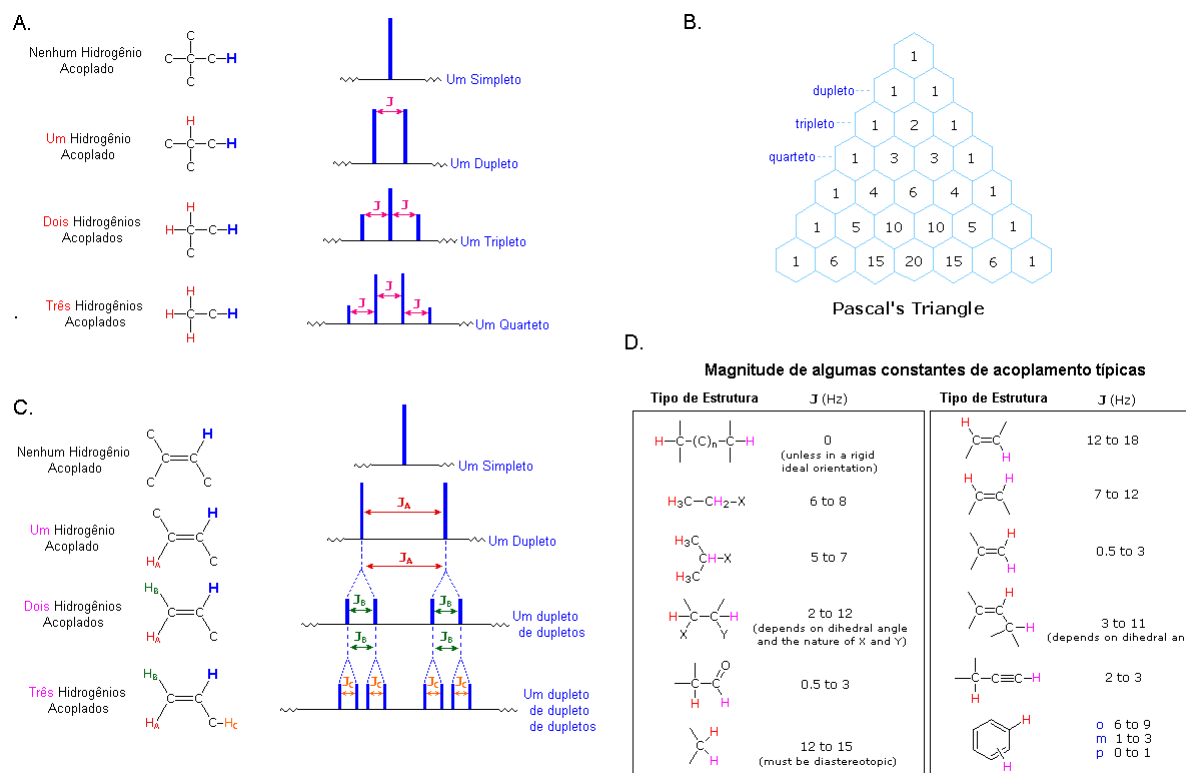


Figura 5.5. Efeito do acoplamento escalar na espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN). A. O padrão de divisão de um dado núcleo (ou grupo de núcleos equivalentes) pode ser previsto pela regra do  $n+1$ , onde  $n$  é o número de núcleos vizinhos acoplados com a mesma (ou similar) constante de acoplamento de  $J$  (unidade em Hz). Se há dois núcleos vizinhos acoplados, o sinal observado será um triplete ( $n=2$ ,  $n+1=3$ ). Em todos os casos, a(s) linha(s) central(is) do padrão de divisão terão maior intensidade do que as periféricas. B. As intensidades das linhas de divisão são dadas pelos números em um triângulo de Pascal. C. Se um dado núcleo está acoplado com dois ou mais conjuntos de núcleos vizinhos por diferentes valores de  $J$ , a regra do  $n+1$  não prevê todo o padrão de divisão. Ao invés disso, a divisão dada por conjunto  $J$  é adicionada aquela esperada para os outros conjuntos  $J$ . D. Magnitudes das constantes de acoplamento  $J$  para alguns núcleos vizinhos.

grupo  $-\text{CH}_3$  é dividido em um triplete, com uma razão de intensidade de 1:2:1, pelos dois hidrogênios vizinhos do  $-\text{CH}_2$ . Da mesma forma, o  $-\text{CH}_2$  está dividido em um quarteto, com uma proporção de intensidade de 1:3:3:1, pelos três hidrogênios vizinhos do  $-\text{CH}_3$ . Em princípio, os dois hidrogênios do  $-\text{CH}_2$  também seriam divididos novamente em um duplete para formar um duplete de quartetos pelo hidrogênio do  $-\text{OH}$ , mas a troca intermolecular do próton do ácido hidróxilo muitas vezes resulta numa perda de informação de acoplamento (Figura 5.6).

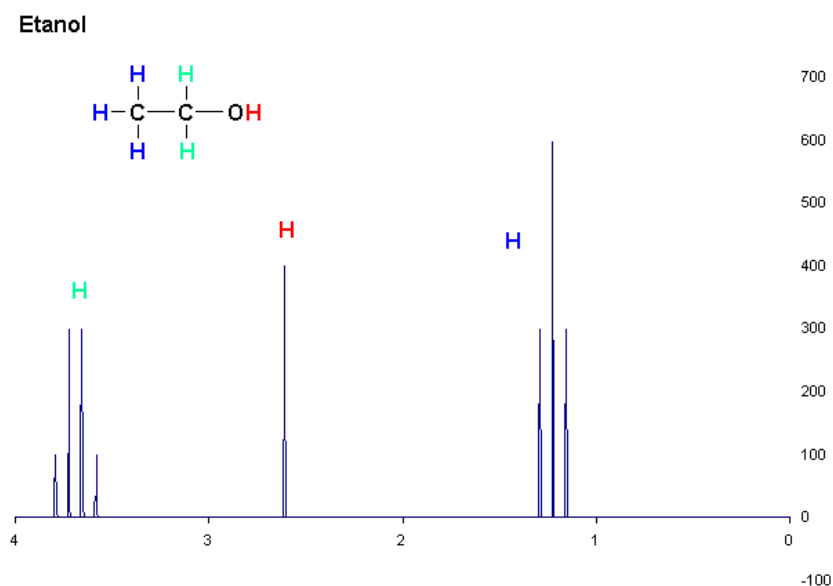


Figura 5.6. Exemplo do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do etanol plotado como intensidade do sinal contra o deslocamento químico. Há três tipos diferentes de átomos de hidrogênio (H) no etanol em relação à RMN. O hidrogênio no grupo  $-\text{OH}$  não está acoplado com os outros átomos de H e aparece como um simpleto, mas os H dos grupos  $-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_2$  estão acoplados uns com os outros, resultando num tripleto e num quarteto, respectivamente.

### 5.1.5 Objetivos\*

- Comparar os perfis metabólicos de três espécies do gênero *Mycale* Gray, 1867 obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos núcleos de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ );
- Contrastar as similaridades metabólicas entre as espécies com suas relações evolutivas;
- Determinar as diferenças nos perfis metabólicos entre grupos de indivíduos metabolicamente relacionados.

---

\* A identificação dos compostos dos perfis metabólicos não será realizada neste trabalho uma vez que a identificação destes por deslocamentos químicos em misturas complexas, além de demandar um enorme esforço e ser demorado, pode apresentar uma série de problemas como alta sobreposição de picos, subestimativa dos compostos na mistura, e potenciais interações iônicas e de pH que podem fazer com que os picos de um composto desviem do esperado. A identificação destes se dará num segundo momento, quando for construída uma base de dados mais completa para a busca de compostos específicos e as técnicas forem dominadas.

## 5.2 Material e Métodos

### 5.2.1 Coleta de material

Para avaliar o conteúdo metabolômico de *Mycale*, 11 indivíduos pertencentes a três subgêneros diferentes foram coletados em campo e trazidos vivos para o laboratório em sacos plásticos com água do mar natural. A coleta ocorreu no Município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro, nas docas da Pousada Jamanta (aproximadamente 23° 01' 15" S, 44° 19' 44" O). As espécies coletadas foram: *Mycale (Aegogropila) americana* van Soest, 1984 (N = 5), *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927 (N = 3) e *Mycale (Zygomycale) angulosa* (Duchassaing e Michelotti, 1864) (N = 3). Estas foram numeradas em campo conforme ordem de coleta, e um código de identificação conforme a espécie, onde A = *M. angulosa*, E = *M. americana* e I = *M. microsigmatosa*. A seguir, as amostras foram congeladas em refrigerador à -20 °C, as quais permaneceram estocadas até a extração. Foi, ainda, retirada uma subamostra dos indivíduos para extração de DNA a fim de estabelecer uma relação filogenética entre os indivíduos. A extração de DNA, amplificação, sequenciamento, edição alinhamento e reconstrução filogenética das sequências foram feitas de acordo com o Capítulo 1 deste trabalho.

### 5.2.2 Extração de metabólitos

Frascos âmbar de 50 mL foram lavados, rinsados com água destilada e secos em estufa à 60 °C. Em seguida, os frascos foram rotulados de acordo com o número dado às amostras, e pesados, sem suas tampas, em balança eletrônica de precisão Scientech<sup>®</sup> SA210. Por fim, foram guardados tampados em refrigerador à -20 °C. As amostras congeladas foram então transferidas para seus respectivos frascos, os quais foram revestidos com papel-filme, abrindo-se nestes pequenos rasgos no lugar da boca do frasco, e liofilizadas por 24 horas em liofilizador Christ<sup>®</sup> LOC-2m no Laboratório de Radioclimatologia e Mudanças Globais (LARAMG) da UERJ.

As amostras secas foram pesadas novamente em balança de precisão (novamente sem as tampas), e peso seco da amostra calculado [ $\text{Peso}_{(\text{frasco} + \text{amostra seca})}(\text{g}) - \text{Peso}_{(\text{frasco})}(\text{g})$ ]. As amostras foram então trituradas com bastão de vidro, e 10 mL de metanol 100 % (CH<sub>3</sub>OH), da marca MERCK<sup>®</sup>, foram adicionados para cada 1 g de peso seco da amostra. Os frascos foram revestidos com papel-filme para vedação e acondicionados em agitador por 12 dias. As amostras foram então decantadas, e o solvente transferido para um tubo de ensaio limpo, após filtração em papel filtro. Foram transferidos até 900 µL do extrato bruto filtrado para



microtubos de polipropileno de 1,5 mL, do tipo Eppendorf. Este foi centrifugado em microcentrífuga a 10000 rpm por 20 min a fim de retirar o restante da matéria particulada após filtragem. Por fim, estes foram secos em concentrador SpeedVac Thermo<sup>®</sup> Savant DNA110 por 30 minutos.

### 5.2.3 Ressonância Magnética Nuclear

As amostras foram dissolvidas diretamente em 0,6 mL de CD<sub>3</sub>OD e colocadas em tubos de RMN de 5 mm. Os espectros de RMN <sup>1</sup>H foram feitos em um espectrômetro da Agilent Technologies operando a 499,98 MHz. Todos os espectros foram adquiridos a 25 °C com uma largura espectral de 5252.1 Hz, 16 K de pontos e 128 *scans* (acumulações). Os sinais FID (do inglês, *Free induction decay*) foram transformados por Fourier, as fases e a linha de base dos espectros resultantes foram corrigidos manualmente e calibrados e normalizados para o tetrametilsilano (TMS) a 0.000 ppm usando o programa Mestrelab<sup>®</sup> MestReNova 6.

### 5.2.4 Análise dos dados

Antes das análises estatísticas, os espectros foram alinhados utilizando o pacote *icoshift* (SAVORANI *et al.*, 2010) implementado no programa MATLAB<sup>®</sup> R2012a, a fim de corrigir erros posicionais nos espectros oriundos de ligeiros desvios de campo magnético. O método de alinhamento baseia-se num modelo de inserção e deleção para intervalos de deslocamentos de espectros e depende de um núcleo de computação eficiente baseado na Transformação Rápida de Fourier (FFT, do inglês *Fast Fourier Transform*). O alinhamento foi realizado dividindo os vetores dos espectros em setores, cujos intervalos foram definidos manualmente, de forma a incluir todos os multipletos, mas sem que estes fossem separados entre si. O vetor alvo para cada seção foi determinado pela média dos valores multiplicado por três, e o alinhamento utilizou o algoritmo de busca rápida para a melhor correção de deslocamento naquele intervalo.

Em seguida, os valores de intensidade de cada espectro foram padronizados em relação a média e ao desvio-padrão. Foi incluída na análise apenas a região de 0.5 a 9.5 ppm, com a exclusão da região de 4.5 a 5.5 ppm por apresentar um sinal de intensidade muito elevada e cuja curva inclui outros picos que muitas das vezes não podem ser detectados, o que implicaria em um erro de classificação. Considerando cada amostra como uma variável independente, cujos valores correspondiam aos vetores de seu espectro, foi realizada uma

análise de componentes principais (PCA) usando o algoritmo NIPALS (*Non-Linear Iterative Partial Least Squares*) com 50 iteração e critério de convergência igual a 0,0001, onde o número de componentes extraídos foi determinado por validação cruzada (V-fold = 7). Os autovalores dos componentes extraídos foram utilizados para construir um gráfico tri-dimensional. A visualização da classificação das amostras por similaridade foi realizada por meio de uma análise de agrupamento por árvore hierárquica, na qual foi utilizada a regra de amalgamação de ligação completa e as distâncias estimadas por meio de 1 - a correlação  $r$  de Pearson. Esta foi contrastada com a árvore filogenética obtida a partir das sequências de 16S conforme descrito anteriormente (ver Capítulo 1). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa StatSoft<sup>®</sup> STATISTICA<sup>®</sup> 7.

Foi realizada uma análise considerando apenas os sinais de frequência encontrados nos espectros. Os sinais foram tabulados binariamente (ausência = 0, presença = 1) ao longo da escala de ppm (com duas casas decimais). A matriz resultante foi submetida a uma análise por inferência bayesiana (BI) usando um modelo binário, calculando a verossimilhança apenas das posições informativas, e submetido a 100.000 gerações de cadeias de Markov via Monte Carlo, sendo amostradas a cada 10 gerações, e descartando, ao final, 25 % dos dados obtidos nas primeiras cadeias. Um grupo externo (OUT) artificial foi utilizado, para fins de enraizamento, o qual considerou ausente todos os picos. Para tal, foi utilizado o programa MrBayes v3.1 (HUELSENBECK e RONQUIST, 2003; RONQUIST e HUELSENBECK, 2005).

Para fins comparativos, grupos de amostras definidos com base na sua similaridade por presença e ausência nos picos encontrados por RMN <sup>1</sup>H, onde os grupos mais abrangentes foram determinados por suporte dos ramos e especificidade. Foi calculada a média dos vetores dos grupos formados, e estes foram subtraídos entre si de forma a obter um vetor resultante. O vetor resultante foi utilizado para a construção de gráficos espectrais das regiões analisadas, nos quais os valores positivos equivalem aos vetores maiores no primeiro grupo, e os negativos aos vetores maiores no segundo grupo. Os gráficos espectrais reduzidos entre os grupos foram construídos no Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 2003.

### 5.3 Resultados

#### 5.3.1 Extração dos metabólitos

As amostras apresentavam grande diferença de biomassa, o que reflete os diferentes tipos de forma de crescimento de cada espécie. As amostras com maior peso seco foram aquelas correspondentes a indivíduos maciços ou com ramos eretos, tendo sido os incrustantes os que apresentaram menor peso seco. Além disso, uma parcela considerável do solvente adicionada para a extração dos metabólitos se manteve retida pela amostra, sendo que apenas uma parcela do total pôde ser recuperada. Esta se mostrou inicialmente turva devido à suspensão de partículas do tecido da esponja após maceração. Contudo, após centrifugação, os extratos se mostraram límpidos, com uma coloração, em geral, bem similar a da esponja ainda *in vivo*, indo do laranja escuro, quase vermelho, ao amarelo acastanhado. Os extratos apresentaram uma viscosidade acentuada, e em alguns casos, gotículas de lipídios puderam ser observadas, as quais se mostraram mais nítidas durante o procedimento de secagem, resultando em uma camada lipídica superficial, dificultando a evaporação do solvente. Após a secagem, os precipitados apresentaram uma coloração escura, indo do castanho ao marrom, de aspecto friável. Foi possível observar também que durante a secagem os extratos deixaram um resíduo, da mesma coloração do extrato, na parede dos microtubos. A Tabela 5.1 mostra os valores de peso seco, volume de solvente adicionado às amostras, volume recuperado e retenção de solvente pelo tecido para cada amostra. Infelizmente, devido a um erro metodológico, não foi possível obter os pesos dos precipitados após secagem, os quais serviriam para estimar o rendimento da extração e padronizar a solubilização destes em igual concentração.

#### 5.3.2 Espectros de RMN <sup>1</sup>H

Os espectros obtidos após a transformação de Fourier, ajuste de fase e linha de base, calibração e normalização podem ser vistos na Figura 5.7. Nesta, é possível observar certo padrão dos sinais entre as amostras. Por exemplo, todas as amostras apresentaram um sinal com alta intensidade e uma base larga em torno de 4,8 ppm correspondente ao hidrogênio do OH do metanol (solvente usado no preparo das amostras) – e um sinal em 3,31 ppm que corresponde aos hidrogênios do CH<sub>3</sub> do metanol. Por outro lado, alguns sinais só foram observados em algumas amostras, como os dois picos em torno de 9,2 e 8,9 ppm nas amostras I5 e I16 (ver Apêndice J).

Tabela 5.1. Sumário do procedimento de extração metanólica dos metabólitos de *Mycale* Gray, 1867. Os códigos correspondem às amostras das espécies *M. (Z.) angulosa* (A), *M. (Aeg.) americana* (E), e *M. (C.) microsigmatosa* (I). Os valores indicados correspondem a: peso seco das amostras, em g (PS); volume de metanol adicionado às amostras, em mL ( $V_0$ ); volume do extrato recuperado das amostras, em mL ( $V_1$ ); percentagem do solvente retido pelas amostras (R); volume da amostra submetido a secagem e utilizado subsequentemente a análise em RMN  $^1\text{H}$ , em mL ( $V_S$ ); percentagem do volume extraído que foi submetido a secagem (S). Ver texto para mais detalhes.

Amostra	PS	V1	V2	R	VS	S
A2	0.52	5.20	2.90	44.24	0.90	31.0
A12	0.36	3.58	1.10	69.30	1.10	100.0
A14	0.82	8.23	4.90	40.45	0.90	18.4
E6	0.34	3.44	2.10	38.90	0.90	42.9
E9	0.06	1.25	0.60	51.85	0.60	100.0
E10	0.22	2.17	1.00	53.85	1.00	100.0
E11	0.04	0.80	0.20	75.00	0.20	100.0
E13	0.31	3.07	0.90	70.68	0.90	100.0
I5	1.57	15.70	9.60	38.86	0.90	9.4
I7	0.56	5.58	3.30	40.81	0.90	27.3
I16	0.20	1.97	1.10	44.28	1.10	100.0

### 5.3.3 Análise dos dados

A análise de componentes principais resultou na extração de quatro componentes capazes de explicar 98,8 % dos dados, sendo que destes, o componente 1 compreendeu cerca de 85,4 % da variação dos dados, seguindo por 6,5 % no componente 2, 4,5 % no componente 3, e 2,4 % no componente 4 (Tabela 5.2). Ainda, a análise revelou a existência de três grupos bem definidos ao longo do componente 2, e dentro destes, a existência de uma separação mais profunda ao longo dos componentes 3 e 4 (Figura 5.8.A). Nesta é possível observar que o componente 2 separa as três espécies, *M. (Z.) angulosa* (A), *M. (Aeg.) americana* (E), e *M. (C.) microsigmatosa* (I), o componente 3 separa as amostras E9, E11 e I16 das demais amostras destas espécies, e o componente 4, assim como o componente 3, separa as amostras E9, E11 e I16 de suas coespecíficas além de separar a amostra A12 das demais de *M. (Z.) angulosa*.

A análise de agrupamentos revelou que os perfis metabólicos das três espécies divergem entre si, havendo mais similaridade entre os espectros intraespecíficos do que entre os interespecíficos (Figura 5.8.B, direita). Nesta também foi possível verificar que dentro de

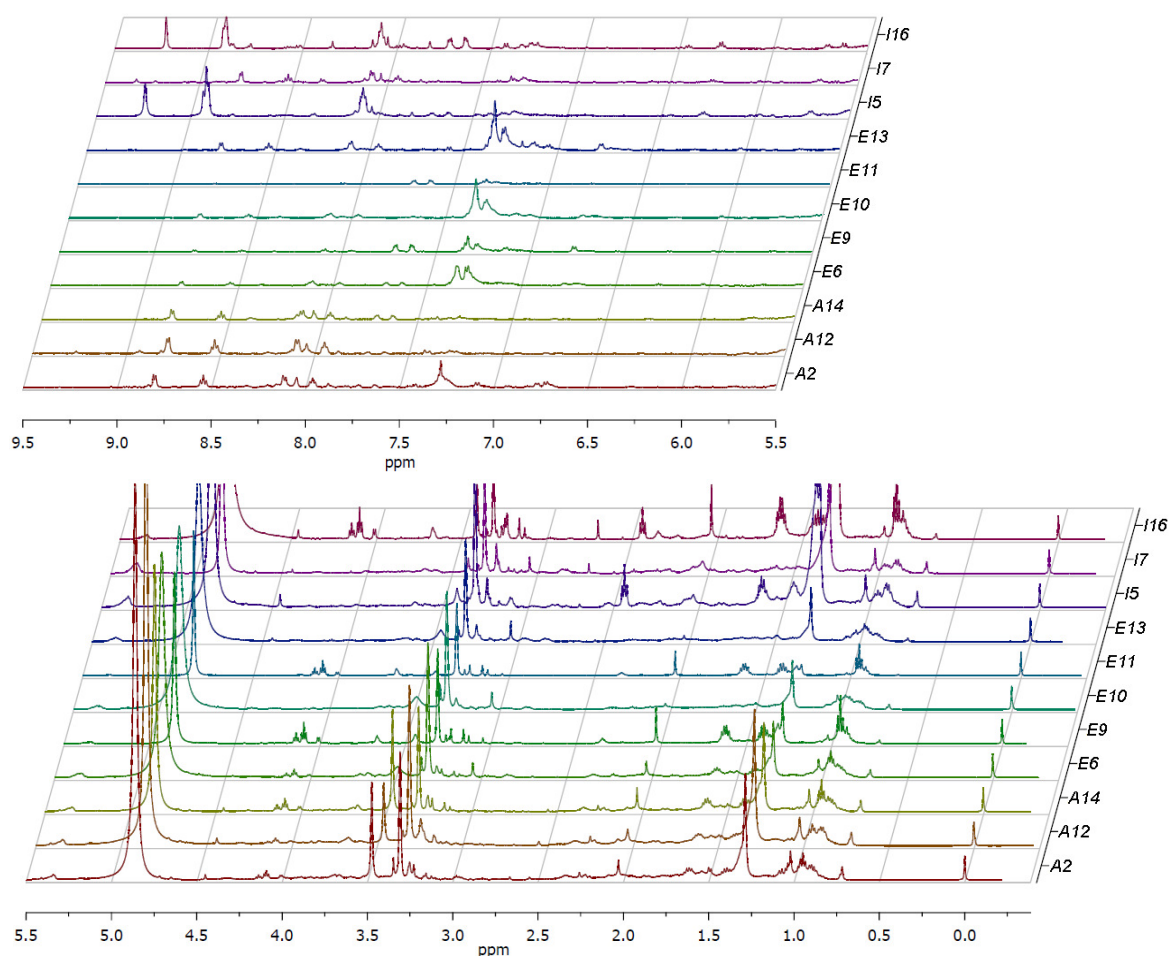


Figura 5.7. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) obtidos para as amostras de *Mycale* Gray, 1867. Espectros após transformação de Fourier, ajuste de fases e linha de base, calibração e normalização para o tetrametilsilano (TMS) a 0.000 ppm. Os espectros são mostrados empilhados para facilitar a comparação dos picos encontrados. Os códigos indicados à direita correspondem às amostras das espécies *M. (Z.) angulosa* (A), *M. (Aeg.) americana* (E), e *M. (C.) microsigmatosa* (I).

*M. (Aeg.) americana* (E) e *M. (C.) microsigmatosa* (I) houve amostras que apresentaram grande divergência, as mesmas que se mostraram separadas pela PCA. Desta forma, em E é possível definir dois subgrupos constituídos por E6, E10 e E13 no primeiro, e E9 e E11 no segundo, e I se separa em I5 e I7 num subgrupo e I16 isolado no segundo. Contudo, a similaridade entre os perfis metabólicos das espécies de *Mycale* diferem das relações filogenéticas entre estas (Figura 5.8.B, esquerda). Enquanto que a filogenia entre as três espécies suporta uma relação mais próxima entre *M. (Z.) angulosa* e *M. (C.) microsigmatosa*, sendo *M. (Aeg.) americana* mais distante destas, a análise dos perfis metabólicos indica a composição metabólica de A é mais similar da de E, sendo I mais distante destas.

Tabela 5.2. Sumário da análise de componentes principais (PCA) dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ . Na tabela estão reportados: os componentes extraídos da análise (C); a fração da variação dos dados explicada por cada componente ( $R^2X$ ); a fração cumulativa da variação a cada componente incorporado na análise ( $R^2X$  (Cumul.)); os autovalores de cada componente; a fração da variação explicada pelo modelo ( $Q^2$ ); a fração cumulativa da variação explicada a cada componente incorporado na análise ( $Q^2$  (Cumul.)); o número de iterações de cada componente. Ver texto para mais detalhes.

C	$R^2X$		Autovalor	$Q^2$		Iter.
	$R^2X$	(Cumul.)		$Q^2$	(Cumul.)	
1	0,854	0,854	9,391	0,852	0,852	3
2	0,065	0,919	0,720	0,919	0,988	11
3	0,045	0,964	0,492	0,963	1,000	5
4	0,024	0,988	0,269	0,988	1,000	3

Contudo, a inferência bayesiana binária por presença e ausência de picos entre as amostras revelou relações diferentes entre as encontradas por distância (Figura 5.9; a matriz binária dos sinais encontrados nas amostras para os respectivos deslocamentos químicos pode ser encontrada no Apêndice J). Nesta é possível observar que as amostras I16, E9 e E11 possuem uma relação mais próxima entre si do que com suas coespecíficas, enquanto que a análise de agrupamentos por distância resultou unicamente em grupos espécie-específicos. Deste modo, quatro grupos podem ser definidos, o primeiro, A, compreendendo as amostras de *M. (Z.) angulosa*, o segundo, I', que abrange as amostras I5 e I7 de *M. (C.) microsigmatosa*, o terceiro grupo, E', que abarca as amostras E6, E10 e E13 de *M. (Aeg.) americana*, e por fim, o grupo entre as amostras não pertencentes às mesmas espécies, aqui subdividido em E'', com as amostras E9 e E11, e I'', correspondentes a amostra I16. Outra divergência entre a análise de agrupamentos por distância e a bayesiana binária foi a relação

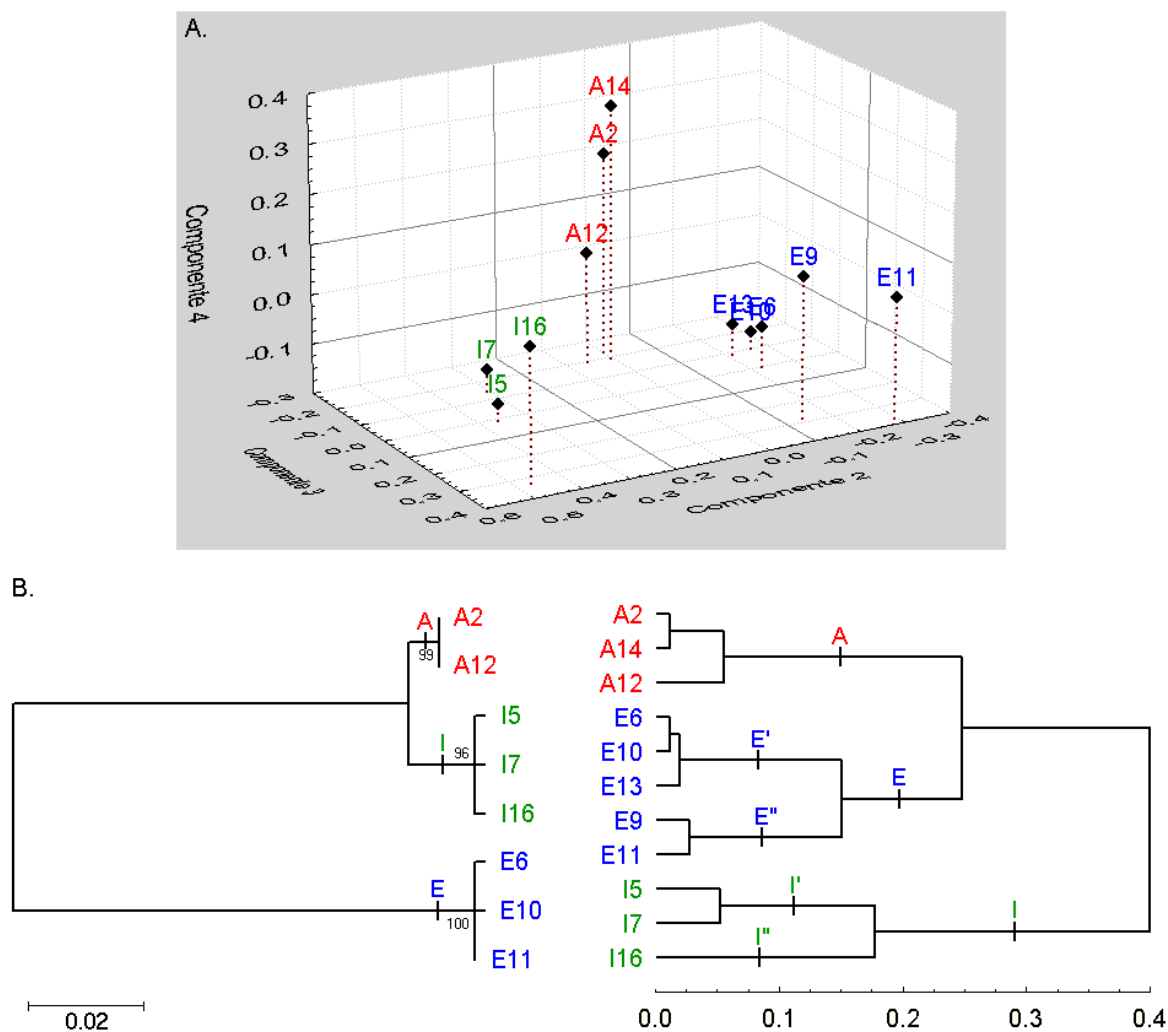


Figura 5.8. Análise dos perfis metabólicos de *Mycale* Gray, 1867. A. Gráfico tri-dimensional (x, y, z) dos vetores dos componentes obtidos na PCA (componentes 2, 3 e 4, respectivamente) realizado entre os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das amostras de *Mycale*. As linhas de grade sólidas indicam pontos de referência para a separação de grupos. B. Contraste entre as relações evolutivas das espécies analisadas obtida por meio do marcador 16S e reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) (esquerda) e a similaridade dos perfis metabólicos obtida por análise de agrupamento em árvore hierárquica dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ . Os códigos e as cores às amostras das espécies *M. (Z.) angulosa* (A, vermelho), *M. (Aeg.) americana* (E, azul), e *M. (C.) microsigmatosa* (I, verde). Ver texto para mais detalhes.

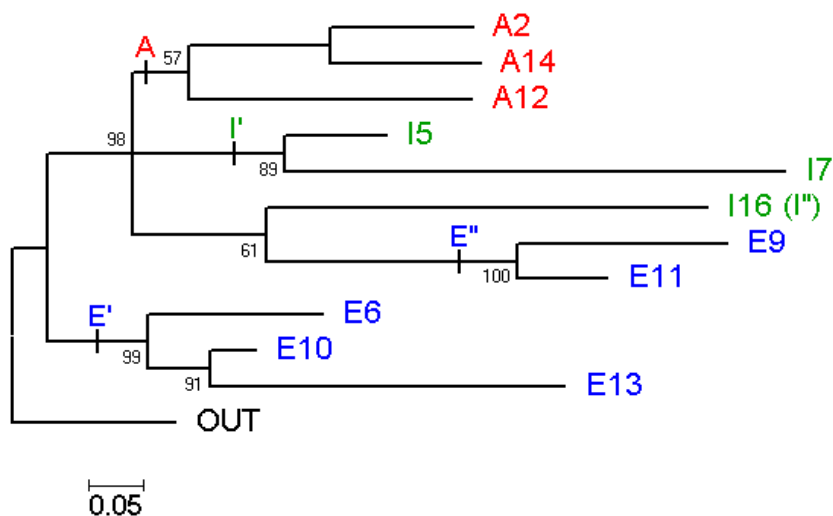


Figura 5.9. Topologia das relações entre as amostras de *Mycale* Gray, 1867, obtida por Inferência Bayesiana (BI) binária a partir dos sinais encontrados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ . A BI foi realizada calculando a verossimilhança apenas das posições informativas com 100.000 gerações de cadeias de Markov via Monte Carlo, amostradas a cada 10 gerações, com 25 % dos dados descartados no final. Um grupo externo (OUT) artificial foi utilizando, considerando ausente todos os picos. Os códigos e as cores às amostras das espécies *M. (Z.) angulosa* (A, vermelho), *M. (Aeg.) americana* (E, azul), e *M. (C.) microsigmatosa* (I, verde). Os grupos definidos por suporte A, E', E'' e I' são indicados acima dos ramos. A amostra I16 corresponde, sozinha, ao grupo I'' considerado. Ver texto para mais detalhes.

mais próxima entre os perfis metabólicos de *M. (Z.) angulosa* e *M. (C.) microsigmatosa* do que com a maioria das amostras de *M. (Aeg.) americana*, o que, em parte, está em congruência com a filogenia obtida por 16 S (Figura 5.8.B, esquerda).

Os espectros reduzidos entre os grupos interespecíficos revelaram que certos sinais apresentaram forte caráter de especificidade. Com base nestes, é possível observar que o grupo E' e I' apresentam muito mais sinais em relação ao grupo A, enquanto que a distribuição de picos entre E' e I' se encontra mais balanceada (Tabela 5.3; Figuras 5.10 e 5.11). Dentre os sinais característicos de E' em relação a A, há dois multipletos por volta de 8,8 e 8,5 ppm, outro em 8,3 ppm, um grupo de sinais entre 8,1 e 7,8 ppm, dois multipletos por volta de 7,7 e 7,6 ppm, um grupo de sinais entre 7,5 e 7,0 ppm, um multipletos em 6,8 e outro em 6,3, um grupo de sinais a partir de 5,7 ppm, dois multipletos em torno de 4,1 ppm, um sinal em 4,0, em grupo de sinais entre 3,5 e 3,1 ppm, um sinal por volta de 2,0 ppm, dois multipletos em torno de 1,6 e 1,4 ppm, com um sinal intenso em 1,2 ppm, um grupo de sinais entre 1,1 e 0,8



ppm, e um sinal em 0,7 ppm (Figuras 5.10.A e 5.11.A). Entre A e I' é possível observar algumas ligeiras diferenças, entre as quais, alguns picos característicos encontrados em A, mas não em I', como um sinal por volta de 7,3 ppm e dois multipletos em torno de 7,1 e 6,7 ppm. Inversamente, dentre os sinais característicos de I' em contraste com A, temos dois sinais por volta de 9,3 e 9,2 ppm, um multipletto por volta de 8,9. A partir daí, os característicos de I' se assemelham aos de E' em relação a A, com exceção da ausência de um grupo de sinais entre 7,5 e 7,0 ppm, um sinal em 2,7 ppm e a presença de um multipletto por volta de 2,4 ppm (Figuras 5.10.B e 5.11.B). O contraste entre os espectros dos grupos E' e I' mostram que as diferenças entre estes se resumem a alguns sinais, como a presença, em I' de sinais por volta de 9,3 e 9,2 ppm, um multipletto por volta de 8,9, um sinal em 2,7 ppm, e multipletto por volta de 2,4 ppm e uma maior intensidade em alguns grupos de sinais, uma vez que estes estão presentes em ambos os grupos, como por volta de 8,1, 6,2, 5,7, 3,4, 2,2, 2,0, 1,6, 1,4, 1,3 ppm. Inversamente, os sinais encontrados em E', mas não em I' incluem um complexo de picos entre 7,5 e 7,0 ppm e um multipletto em 6,8. No mais, E' apresenta uma maior intensidade de certos picos também encontrados em I', como 8,5, 7,9, 7,6, 4,1, 3,4, 3,1 3,0 e 0,9 ppm (Figuras 5.10.C e 5.11.C).

Tabela 5.3. Diferença aproximada na intensidade dos sinais de frequência encontrados nos intervalos de deslocamento químico dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  das espécies de *Mycale* Gray, 1867. Diferenças de intensidade conforme determinado pelos espectros médios subtraídos entre os grupos A, E' e I' (ver Figuras 5.10 e 5.11). Ver texto para mais detalhes.

ppm	Intensidade	ppm	Intensidade
9,0 - 8,8	I' > A = E'	6,5 - 5,5	E' = I' > A
8,0 - 7,8	E' = I' > A	3,7 - 3,6	E' = I' > A
0,7 - 0,6	I' > E' > A	3,5 - 3,0	E' = I' > A
9,5 - 9,0	I' > A = E'	4,2 - 3,9	E' = I' > A
8,8 - 8,7	E' = I' > A	2,7 - 2,6	I' > A = E'
8,6 - 8,5	E' = I' > A	2,5 - 2,4	I' > A = E'
8,4 - 8,3	E' = I' > A	2,1 - 2,0	E' = I' > A
8,2 - 8,0	I' > E' > A	1,7 - 1,5	I' > E' > A
7,8 - 7,6	E' = I' > A	1,5 - 1,2	I' > E' > A
7,5 - 7,0	E' > A = I'	1,1 - 0,8	E' = I' > A

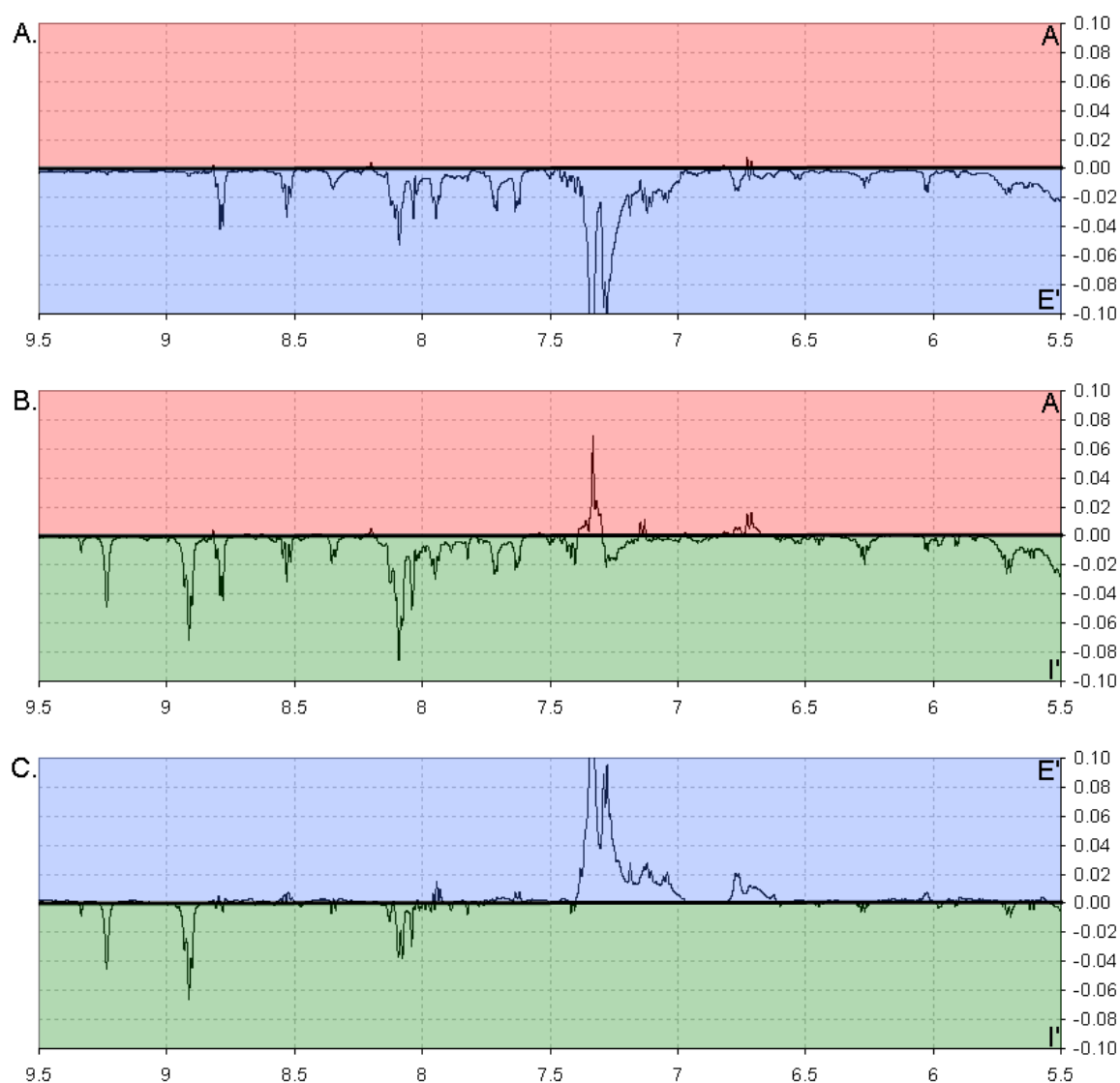


Figura 5.10. Diferenças interespecíficas dos perfis metabólicos das espécies de *Mycale* Gray, 1867, para os espectros de RMN  $^1\text{H}$  na faixa de 9,5 a 5,5 ppm. Diferenças entre os espectros médios subtraídos entre os grupos A e E' (A), A e I' (B) e E'e I' (C). Grupos definidos com base na sua similaridade por presença e ausência dos sinais encontrados por RMN  $^1\text{H}$  por meio de Inferência bayesiana. Os sinais característicos de cada grupo se encontram acima ou abaixo da linha do zero, destacado por cores: vermelho (A), azul (E') e verde (I'). Ver texto para mais detalhes.

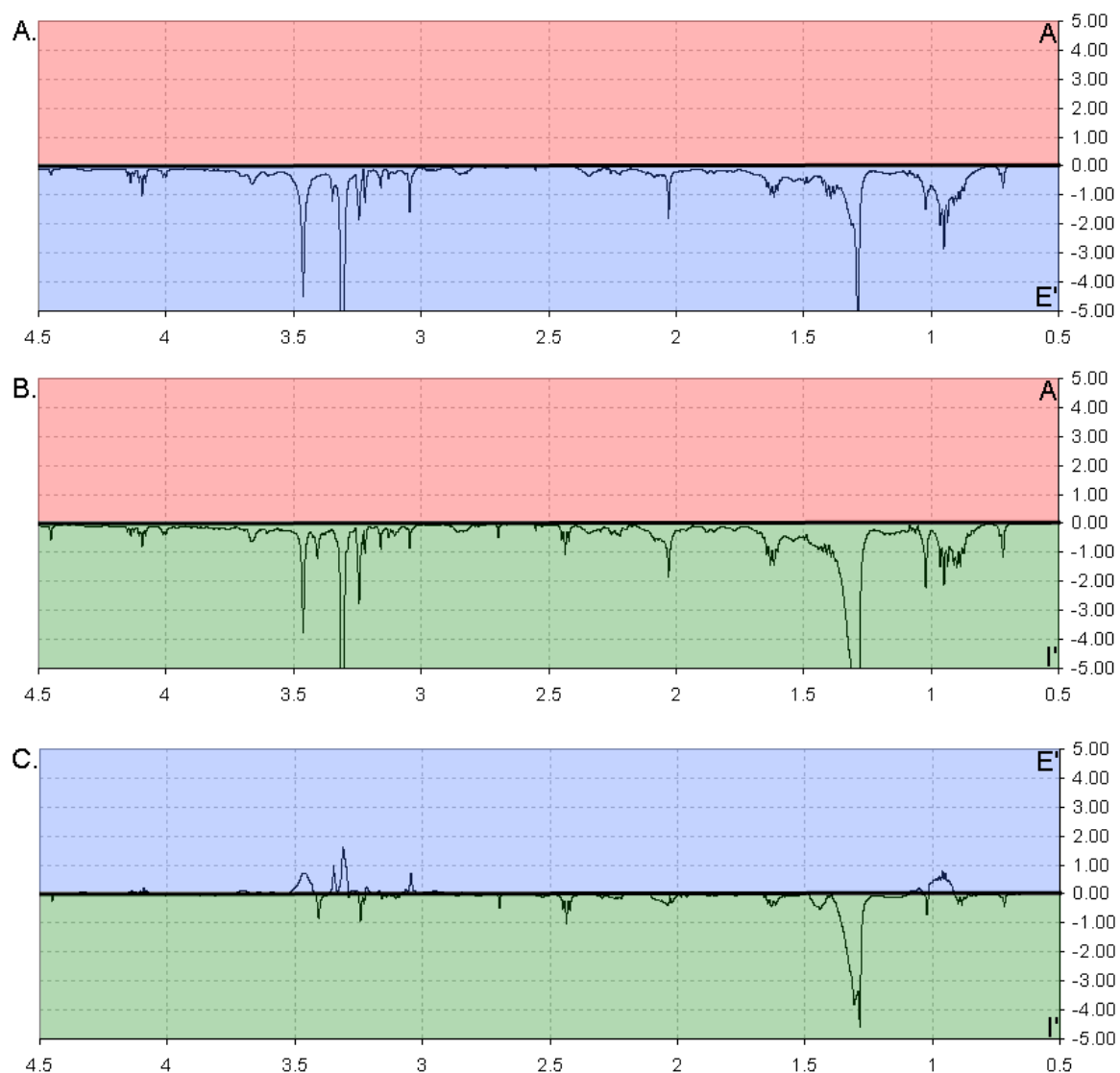


Figura 5.11. Diferenças interespecíficas dos perfis metabólicos das espécies de *Mycale* Gray, 1867, para os espectros de RMN  $^1\text{H}$  na faixa de 4,5 a 0,5 ppm. Diferenças entre os espectros médios subtraídos entre os grupos A e E' (A), A e I' (B) e E' e I' (C). Grupos definidos com base na sua similaridade por presença e ausência dos sinais encontrados por RMN  $^1\text{H}$  por meio de Inferência bayesiana. Os sinais característicos de cada grupo se encontram acima ou abaixo da linha do zero, destacado por cores: vermelho (A), azul (E') e verde (I'). Ver texto para mais detalhes.

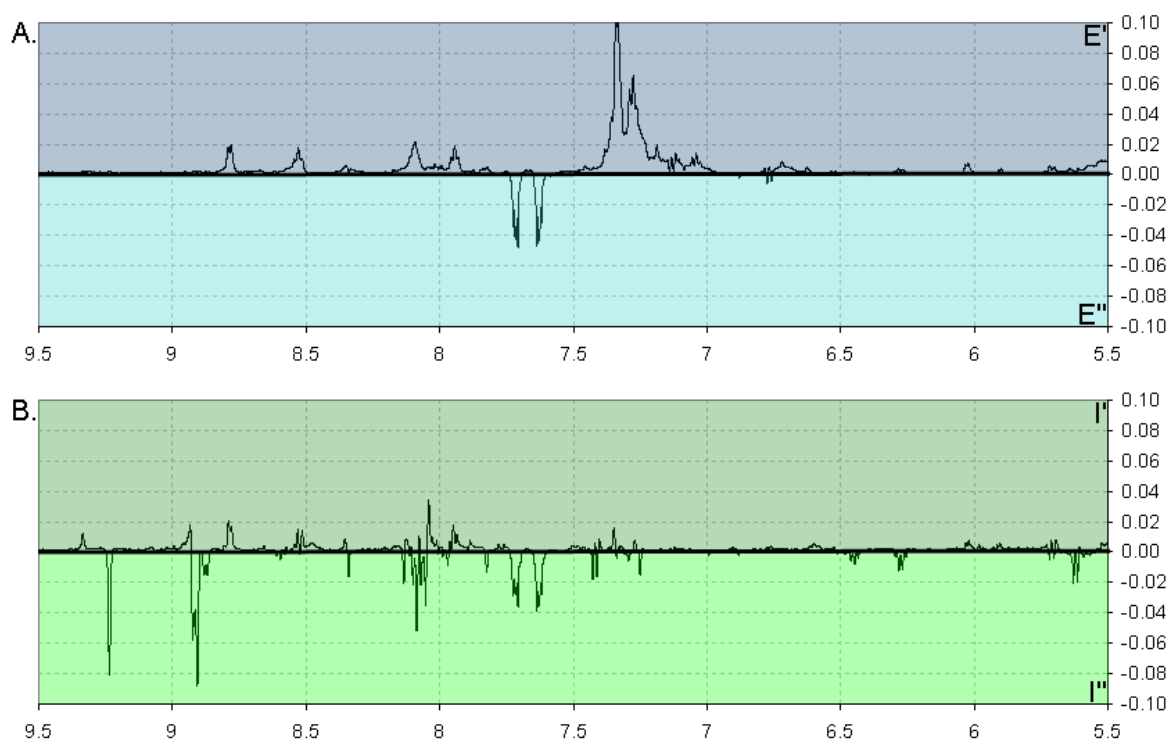


Figura 5.12. Diferenças intraespecíficas dos perfis metabólicos das espécies de *Mycale* Gray, 1867, para os espectros de RMN  $^1\text{H}$  na faixa de 9,5 a 5,5 ppm. Diferenças entre os espectros médios subtraídos entre os grupos E' e E'' (A), I' e I'' (B). Grupos definidos com base na sua similaridade por presença e ausência nos picos encontrados por RMN  $^1\text{H}$  por meio de Inferência bayesiana. Os picos característicos de cada grupo se encontram acima ou abaixo da linha do zero, destacado por cores: azul escuro (E'), azul claro (E''), verde escuro (I') e verde claro (I''). Ver texto para mais detalhes.

Por fim, os espectros médios intraespecíficos subtraídos entre os grupos E' e E'' e os grupos I' e I'' revelaram haver maior similaridade na ocorrência de sinais entre E'' e I'', do que entre seus coespecíficos (Figuras 5.12 e 5.13), como evidenciado pela inferência bayesiana (ver Figura 5.9). Dentre os sinais característicos de E' em relação a E'' temos os multipletos por volta de 8,8, 8,5, 8,1 e 7,9 ppm, e um grupos de sinais entre 7,5 e 7,0 ppm, além de algumas divergências na intensidade de sinais em comum. Em menor proporção de intensidade estão os sinais característicos de I' em relação a I'', se destacando, principalmente, dois sinais por volta de 3,3 e 1,3 ppm, além de vários sinais de intensidade pouco significativa e que parecem ser diferenças de intensidade de sinais encontrados nos dois grupos. Um padrão mais evidente de ocorrência de sinais se dá dentre os característicos de E'' e I''. Nestes é possível observar uma série de sinais em comum, como os multipletos encontrados em torno de 7,7 e 7,6 ppm, os multipletos entre 4,2 e 4,0 ppm, os sinais próximos a 3,6 e 3,4 ppm,

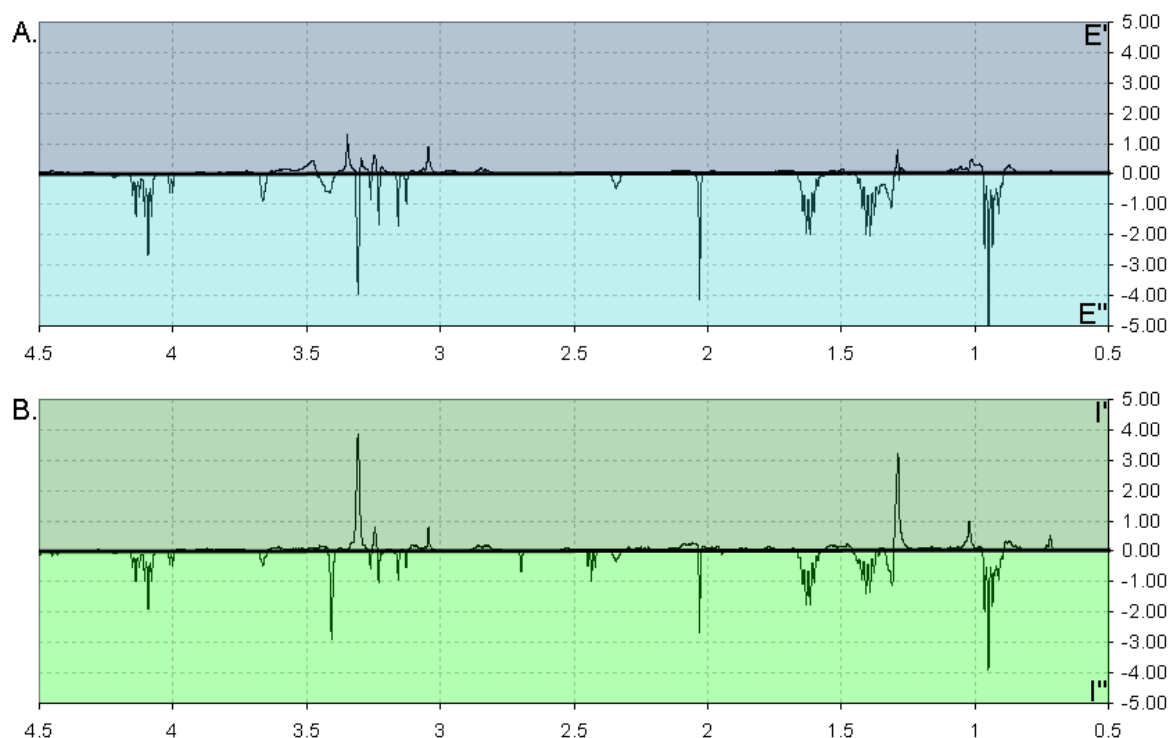


Figura 5.13. Diferenças intraespecíficas dos perfis metabólicos das espécies de *Mycale* Gray, 1867, para os espectros de RMN  $^1\text{H}$  na faixa de 4,5 a 0,5 ppm. Diferenças entre os espectros médios subtraídos entre os grupos E' e E'' (A), I' e I'' (B). Grupos definidos com base na sua similaridade por presença e ausência nos picos encontrados por RMN  $^1\text{H}$  por meio de Inferência bayesiana. Os picos característicos de cada grupo se encontram acima ou abaixo da linha do zero, destacado por cores: azul escuro (E'), azul claro (E''), verde escuro (I') e verde claro (I''). Ver texto para mais detalhes.

quatro sinais entre 3,3 e 3,1, os picos por volta de 2,3 e 2,0 ppm, os multipletos em torno de 1,6 e 1,4 ppm, o sinal em 1,3 ppm e o mutltipleto por volta de 0,9 ppm. Individualmente, o grupo I'' apresenta alguns sinais adicionais não encontrados no E'', muitos deles, sendo característicos em I' nas comparações interespecíficas, como o sinal em 9,2 ppm, que também é característico de I', mas menos intenso neste, muito embora o sinal em 9,3 seja mais intenso em I' do que em I''. Uma outra divergência entre os sinais de E'' e I'' está na ocorrência do sinal em 3,3 ppm, o qual é característico em E'', mas não em I'', o qual, todavia, é encontrado em I'.

## 5.4 Discussão

### 5.4.1 Aplicação do método

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta largamente aplicada em diversas áreas como descoberta de drogas, pesquisa farmacêutica, toxicologia, detecção de doenças, pesquisas nutricionais e alimentícias, e outras (ver referências em SAITO e MATSUDA, 2010). O crescimento da área da Metabolômica nas últimas décadas fez crescer cada vez mais o conhecimento a cerca do metabolismo de diversos organismos. Contudo, a maior parte destas pesquisas ainda se concentra em grupos como mamíferos, plantas e bactérias, para os quais análises metabólicas têm permitido descobrir compostos e vias metabólicas que antes demandariam um grande esforço. Para tais organismos, a literatura é abundante e fornece uma base de dados abrangente e diversa. Contudo, para muitos organismos, este tipo de informação ainda é precário, como no caso das esponjas, e a aplicação de tal ferramenta permitir um grande avanço no conhecimento do metabolismo destes organismos.

Até agora, a RMN ainda não havia sido utilizada para a comparação metabólica de espécies de esponjas. O protocolo utilizado neste trabalho se mostrou viável para tal análise, permitindo gerar perfis metabólicos de qualidade a serem analisados quantitativamente. Por meio de uma quantidade ínfima de amostra (menos do que 0,5 g, em média), foi possível uma extração de metabólitos sensível à detecção por RMN. Embora se deva levar em conta que amostras cujo peso seco seja muito baixo (menor do que 0,3 g) tendem a resultar em baixo rendimento, sendo preferível o uso de amostras maiores quando disponível. A identificação de compostos a partir do espectro de extratos brutos, por demandar um grande esforço e ser demorada, não foi aplicada à estes dados. A utilização de outras técnicas como HPLC e MS, além da aplicação de espectroscopia de correlação bi-dimensionais, permitiria uma análise mais robusta das amostras, as quais virão a ser utilizadas em trabalhos futuros.

Outra consideração metodológica diz respeito à coleta e processamento das amostras. No caso, as esponjas foram trazidas vivas e congeladas em refrigerados à -20 °C. Todavia é sabido de longa data que alterações drásticas no ambiente ou a lesões e danos sofridos pelas esponjas agem como sinais para seu sistema bioquímico, resultando em diversos mecanismos de defesa. Estes consistem desde sinalização de reações de oxidação e hidrólise até produção de novas substâncias (MÜLLER e MÜLLER, 2003). Desta forma, os procedimentos de coleta e processamento das amostras utilizadas aqui apresentam a potencial capacidade de desencadear tais mecanismos, e sendo assim, alterar o perfil metabólico das esponjas, o qual

passaria a representar um novo estado fisiológico distinto do "normal", *i.e.*, não-alterado por manipulação (ver abaixo). Sendo assim, uma adequação deste protocolo se faz necessário a fim de contornar tal problemática, e são propostas duas metodologias que poderiam solucionar tal questão. A primeira consiste na fixação destas esponjas desde a coleta em campo em tampão estabilizador (como RNAlater<sup>®</sup>), reduzindo o estresse produzido pela coleta e congelamento. Este procedimento seria mais fácil do que o utilizado, uma vez que evita o transporte de esponjas vivas da área de coleta até o laboratório, permitindo a análise de indivíduos de localidades pouco acessíveis. Por outro lado, o tampão poderia alterar quimicamente os compostos das esponjas, uma vez que seu pH e salinidade diferem do meio intracelular desses organismos, e além disso, o sinal do tampão nos espectros de RMN seria predominante nas amostras e poderia mascarar sinais de compostos menos concentrados. Alternativamente ao tampão estabilizante, as amostras poderiam ser congeladas em nitrogênio líquido, mas este procedimento requer maior logística de coleta, além de limitá-las áreas acessíveis e relativamente próximas, uma vez que o transporte aéreo deste material é proibido por lei. Por fim, outra alternativa poderia fazer uso de técnicas de biologia celular para a dissociação de células e formação de primorfos (CÚSTÓDIO *et al.*, 1998). Esta organização celular obtida em laboratório permitiria a exclusão de muitos simbiossomas (ver abaixo) – o que permitiria, adicionalmente, contrastar os perfis metabólicos das esponjas com e sem, ou das células das esponjas e do simbiossomas recuperados, para determinar a parcela dos compostos produzidos por estes – além de padronizar um estado fisiológico entre as amostras, permitindo a remoção de artefatos produzidos por manipulações afetem as comparações entre as amostras. O ponto negativo desta metodologia é que esta é mais dispendiosa, uma vez que requer uma infraestrutura laboratorial mínima para sua execução, além de limitar as amostragem à áreas próximas do local de pesquisa. Embora esta técnica permita um controle das condições em que as amostras se encontram, permitindo testes entre diferentes meios, estas diferem do meio natural da esponja, e assim, seu perfil metabólico não refletiria o metabolismo que esta teria nas condições ambientais.

#### 5.4.2 Comparação dos perfis metabólicos

A análise de componentes principais dos espectros obtidos por RMN <sup>1</sup>H das amostras de *Mycale* revelou que as três espécies, *M. (Z.) angulosa* (A), *M. (Aeg.) americana* (E) e *M. (C.) microsigmatosa* (I) apresentam uma grande similaridade em sua composição metabólica, na qual cerca de 85 % da variância espectral não corresponde a diferenças interespecíficas.

Todavia, uma parcela menor da variabilidade observada, correspondendo ao componente 2 (ca. 6,5 % da variância) permitiu distinguir claramente às três espécies, revelando que uma parte significativa dos perfis metabólicos das amostras evidencia diferenças metabólicas intrínsecas entre as espécies de *Mycale* analisadas. Os espectros reduzidos entre os grupos A, E' e I' evidenciam estas diferenças (Figuras 5.10 e 5.11). Nestes foi possível observar que as amostras de *M. (Aeg.) americana* se caracterizam por apresentar uma alta intensidade em um grupo de sinais de frequência entre 7,5 e 7,0 ppm em comparação com as amostras demais espécies. Ainda, as amostras de *M. (C.) microsigmatosa* apresentam uma alta intensidade em quatro grupos de sinais, em comparação com as amostras das duas outras espécies – cujos sinais estiveram ausentes ou em intensidade equivalente – cujas frequências se encontram entre 9,4 e 9,2 ppm, 9,0 e 8,8 ppm, 2,7 e 2,6 ppm e entre 2,5 e 2,4 ppm. A única amostra a não apresentar sinais de frequência característicos foi *M. (Z.) angulosa*, cujas amostras apresentam uma menor intensidade em muitos dos sinais encontrados entre 8,8 e 8,3 ppm, entre 6,5 e 5,5 ppm, entre 3,5 e 3,0 ppm e entre 2,3 e 0,5 ppm do que as amostras das espécies *M. (Aeg.) americana* e *M. (C.) microsigmatosa*. Contudo, a identificação dos compostos correspondentes aos sinais característicos destas espécies aprimoraria a comparação dos perfis metabólicos entre elas, e, além de permitir determinar que tipos de metabolismo estas estivessem desenvolvendo, possibilitaria identificar novidades e metabólitos em comum.

Um nível de variação menor foi detectado pelo componente 3 (ca. de 4,5 % da variância), no qual um fator outro que não o específico determinou uma parcela da variabilidade observada entre as amostras. Este componente reflete uma variabilidade intraespecífica, dividindo as amostras de *M. (Aeg.) americana* e *M. (C.) microsigmatosa* em dois grupos distintos, uma vez que não há divergência genética entre as amostras destas espécies que permita sugerir diferenças intrínsecas entre estas. Na análise bayesiana dos sinais observados, as amostras dos grupos E'' e I'' apresentaram maior correspondência de sinais do que com os grupos E' e I', que por sua vez foram recuperados em grupos separados, indicando um certo grau de similaridade entre as amostras dos grupos E'' e I'' (E9, E11 e I16), evidenciando que estes dois grupos apresentam uma série de compostos em comum. Estes resultados sugerem que os dois grupos distintos encontrados dentre as amostras das duas espécies refletem estados fisiológicos distintos entre estes, onde os grupos E' e I' correspondem a um metabolismo diferente (metabolismo 1) do encontrado nos grupos E'' e I'' (metabolismo 2). Estas diferenças podem ser observadas nos espectros reduzidos entre os grupos de cada espécie (Figuras 5.12 e 5.13), os quais evidenciam uma grande equivalência



dos sinais encontrados entre grupos que apresentam o metabolismo 2 (E" e I"). Contudo, a determinação do estado fisiológico correspondente ao metabolismo 2 somente seria possível com a identificação dos compostos correspondentes aos sinais de frequência em comum encontrados nos perfis metabólicos destes grupos – como por exemplo os multipletos encontrados em torno de 7,7 e 7,6 ppm, os multipletos entre 4,2 e 4,0 ppm, os sinais próximos a 3,6 e 3,4 ppm, os quatro sinais entre 3,3 e 3,1, os sinais por volta de 2,3 e 2,0 ppm, os multipletos em torno de 1,6 e 1,4 ppm, o sinal em 1,3 ppm e o multipletos por volta de 0,9 ppm. Por outro lado, a identificação do metabolismo 1 é mais problemática uma vez que praticamente não há sinais de frequência em comum entre os grupos E' e I', impedindo assim identificar compostos que poderiam evidenciar o estado fisiológico em que estas amostras se encontram.

Um outro nível de variabilidade foi determinado pelo componente 4 da análise de componentes principais, responsável por cerca de 2,5 % da variância dos dados. Este componente, além de resultar em uma separação equivalente à do componente 3 (ver acima), distingue a amostra A12 das demais de *M. (Z.) angulosa*, as quais também são observadas com um alto grau de divergência, refletindo uma variabilidade intraespecífica relativamente alta nesta espécie. Tal variabilidade é evidenciada tanto pela distância entre as amostras quanto pelos sinais encontrados, e reflete a presença diferencial de metabólitos nestas amostras. Ao contrário do encontrado entre as amostras de *M. (Aeg.) americana* e *M. (C.) microsigmatosa*, onde dois estados fisiológicos distintos são observados (ver acima), nas amostras de *M. (Z.) angulosa* não foi possível determinar se estas amostras correspondem a uma distinção metabólica clara uma vez que somente uma amostra apresentou maior grau de divergência das demais. Esta questão só poderá ser averiguada após a identificação dos compostos correspondentes aos sinais de frequência distintivos entre as amostras de *M. (Z.) angulosa*, caso estes correspondam a compostos específicos de vias metabólicas conhecidas.

Por fim, a correlação entre as diferenças nos perfis metabólicos e a relação filogenética das espécies se mostrou ambígua. A análise de similaridade entre os espectros de RMN resultou em uma relação contrária à encontrada na reconstrução filogenética. Enquanto que o filograma das relações evolutivas entre as três espécies mostra que *M. (Z.) angulosa* e *M. (C.) microsigmatosa* são mais próximas entre si do que *M. (Aeg.) americana* [i.e., E (A + D)], o dendrograma de similaridade entre os espectros obtidos por RMN evidencia que o perfil metabólico de *M. (Z.) angulosa* é mais semelhante ao de *M. (Aeg.) americana* do que de *M. (C.) microsigmatosa* [i.e., I (A + E)]. Por outro lado, a análise bayesiana dos sinais de

frequência apresenta um resultado similar ao obtido pela análise filogenética. A análise qualitativa dos sinais revela que as amostras E6, E10 e E13 (grupo E') são mais divergentes do que o restante das amostras, e recupera um grupo maior que une os grupos A, I', E'' e I''. Como discutido acima, os grupos E'' e I'' correspondem à metabolismos distintos do encontrado nas outras amostras de *Mycale*. Quando as análises foram refeitas com a exclusão destas amostras (dados não mostrados) – a fim de preservar somente àquelas recuperadas em um mesmo grupo pelo componente 3 da PCA, que supostamente condizem a um mesmo estado fisiológico – a topologia se mostrou a mesma, com *M. (Aeg.) americana* mais distante de *M. (Z.) angulosa* e *M. (C.) microsigmatosa* [i.e., E (A + I)]. Estes resultados sugerem que a análise qualitativa dos sinais de frequência é uma metodologia mais adequada para comparar perfis metabólicos do que análises quantitativas quando se considera a importância das relações evolutivas. Isto se deve provavelmente ao fato de que a presença de sinais implica na ocorrência de uma molécula específica correspondente, o que reflete a existência de genes que codificam para vias metabólicas. Desta forma, espécies próximas, por apresentarem maior probabilidade de compartilharem tais genes, e, por conseguinte, tais vias, poderiam ser identificados pela presença de compostos em comum. Por sua vez, variações na concentração destes compostos poderiam advir de fatores outros que não genéticos, implicando em uma ausência de correlação direta com as relações evolutivas entre estas espécies.

## CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados deste trabalho foi possível concluir que:

- 1) Os marcadores 16S, 28S e *cox1* resultaram em topologias que, em geral, apresentaram baixo suporte ou mesmo politomias nas relações mais profundas na reconstrução das relações filogenéticas de *Mycalina*. Por sua vez, as inferências utilizando os dados combinados de 16S e 28S se mostraram robustas, mesmo com certas espécies apresentando taxas evolutivas distintas para um ou outro marcador separadamente.
- 2) As inferências filogenéticas objetivando as relações evolutivas de *Mycale* realizadas utilizando o marcador 16S apresentaram resultados com maior suporte e resolução do que com 28S e *cox1*, os quais apresentaram poucas posições informativas e alta taxa de evolução, respectivamente.
- 3) Os dados moleculares sugerem a existência de três espécies crípticas em *Mycale*:
  - a. *M. (C.) magnirhaphidifera* – uma compreendendo amostras do Panamá e Brasil, com sigmas ausentes, e a outra amostras também do Panamá e Belize, com sigmas abundantes;
  - b. *M. (Aeg.) magellanica* – na qual das duas amostras analisadas uma agrupa com *M. (Aeg.) escalatei* e outra com espécies de *Arenochalina*;
  - c. *M. (Are.) laxissima* – uma compreende amostras do Panamá, e a outra do Brasil.
- 4) Juntamente com resultados de outros pesquisadores, *Mycalina* não foi recuperado como grupo monofilético, e *Desmacella* e *Merlia* parecem ser os grupos mais basais de Poecilosclerida. Cinco grupos puderam ser reconhecidos em *Mycalina*, cujas relações seriam:
  - a. (*Hamacantha*, (*Merlia*, (*Esperiopsis*, *Phlyctaenopora*), (*Desmacella*, (*Tetrapocillon*, *Dragmatella*)))));

- b. (*Isodyctia*, *Podospongia*, *Amphilectus*, *Ulosa*);
  - c. (*Diacarnus*, (*Negombata*, *Neopodospongia*), (*Sigmoceptrella*, *Guitarra*));
  - d. (*Mycale*, Cladorhizidae);
  - e. E (*Biemna*, *Neofibularia*, *Sigmaxinella*) externo à Poecilosclerida, possivelmente relacionado à Tetractinellida.
- 5) Com exceção das espécies *M. (Anomomycale) titubans*, *M. fibrexilis* e *M. (Aegogropila) phillipensis*, o gênero *Mycale* se mostrou um grupo monofilético. Os sub-gêneros *Zygomycale*, *Arenochalina*, e *Naviculina* foram recuperados como monofiléticos. Por sua vez, *Carmia*, *Aegogropila* e *Mycale* se mostraram polifiléticos. Os sub-gêneros *Oxymycale* e *Paresperella* foram analisados monotipicamente.
- 6) Os clados recuperados em *Mycale* foram:
- a. *Carmia* I (monofilético), compreendendo as espécies *M. microsigmatosa*, *M. fistulifera*, *M. phyllophila* e *M. cecilia*;
  - b. *Zygomycale* (monofilético), compreendendo as espécies *M. angulosa* e *M. parishii*;
  - c. *Aegogropila* I (parafilético), compreendendo as espécies *M. crassissima*, *M. contarenii*, *M. escarlatei*, *M. liliana*, uma das espécies crípticas de *M. magellanica*, *M. sullevoidea* e *M. syrinx*.
  - d. *Aegogropila* II (monofilético), compreendendo as espécies *M. furcata* e *M. rotalis*.
  - e. *Carmia* II (parafilético), compreendendo duas espécies crípticas de *M. magnirhaphidifera*;
  - f. *Aegogropila* III (monofilético), compreendendo as espécies *M. americana*, *M. carmigropila* e *M. citrina*;
  - g. *Arenochalina* (monofilético), compreendendo *M. mirabilis*, as duas espécies crípticas de *M. laxissima*, e uma das espécies crípticas de *M. magellanica*.
  - h. *Mycale* I (monofilético), compreendendo as espécies do grupo-*immitis* *M. arenaria* e *M. alagoana*;
  - i. *Paresperella* (monotípico), compreendendo amostras não identificadas até o nível de espécie;
  - j. *Mycale* II (monotípico), compreendendo somente *M. lingua*;
  - k. *Mycale* III (parafilético), compreendendo as espécies *M. grandis*, *M. laevis* e *M. thielei*;

- l. *Oxymycale* (monotípico), compreendendo somente *M. acerata*; e
- m. *Navicula* (monofilético), compreendendo as espécies *M. arcuiris*, *M. flagellifera* e amostras não identificadas até o nível de espécie.
- 7) Quatro formas básicas típicas de A, B, C e D (= "curvoquela") foram recuperadas por meio da análise dos parâmetros morfométricos extraídos das medidas lineares e angulares das anisoquelas tipo I de *Mycale*;
- 8) As correlações entre as dimensões espiculares em *Mycale* revelaram que muitas apresentam uma relação significativa entre si, sendo que a maior parte dos ramos correspondentes às relações entre as espécies parece seguir a mesma tendência da relação entre os parâmetros. Por outro lado, dimensões de espículas divergentes ao modelo esperado apresentado por algumas espécies poderiam ser explicadas por fatores particulares na linhagem evolutivas destas espécies;
- 9) De forma geral, a maior parte das características morfológicas analisadas apresentaram um alto grau de homoplasia, embora algumas revelaram ser sinapomorfias de certos clados reconhecidos;
- 10) A hipótese de evolução das espículas micracantóxeas e micróxeas mais provável implica no surgimento independente destas em várias linhagens;
- 11) Até que se faça uma revisão da evolução das espículas ráfides e toxas, uma hipótese para a evolução destas em *Mycale* deveria considerar que as séries de transformação ráfide > toxa, ráfide > rafidotoxa, ráfide > micróxea, toxa > micróxea, rafidotóxea > micróxea e toxa > micracantóxea poderiam ter ocorrido em diferentes linhagens;
- 12) Por meio da reconstrução de características morfológicas, a morfologia ancestral de *Mycale* poderia ser definida pelas seguintes características: forma de crescimento geralmente incrustante; canais subectossomais não-visíveis; ausência de exudação de muco; esqueleto coanossomal plumoreticulado; tratos esqueléticos geralmente multiespiculares; subtilóstilos (= mycalóstilos) em somente uma categoria; anisoquelas em três categorias com forma A típica formando rosetas; ausência de ráfides, isoquelas, toxas, micróxeas e micracantóxeas. A partir desta, com o objetivo de estabelecer novos paradigmas para a sistemática de *Mycale* os clados considerados neste trabalho são definidos morfológicamente como:
- a. *Carmia* I (= "*Tenuicarmia*") – *Mycale* com canais ectossomais visíveis, esqueleto ectossomal não especializado, sigmas em somente uma categoria,

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

paucispiculares, podendo ou não apresentar toxas em uma categoria, sigmas em duas categorias, anisoquelas em pelo menos duas categorias, as anisoquelas-I tipicamente com forma A podendo ou não formar rosetas, anisoquelas-II do tipo naviculiquela;

- h. *Oxymycale* – *Mycale* com esqueleto ectossomal reticulado, subtilóstilos ausentes, substituídos por óxeas, ráfides presentes, sigmas ausentes, anisoquelas em duas categorias, anisoquelas-I tipicamente com forma C, anisoquelas-II e III com forma A;
- i. *Paresperella* – *Mycale* com canais ectossomais visíveis, esqueleto ectossomal reticulado, toxas em pelo menos uma categoria, sigmas com bordas serreadas, podendo apresentar micróxeas, anisoquelas em até três categorias e geralmente com forma A;
- j. *Mycale* I – *Mycale* com esqueleto ectossomal confuso, ráfides presentes, subtilóstilos em duas categorias, sigmas em pelo menos uma categoria, anisoquelas em três categorias, anisoquelas-I do tipo "curvoquela" (forma D) e formando rosetas, anisoquelas-II e II com forma A;
- k. *Mycale* II – similar à *Mycale* I, mas subtilóstilos em somente uma categoria, sigmas em somente uma categoria, anisoquelas em somente duas categorias, anisoquelas-I tipicamente com forma C;
- l. *Mycale* III – tentativamente dividido em três subgrupos, onde:
  - m. *Mycale* III.A – similar à *Mycale* I, mas subtilóstilos em somente uma categoria, sigmas em duas categorias,
  - n. *Mycale* III.B – similar à *Mycale* I, mas subtilóstilos em somente uma categoria, sigmas em duas categorias, anisoquelas em somente duas categorias, anisoquelas-I tipicamente com forma C;
  - o. *Mycale* III.C – similar à *Mycale* I, mas subtilóstilos em somente uma categoria, ráfides ausentes, sigmas em somente uma categoria, anisoquelas-II do tipo curvoquela (forma D).

13) A variabilidade genética do complexo *M. (C.) microsigmata* estimada por 16S, resultou em uma alta diversidade haplotípica ( $H = 0,792$ ), tendo sido encontrados seis haplótipos (A - F), e uma baixa diversidade nucleotídica ( $\pi = 0,0021$ ). Contudo, a comparação da variabilidade deste marcador com a encontrada em outras espécies

sugere uma alta conservatividade do gene 16S, implicando em uma subestimativa da variabilidade genética de *M. (C.) microsigmatosa*;

- 14) Duas hipóteses são levantadas a fim de explicar a variabilidade genética encontrada no complexo:
  - a. Na primeira, uma alta taxa de evolução do gene 16S permitiria o surgimento de vários haplótipos nesta linhagem;
  - b. E na segunda, mais provável, mas a ser confirmada por outros marcadores mais variáveis, os diferentes haplótipos correspondem a linhagens próximas, mas evolutivamente distintas, ou em vias de separação.
- 15) A variabilidade morfológica do complexo *M. (C.) microsigmatosa* parece estar mais associada a fatores genéticos do que geográficos, sugerindo que esta seria um resultado de diferenças intrínsecas entre linhagens evolutivas e não de uma diversificação entre populações sob a influência de fatores ambientais diferentes;
- 16) A ausência de mecanismos dispersivos que promovam uma conectividade de um fluxo gênico entre as áreas estudadas e as evidências de invasões de outras espécies de *Mycale* e de organismos bentônicos associados ao coral *Carijoa* sugerem que a distribuição disjunta das linhagens (= haplótipos) encontradas no complexo *M. (C.) microsigmatosa* poderia ser decorrente da introdução de espécies exóticas por ação antrópica;
- 17) Os indivíduos do complexo *M. (C.) microsigmatosa* com ausência completa de anisoquelas e sigmas parecem corresponder a uma nova espécie, e sendo assim, a possibilidade de perda total de microscleras em *Mycale* deve ser reavaliada pelos autores, e considerada como uma potencialidade no processo evolutivo destas espécies, ao invés de creditar a estas espículas *conditio sine qua non* para a existência do grupo;
- 18) As relações de área obtidas a partir das duas hipóteses filogenéticas assumidas por meio da análise de três itens (3ia) se mostraram pouco críveis como representantes da história biogeográfica de *Mycale*, sendo necessário aprimorar tais hipóteses por meio de maior resolução filogenética e amostragem. De toda forma, ambas remontam a um cenário de diversificação a partir de áreas mais remotas ao sul, e uma afinidade entre a fauna tropical do Atlântico e do Pacífico provavelmente, devido a união destas áreas antes do soerguimento do Istmo do Panamá. As relações encontradas foram:
  - a. Na hipótese conservadora, (SO, (TNA, (TA, EIP), (CIP, TSA)));



- b. E na hipótese abrangente, (SO, (TSA, (TA, (EIP, WIP))), (TNP, (TNA, CIP))).
- 19) Os padrões de distribuição de espécies se mostraram pouco robustos, com somente três relações entre pares de áreas com altos valores de similaridade e suporte – CIP+TAA, TA+TSA e A+TNP – refletindo diretamente o esforço amostral nestas áreas ao longo dos anos. Além disso, a delimitação de áreas de endemismo deveria ser aprimorada, a fim de considerar localidades físicas independentes de fronteiras políticas;
- 20) As relações de área encontradas com base na distribuição de *Mycale* na análise de similaridade divergiram do padrão global de distribuição de esponjas proposto recentemente, as quais, pela análise de similaridade, seriam: (((TEP, EIP), (TA, TSA)), (TNA, (TNP, A))), ((TSAF, SO), (WIP, (CIP, TAA))));
- 21) O protocolo de extração de metabólitos empregado se mostrou viável para análise dos perfis metabólicos de *Mycale* por meio de RMN <sup>1</sup>H. Contudo, algumas questões levantadas após a análise dos dados sugerem que adequações deste devem ser feitas a fim de contornar certos problemas;
- 22) Os perfis metabólicos das amostras de *Mycale* obtidos por RMN <sup>1</sup>H apresentam uma grande similaridade, mas as três espécies analisadas, *M. (Z.) angulosa* (A), *M. (C.) microsigmatosa* (I), e *M. (Aeg.) americana* (E), puderam claramente ser distinguidas por uma parcela menor da variabilidade observada. Além disso, a análise dos espectros também permitiu detectar uma variabilidade intraespecífica nos perfis metabólicos, a qual acredita-se refletir estados fisiológicos distintos;
- 23) E por fim, a correlação entre as diferenças nos perfis metabólicos e a relação filogenética das espécies se mostrou ambígua, sendo que a análise qualitativa dos sinais de frequência, por ter obtido um resultado similar ao obtido pela análise filogenética, seria uma metodologia mais adequada para comparar perfis metabólicos do que análises quantitativas quando se considera a importância das relações evolutivas.

## REFERÊNCIAS

- Aizenberg J, Ilan M, Weiner S, Addadi L. 1996. Intracrystalline macromolecules are involved in the morphogenesis of calcitic sponge spicules. *Connective Tissue Research* 34: 255–261.
- Alvarez B, Crisp MD, Driver F, Hooper JNA, Van Soest RWM. 2000. Phylogenetic relationships of the family Axinellidae (Porifera: Demospongiae) using morphological and molecular data. *Zoologica Scripta* 29:169-198.
- Alvarez B, Krishnan M, Gibb K, 2007. Analysis of intragenomic variation of the rDNA internal transcribed spacers (ITS) in Halichondrida (Porifera: Demospongiae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87:1599-1605.
- Antonov AS, Afiyatullof SSh, Kalinovskiy AI, Ponomarenko LP, Dmitrenok PS, Aminin DL, Agafonova IG, Stonik VA. 2003. Mycalosides B-I, eight new spermostatic steroid oligoglycosides from the sponge *Mycale laxissima*. *Journal of Natural Products* 66:1082-1088.
- Arndt W. 1927. Kalk- und Kieselschwämme von Curaçao. *Bijdragen tot de Dierkunde* 25:133-158, pls I-III.
- Bell JJ, Barnes DKA, Turner JR. 2002. The importance of micro and macro morphological variation in the adaptation of a sublittoral demosponge to current extremes. *Marine Biology* 140:74-81.
- Bergquist PR, Fromont PJ. 1988. The Marine Fauna of New Zealand: Porifera, Demospongiae, Part 4 (Poecilosclerida). *New Zealand Oceanographic Institute Memoir* 96:1-197.
- Bergquist PR. 1965. The Sponges of Micronesia, Part I. The Palau Archipelago. *Pacific Science* 19:123-204.
- Bergsten J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21:163–193.

- Blanquer A, Uriz M-J. 2007. Cryptic speciation in marine sponges evidenced by mitochondrial and nuclear genes: A phylogenetic approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45:392-397.
- Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR. 2012. Marine natural products. *Natural Product Reports* 29:144-222.
- Bookstein FL. 1994. Can biometrical shape be a homologous character? In: Hall BK, editor. *Homology: the hierarchical basis of comparative biology*. Academic Press. p 197-227.
- Borchiellini C, Chombard C, Lafay B, Boury-Esnault N. 2000. Molecular systematics of sponges (Porifera). *Hydrobiologia* 420:15-27.
- Borchiellini C, Chombard C, Manuel M, Alivon E, Vacelet J, Boury-Esnault N. 2004. Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:823-837.
- Borchiellini C, Manuel M, Alivon E, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y. 2001. Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *Journal of Evolutionary Biology* 14:171-179.
- Boury-Esnault N, Rützler K. 1997. *Thesaurus of sponge morphology* (Smithsonian Contributions to Zoology, No. 596). Smithsonian Institution Press. 55 p.
- Boury-Esnault N. 2006. Systematics and evolution of Demospongiae. *Canadian Journal of Zoology* 84:205-224.
- Brain CK, Prave AR, Hoffmann KH, Fallick AE, Botha A, Herd DA, Surrock C, Young I, Condon DJ, Allison SG. 2012. The first animals: ca. 760-million-year-old sponge-like fossils from Namibia. *South African Journal of Science* 108, Art. #658, 8 p.
- Bringmann G, Lang G. 2003. Full absolute stereostructures of natural products directly from crude extracts: the HPLC-MS/MS-NMR-CD 'triad'. In: Müller WEG, editor. *Sponges (Porifera)*. Marine Molecular Biotechnology. Berlin: Springer. p 89-116.
- Brooks DR. 1985. Historical ecology: a new approach to studying the evolution of ecological associations. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72:660-680.
- Brower AVZ, DeSalle R, Vogler A. 1996. Gene Trees, Species Trees, and Systematics: A Cladistic Perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:423-450.
- Burton M. 1934. Sponges. In: *Further Zoological Results of the Swedish Antarctic Expedition 1901-03 under the Direction of Dr. Otto Nordenskjöld*. 3 (2). (Norstedt & Söner: Stockholm). pp. 1-58, pls I-VIII.

Calcinai B, Bavestrello G, Bertolino M, Pica D, Wagner D, Cerrano C. in press. Sponges associated with octocorals in the Indo-Pacific, with the description of four new species. *Zootaxa* 000.

Calcinai B, Cerrano C, Totti C, Romagnoli T, Bavestrello G. 2006. Symbiosis of *Mycale* (*Mycale*) *vansoesti* sp. nov. (Porifera, Demospongiae) with a coralline alga from North Sulawesi (Indonesia). *Invertebrate Biology* 125:195-204.

Carballo JL, Hajdu E. 1998. Micromorphology in *Mycale* taxonomy (Mycalidae, Poecilosclerida, Demospongiae), with the description of two new micracanthoxea-bearing species. *Contributions to Zoology* 67:187-195.

Carballo JL, Hajdu E. 2001. *Mycale* (*Aegogropila*) *kolletae* sp.n. from the SE Atlantic, with comments on the species of *Mycale* Gray with raphidotoxas (Mycalidae, Demospongiae, Porifera). *Revista Brasileira de Zoologia* 18:205-217.

Carballo JL. 2006. Effect of natural sedimentation on the structure of tropical rocky sponge assemblages. *Ecoscience* 13:119-130.

Cárdenas P, Pérez T, Boury-Esnault N. 2012. Sponge systematics facing new challenges. *Advances in Marine Biology* 61:79-209.

Cárdenas P, Rapp HT, Schander C, Tender OS. 2010. Molecular taxonomy and phylogeny of the Geodiidae (Porifera, Demospongiae, Astrophorida) - combining phylogenetic and Linnaean classification. *Zoologica Scripta* 39:89-106.

Cárdenas P, Xavier JR, Reveillaud J, Schander C, Rapp HT. 2011. Molecular Phylogeny of the Astrophorida (Porifera, Demospongiae) Reveals an Unexpected High Level of Spicule Homoplasy. *PLoS ONE* 6(4):e18318.

Carlton JT. 1989. Man's role in changing the face of the ocean: biological invasions and implications for conservation of nearshore environments. *Conservation Biology* 3:265-273.

Carlton JT. 1987. Patterns of transoceanic marine biological invasions in the Pacific Ocean. *Bulletin of Marine Science* 41:452-465.

Carroll SB, Grenier J, Weatherbee S. 2004. *From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design*. 2a edição. Wiley-Blackwell. 272 p.

Cedro VR, Hajdu E, Correia MD. 2011. *Mycale alagoana* sp.nov. and two new formal records of Porifera (Demospongiae, Poecilosclerida) from the shallow-water reefs of Alagoas (Brazil). *Biota Neotropica* 11:161-171.

Chombard C, Boury-Esnault N, Tillier S. 1998. Reassessment of homology of morphological characters in tetractenellid sponges based on molecular data. *Systematic Biology* 47:351-366.

Clement M, Posada D, Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1660.

Coles SL, DeFelice RC, Eldredge LG, Carlton JT. 1999. Historical and recent introductions of non-indigenous marine species into Pearl Harbor, Oahu, Hawaiian Islands. *Marine Biology* 135:147-158.

Coles SL, Kandel FLM, Reath PA, Longenecker K, Eldredge LG. 2006. Rapid Assessment of Nonindigenous Marine Species on Coral Reefs in the Main Hawaiian Islands. *Pacific Science* 60:483-507.

Collins AG. 1998. Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of Bilateria: An analysis of 18S rRNA molecular evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:15458-15463.

Concepcion GT, Kahng SE, Crepeaul MW, Franklin EC, Coles SL, Toonen RJ. 2010. Resolving natural ranges and marine invasions in a globally distributed octocoral (genus *Carijoa*). *Marine Ecology Progress Series* 401:113-127.

Coutinho CC, Maia GA. 2007. Mesenchymal cells in ancestral spongiomorph urmetazoa could be the mesodermal precursor before gastrulation origin. In: Custódio, M.R., Lôbo-Hajdu, G., Hajdu, E., Muricy, G. (eds). *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Série Livros 28. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 281-295.

Craw RC, Grehan JR, Heads MJ. 1999. *Panbiogeography: Tracking the History of Life*. Oxford University Press, New York.

Croizat L. 1958. *Panbiogeography or An Introductory Synthesis of Zoogeography, Phytogeography, Geology; with notes on evolution, systematics, ecology, anthropology, etc..* Publicado pelo autor. Caracas. 2755 p.

Custódio MR, Hajdu E, Muricy G. 2002. *In vivo* study of microsclere formation in sponges of the genus *Mycale* (Demospongiae, Poecilosclerida). *Zoomorphology* 121:203-211.

Custódio MR, Provic I, Steffen R, Koziol C, Borojevic R, Brümmer F, Nickel M, Müller WEG. 1998. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mechanisms of Ageing and Development* 105:45-59.

de Laubenfels MW. 1936. A comparison of the shallow-water sponges near the Pacific end of the Panama Canal with those at the Caribbean end. *Proceedings of the United States National Museum* 83:441-466.

de Laubenfels MW. 1936. A Discussion of the Sponge Fauna of the Dry Tortugas in Particular and the West Indies in General, with Material for a Revision of the Families and

Orders of the Porifera. Carnegie Institute of Washington (Tortugas Laboratory Paper N° 467) 30: 1-225, pls 1-22.

de Paula AF, Creed JC. 2005. Spatial distribution and abundance of nonindigenous coral genus *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) around Ilha Grande, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 65:661-673.

de Paula TS, Zilberberg C, Hajdu E, Lôbo-Hajdu G. 2012. Morphology and molecules on opposite sides of the diversity gradient: Four cryptic species of the *Cliona celata* (Porifera, Demospongiae) complex in South America revealed by mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62:529-541.

de Paula TS. 2009. O complexo *Cliona celata* Grant, 1826 (Porifera, Demospongiae) na América do Sul: uma abordagem molecular e morfológica. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 117 p.

Degnan BM, Degnan SM, Giusti A, Morse DE. 1995. A hox/hom homeobox gene in sponges. *Gene* 155:175-177.

Dendy A. 1896. Catalogue of Non-Calcareous Sponges collected by J. Bracebridge Wilson, Esq., M.A., in the neighbourhood of Port Phillip Heads. Part II. *Proceedings of the Royal Society of Victoria (New Series)* 8:14-51.

Dendy A. 1905. Report on the sponges collected by Professor Herdman at Ceylon, in 1902. In: Herdman WA, editor. Report to the Government of Ceylon on the Pearl Oyster Fisheries of the Gulf of Manaar. 3 (Supplement 18). Royal Society, London. p 57-246, pls I-XVI.

Dendy A. 1921. The Tetraxonid Sponge-Spicule: A Study in Evolution. *Acta zoologica* 1921:95-152.

Dendy A. 1922. Report on the Sigmatotetraxonida collected by H.M.S. 'Sealark' in the Indian Ocean. pp. 1-164, pls 1-18. In: Reports of the Percy Sladen Trust Expedition to the Indian Ocean in 1905, Volume 7. *Transactions of the Linnean Society of London* (2), 18(1).

Dohrmann M, Collins A, Wörheide G. 2009. New insights into the phylogeny of glass sponges (Porifera, Hexactinellida): monophyly of Lyssacinosida and Euplectellinae, and the phylogenetic position of Euretidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52:257-262.

Dohrmann M, Janussen D, Reitner J, Collins A, Wörheide G. 2008. Phylogeny and evolution of glass sponges (Porifera: Hexactinellida). *Systematic Biology* 57:388-405.

Dollo L. 1893. Les lois de l'évolution. *Bulletin de la Société Belge de Géologie de Paléontologie & D'hydrologie* 7:164-166.

- Doumenc D, Lévi C. 1987. Anisochelae analysis and taxonomy of the genus *Mycale* Gray (Demospongiae). In: Vacelet J, Boury-Esnault N, editors. Taxonomy of Porifera from the northeast Atlantic and Mediterranean Sea. Springer-Verlag, Berlin. p 73-92.
- Duran S, Pascual M, Estoup A, Turon X. 2002. Polymorphic microsatellite loci in the sponge *Crambe crambe* (Porifera : Poecilosclerida) and their variation in two distant populations. *Molecular Ecology* 2:478-480.
- Duran S, Pascual M, Estoup A, Turon X. 2004b. Strong population structure in the marine sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) as revealed by microsatellite markers. *Molecular Ecology* 13:511-522.
- Duran S, Pascual M, Turon X. 2004a. Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *Marine Biology* 144:31-35.
- Ebach MC, Humphries CJ, Newman RA, Williams DW, Walsh SA. 2005. Assumption 2: opaque to intuition? *Journal of Biogeography* 32:781-787.
- Erpenbeck D, Breeuwer JAJ, Parra-Velandia FJ, van Soest RWM. 2006a. Speculation with spiculation? Three independent gene fragments and biochemical characters versus morphology in demosponge higher classification, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:293-305.
- Erpenbeck D, Breeuwer JAJ, van Soest RWM. 2005. Implications from a 28S rRNA gene fragment for the phylogenetic relationships of halichondrid sponges (Porifera: Demospongiae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 43:93-99.
- Erpenbeck D, Hooper JNA, Wörheide G. 2006b. CO1 phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life' — are we sequencing a suboptimal partition? *Molecular Ecology Notes* 6:550-553.
- Erpenbeck D, List-Armitage SE, Alvarez B, Degnan BM, Hooper JNA, Wörheide G. 2007. The systematics of Raspailiidae (Demospongiae, Poecilosclerida, Microcionina) reanalysed with a ribosomal marker. *Journal of the Marine Biological Society of the United Kingdom* 87:1571-1576.
- Erpenbeck D, Wörheide G. 2007. On the molecular phylogeny of sponges (Porifera). *Zootaxa* 1668:107-126.
- Erwin PM, Thacker RW, 2007. Phylogenetic analyses of marine sponges within the order Verongida: a comparison of morphological and molecular data. *Invertebrate Biology* 126:220-234.
- Felsenstein J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist* 125:1-15.

Fiehn O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48:155–171.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299.

Fromont JP, Bergquist PR. 1990. Structural characters and their use in sponge taxonomy; when is a sigma not a sigma? In: Rützler K, editor. 1985. *New perspectives in sponge biology*. 3rd International Conference on the Biology of Sponges, Smithsonian Institution Press. p 273-278.

Fusetani N, Yasumuro K, Matsunaga S, Hashimoto K. 1989. Mycalolides A - C, hybrid macrolides of ulapualides and halichondramide, from a sponge of the genus *Mycale*. *Tetrahedron Letters* 30:2809-2812.

Gazave E, Carteron S, Chenuil A, Richelle-Maurer E, Boury-Esnault N, Borchellini C. 2010. Polyphyly of the genus *Axinella* and of the family Axinellidae (Porifera: Demospongiae) *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57:35-47.

Gray JE. 1867. Notes on the arrangement of sponges with the description of some new genera. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1867(2):492-558, pls XXVII-XXVIII.

Hajdu E, Boury-Esnault N. 1991. Marine Porifera of Cabo Frio (Rio de Janeiro- Brazil). The family Mycalidae Lundbeck, 1905, with the description of a new species. *Revista Brasileira de Biologia* 51:503-513.

Hajdu E, Desqueyroux-Faúndez R. 1994. A synopsis of South American *Mycale* (*Mycale*) (Poecilosclerida, Demospongiae), with the description of three new species and a preliminary cladistic analysis of Mycalidae. *Revue Suisse de Zoologie* 1:563-600.

Hajdu E, Peixinho S, Fernandez JCC. 2011. *Esponjas Marinhas da Bahia. Guia de Campo e Laboratório*. 1a. Ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional v. 1. 276 p.

Hajdu E, Rützler K. 1998. Sponges, genus *Mycale* (Poecilosclerida: Demospongiae: Porifera), from a Caribbean mangrove and comments on subgeneric classification. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 111:737-773.

Hajdu E, Teixeira JN. 2011. New or little known demosponges (Porifera) from Espírito Santo coast and seamounts (Brazil). *Zoologia* 28:233-248.

Hajdu E, van Soest RWM, Hooper JNA. 1994. Proposal for a phylogenetic subordinal classification of poecilosclerid sponges. In: van Soest RWM, van Kempen ThMG, Braekman J-C, editors. *Sponges in Time and Space - Proceedings of the 4th International Porifera Congress*. Rotterdam: Balkema. p 123-139.



- Hajdu E, van Soest RWM. 1996. Choosing among Poriteran morphological characters within the cladistic paradigm. *Bulletin de l'Institut Royal des Sciences naturelles de Belgique* 66:81-88.
- Hajdu E, Zea S, Kielman M, Peixinho S. 1995. *Mycale escarlatei* n.sp. and *Mycale unguifera* n.sp. (Demospongiae) from the tropical-western Atlantic. *Beaufortia* 45:1-16.
- Hajdu E. 1995. Macroevolutionary patterns within the demosponge Order Poecilosclerida. Phylogeny of the marine cosmopolitan genus *Mycale*, and an integrated approach to biogeography of the seas. Amsterdam, Univ. Amsterdam. 173 p.
- Hajdu E. 1999. Toward a phylogenetic classification of Mycalids with anisochelae (Demospongiae: Poecilosclerida), and comments on the status of *Naviculina* Gray, 1867. *Memoirs of the Queensland Museum* 44:225-238.
- Hallmann EF. 1914. A revision of the monaxonid species described as new in Lendenfeld's 'Catalogue of the Sponges in the Australian Museum'. Part I, II, III. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 39: 263-315, 327-376, 398-446, pls XV-XXIV.
- Harvey PH, Pagel MD. 1991. *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford University Press, Oxford. 239 p.
- Hechtel GJ. 1965. A Systematic Study of the Demospongiae of Port Royal, Jamaica. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History* 20:1-103.
- Heim I, Nickel M, Brümmer F. 2007. Molecular markers for species discrimination in poriferans: a case study on species of the genus *Aplysina*. In: Custódio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G, editors. *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Série Livros 28. Museu Nacional, Rio de Janeiro. p 361-371.
- Hennig W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. Univ. Illinois Press, Urbana. 263 p.
- Hentschel E. 1911. Tetraxonida. 2. Teil. In: Michaelsen W, Hartmeyer R, editors. *Die Fauna Südwest-Australiens. Ergebnisse der Hamburger südwest-australischen Forschungsreise 1905*. Volume 3 (10). Fischer, Jena. p 279-393.
- Hentschel E. 1912. Kiesel- und Hornschwämme der Aru und Kei-Inseln. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* 34:293-448.
- Hill MS, Hill AL. 2002. Morphological plasticity in the tropical sponge *Anthosigmella varians*: Responses to predators and wave energy. *Biological Bulletin* 202:86-95.
- Hood GM. 2010. PopTools version 3.2.5. Available on the internet at <http://www.poptools.org>

Hooper JNA, van Soest RWM, editors. 2002. *Systema Porifera: a guide to the classification of Sponges*. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. 1-1101, 1103-1706 (2 volumes) p.

Hoshino S, Fujita T. 2006. Isolation of polymorphic microsatellite markers from *Hymeniacidon sinapium* (Porifera : Demospongiae : Halichondrida). *Molecular Ecology Notes* 6:829-831.

Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132:583-589.

Huxley T. 1875. On the Classification of the Animal Kingdom. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 15:52-56.

Ivanišević J, Thomas OP, Lejeune C, Chevaldonné P, Pérez T. 2011. Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: towards understanding inter-specific relationships among Homoscleromorpha sponges. *Metabolomics* 7:289–304.

Kaandorp JA. 1999. Morphological analysis of growth forms of branching marine sessile organisms along environmental gradients. *Marine Biology* 134:295-306.

Kato Y, Fusetani N, Matsunaga S, Hashimoto K. 1985. Bioactive marine metabolites IX. Mycalisines A and B, novel nucleosides which inhibit cell division of fertilized starfish eggs, from the marine sponge *Mycale* sp. *Tetrahedron Letters* 26:3483-3486.

Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33:511-518.

Knowlton N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:189-216.

Kober KM, Nichols SA. 2007. On the phylogenetic relationships of hadromerid and poecilosclerid sponges. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87:1585-1598.

Kolaczkowski B, Thornton JW. 2009. Long-Branch Attraction Bias and Inconsistency in Bayesian Phylogenetics. *PLoS ONE* 4(12):e7891.

Kowalke J. 2000. Ecology and energetics of two Antarctic sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 247:85–97.

Lackey JB. 1959. Morphology and biology of a species of Proterospongia. *Transactions of the American Microscopical Society* 78:202-206.

Lavrov DV, Forget L, Kelly M, Lang BF. 2005. Mitochondrial genomes of two demosponges provide insights into an early stage of animal evolution. *Molecular Biology and Evolution* 22:1231-1239.

Lavrov DV, Pett W, Voigt O, Wörheide G, Forget L, Lang F, Kayal E. (in press). Mitochondrial DNA of *Clathrina clathrus* (Calcarea, Calcinea): six linear chromosomes, fragmented rRNAs, tRNA editing, and a novel genetic code. *Molecular Biology and Evolution* 000.

Lavrov DV, Wang X, Kelly M. 2008. Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:111-124.

Leal MC, Madeira C, Brandão CA, Puga J, Calado R. 2012a. Bioprospecting of Marine Invertebrates for New Natural Products – A Chemical and Zoogeographical Perspective. *Molecules* 17:9842-9854.

Leal MC, Puga J, Serôdio J, Gomes NCM, Calado R. 2012b. Trends in the Discovery of New Marine Natural Products from Invertebrates over the Last Two Decades – Where and What Are We Bioprospecting? *PLoS ONE* 7(1):e30580. doi

Lee OO, Yang LH, Li X, Pawlik JR, Qian P-Y. 2007. Surface bacterial community, fatty acid profile, and antifouling activity of two congeneric sponges from Hong Kong and the Bahamas. *Marine Ecology Progress Series* 339:25-40.

Lévi C. 1952. Spongiaires de la côte du Sénégal. *Bulletin de l'Institut français d'Afrique noire A. Sciences naturelles* 14:34-59.

Leys SP. 2007. Sponge coordination, tissues, and the evolution of gastrulation. In: Custódio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G, editors. *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Série Livros 28. Museu Nacional, Rio de Janeiro. p 53-59.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.

Loh T-L, López-Legentil S, Song B, Pawlik JR. 2012. Phenotypic variability in the Caribbean Orange Icing sponge *Mycale laevis* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Hydrobiologia* 687:205-217.

López-Legentil S, Erwin PM, Henkel TP, Loh T-L, Pawlik, J.R., 2010. Phenotypic plasticity in the Caribbean sponge *Callyspongia vaginalis* (Porifera: Haplosclerida). *Scientia Marina* 74:445-453.

López-Legentil S, Pawlik JR. 2009. Genetic structure of the Caribbean giant barrel sponge *Xestospongia muta* using the I3-M11 partition of COI. *Coral Reefs* 28:157-165.

Löytynoja A, Milinkovitch MC. 2001. SOAP, cleaning multiple alignments from unstable blocks. *Bioinformatics* 17:573-574.

Maddison WP, Maddison DR. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>

Maldonado M, Carmona MC, Uriz M-J, Cruzado A. 1999. Decline in Mesozoic reefbuilding sponges explained by silicon limitation. *Nature* 401:785-788.

Maldonado M. 2006. The ecology of the sponge larva. *Canadian Journal of Zoology* 84:175-194.

Manuel M, Borchiellini C, Alivon E, Le Parco Y, Vacelet J, Boury-Esnault N. 2003. 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* 52:311-333.

Matsunaga S, Nogata Y, Fusetani N. 1998a. Thiomycololides: New Cytotoxic Trisoxazole-Containing Macrolides Isolated from a Marine Sponge *Mycale* sp. *Journal of Natural Products* 61:663-666.

Mayr E, Ashlock PD. 1991. *Principles of Systematic Zoology*. 2nd edition. McGraw-Hill College. 416 p.

Medina M, Collins AG, Silberman JD, Sogin ML. 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:9707-9712.

Meroz-Fine E, Shefer S, Ilan M. 2005. Changes in morphology and physiology of an East Mediterranean sponge in different habitats. *Marine Biology* 147:243-250.

Mitchell KD, Hall KA, Hooper JNA. 2011. A new species of *Sigmaxinella* Dendy, 1897 (Demospongiae, Poecilosclerida, Desmacellidae) from the Tasman Sea. *Zootaxa* 2901:19-34.

Moraes FC. 2011. *Esponjas das ilhas oceânicas brasileiras*. Museu Nacional / UFRJ. Rio de Janeiro. 252 p.

Morrow CC, Picton BE, Erpenbeck D, Boury-Esnault N, Maggs CA, Allcock AL. 2012. Congruence between nuclear and mitochondrial genes in Demospongiae: a new hypothesis for relationships within the G4 clade (Porifera: Demospongiae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62:174-190.

Müller WEG, Blumbach B, Müller IM. 1999. Evolution of the innate and adaptive immune systems: relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum (porifera) and those in vertebrates. *Transplantation* 68:1215-1227.

Müller WEG, Schröder HC, Skorokhod A, Bünz C, Müller IM, Grebenjuk VA. 2001. Contribution of sponge genes to unravel the genome of the hypothetical ancestor of Metazoa (Urmetazoa). *Gene* 276:161-173.

Müller WEG, Schröder HC, Wiens M, Perovic-Ottstadt S, Batel R, Müller IM. 2004. Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part II - the Benefits Approaches for a Sustainable Exploitation of Biodiversity (Secondary Metabolites and Biomaterials from Sponges). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1:133-144.

Müller WEG. 1998. Origin of Metazoa: sponges as living fossils. *Naturwissenschaften* 85:11-25.

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

Muricy G. 1989. Sponges as pollution-biomonitorers at Arraial do Cabo, Southeastern Brazil, Southeastern Brazil.. *Revista Brasileira de Biologia* 49:347-354.

Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Nelson G, Ladiges PY. 1996. Paralogy in cladistic biogeography and analysis of paralogy-free subtrees. *American Museum Novitates* 3167:1-58.

Nelson GJ, Platnick NI. 1991. Three-taxon statements: a more precise use of parsimony? *Cladistics* 7:351-366.

Nichols R. 2001. Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution* 16:358-364.

Nichols SA. 2005. 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* 34:81-96.

Nielsen J, Jewett MC. 2008. The impact of systems biology and metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 8:122-131.

Ortega ML, Zubia E, Carballo JL, Salvá J. 1997. New Cytotoxic Metabolites from the Sponge *Mycale micracanthoxea*. *Tetrahedron* 53:331-340.

Ortega ML, Zubia E, Sánchez MC, Salvá J, Carballo JL. 2004. Structure and cytotoxicity of new metabolites from the sponge *Mycale cecilia*. *Tetrahedron* 60:2517-2524.

Osinga R, Tramper J, Wijffels RH. 1999. Cultivation of Marine Sponges. *Marine Biotechnology* 1:509-532.

Palacio FJ. 1982. Revisión zoogeográfica marina del Sur del Brasil. Boletim do Instituto Oceanográfico 31:69-92.

Pawlik JR, Chanas B, Toonen RJ, Fenical W. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. Marine Ecology Progress Series 127:183-194.

Perry NB, Blunt JW, Munro MHG, Pannell LK. 1988. Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. Journal of the American Chemical Society 110:4850-4851.

Perry NB, Blunt JW, Munro MHG, Thompson AM. 1990. Antiviral and Antitumor Agents from a New Zealand Sponge, *Mycale* sp. 2. Structures and Solution Conformations of Mycalamides A and B. The Journal of Organic Chemistry 55:223-227.

Peterson KJ, Addis JS. 2000. *Clypeatula cooperensis* gen. n., sp. n., a new freshwater sponge (Porifera, Spongillidae) from the Rocky Mountains of Montana, USA. Zoologica Scripta 29:265-274.

Pettit GR, Knight JC, Collins JC, Herald DL, Young VG. 2000. Antineoplastic agent 430 isolation and structure of cribostatins 3, 4 and 5 from the Republic of Maldives *Cribochalina* sp. Journal of Natural Products 63:793-798.

Philippe H, Derelle R, Lopez P, Pick K, Borchiellini C, Boury-Esnault N, Vacelet J, Renard E, Houliston E, Quéinnec E, Da Silva C, Wincker P, Le Guyader H, Leys S, Jackson DJ, Schreiber F, Erpenbeck D, Morgenstern B, Wörheide G, Manuel M. 2009. Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. Current Biology 19:706-712.

Pimentel RA, Riggins R. 1987. The nature of cladistic data. Cladistics 3:201-209.

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

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

Raymond M, Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. Evolution 49:1280-1283.

Redmond NE, Morrow CC, Thacker RW, Diaz MC, Boury-Esnault N, Cárdenas P, Hajdu E, Lôbo-Hajdu G, Picton BE, Collins AG. in press. New 18S rDNA Sequence Data Suggest Exciting New Hypotheses for Internal Relationships of Demospongiae (Phylum Porifera). Integrative and Comparative Biology 000.

Reveillaud J, van Soest R, Derycke S, Picton B, Rigaux A, Vanreusel A. 2011. Phylogenetic Relationships among NE Atlantic Plocamionida Topsent (1927) (Porifera, Poecilosclerida): Under-Estimated Diversity in Reef Ecosystems. PLoS ONE 6(2):e16533.

Ribeiro SM, Omena EP, Muricy G. 2003. Macrofauna associated to *Mycale microsigmatosa* (Porifera, Demospongiae) in Rio de Janeiro State, SE Brazil. Estuarine, Coastal and Shelf Science 57:951-959.

Richelle-Maurer E, Gomez R, Braekman JC, van de Vyver G, van Soest RWM, Devijver C. 2003. Primary cultures from the marine sponge *Xestospongia muta* (Petrosiidae, Haplosclerida). Journal of Biotechnology 100:169-176.

Ridley SO, Dendy A. 1887. 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 20 (59): i-lxviii, 1-275, pls I-LI, 1 map.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572-1574.

Rose MR, Lauder GV, editors. 1996. Adaptation. Academic Press, New York.

Row RWH. 1911. Reports on the Marine Biology of the Sudanese Red Sea, from Collections made by Cyril Crossland, M.A., B.Sc., F.Z.S. XIX. Report on the Sponges collected by Mr. Cyril Crossland in 1904-5. Part II. Non-Calcareous. Journal of the Linnean Society. Zoology 31: 287-400, pls 35-41.

Rozas EE, Albano RM, Lôbo-Hajdu G, Müller WEG, Schröder HC, Custódio MR. 2011. Isolation and cultivation of fungal strains from in vitro cell cultures of two marine sponges (Porifera: Halichondrida and Haplosclerida). Brazilian Journal of Microbiology 42:1560-1568.

Sacristán-Soriano O, Banaigs B, Becerro MA. 2012. Temporal Trends in the Secondary Metabolite Production of the Sponge *Aplysina aerophoba*. Marine Drugs 10:677-693.

Saito K, Matsuda F. 2010. Metabolomics for Functional Genomics, Systems Biology, and Biotechnology. Annual Review Of Plant Biology 61:463-489.

Savorani F, Tomasi G, Engelsen SB. 2010. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. Journal of Magnetic Resonance 202:190-202.

Schmitz FJ, Bowden BF, Toth SI. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. In: Attaway D, Zaborsky O, editors. Marine biotechnology. Vol. 1: Pharmaceutical and bioactive natural products. New York: Plenum Press. p 197-308.

Seimiya K, Ishiguro H, Miura K, Watanaba Y, Kurosawa Y. 1994. Homeobox-containing genes in the most primitive metazoa, the sponges. *European Journal of Biochemistry* 221:219-225.

Sneath PHA, Sokal PR. 1973. *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman, San Francisco. 573 p.

Solé-Cava AM, Kelecom A, Kannengiesser GJ. 1981. Study of some sponges (Porifera, Demospongiae) from the infralitoral of Guarapari, Espírito Santo, Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, 60:125-150.

Sollas WJ. 1884. On the origin of freshwater faunas: A study in evolution. *Scientific Transactions of the Royal Dublin Society* 2:87-118.

Spalding MD, Fox HE, Allen GR, Davidson N, Ferdaña ZA, Finlayson M, Halpern BS, Jorge MA, Lombana A, Lourie SA, Martin KD, McManus E, Molnar J, Recchia CA, Robertson J. 2007. Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* 57:573-583.

Sperling EA, Peterson KJ, Pisani D. 2009. Phylogenetic-signal dissection of nuclear housekeeping genes supports the paraphyly of sponges and the monophyly of Eumetazoa. *Molecular Biology and Evolution* 26:2261-2274.

Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. 2008. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web-Servers. *Systematic Biology* 75:758-771.

Swofford DL. 2003. PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tabachnick KR. 1994. Distribution of Recent Hexactinellida. In: van Soest RWM, van Kempen ThMG, Braekman J-C, editors. *Sponges in Time and Space*. Balkema: Rotterdam. p 225–232.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.

Tanaka J, Higa T, Suwanborirux K, Kokpol U, Bernardinelli G, Jefford CW. 1993. Bioactive Norsesterterpene 1,2-Dioxanes from a Thai Sponge, *Mycale* sp. *The Journal of Organic Chemistry* 58:2999-3002.

Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.



- Thakur NL, Hentschel U, Krasko A, Anil AC, Müller WEG. 2003. Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for chemical defense. *Aquatic Microbial Ecology* 31:77-83.
- Thomas TRA, Kavlekar DP, LokaBharathi PA. 2010. Marine Drugs from Sponge-Microbe Association - A Review. *Marine Drugs* 8:1417-1468.
- Thoms C, Schupp PJ. 2007. Chemical defense strategies in sponges: a review. In: Custódio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G, editors. *Série Livros 28*. Museu Nacional, Rio de Janeiro. p 627-637.
- Throckmorton LH. 1965. Similarity versus relationship in *Drosophila*. *Systematic Zoology* 14:221-236.
- Topsent E. 1924. Revision des Mycale de l'Europe Occidentale. *Annales de l'Institut Océanographique de Monaco* 1:77-118.
- Turnamal M. 1969. Sponges of Red Sea origin on the Mediterranean coast of Israel. *Israel Journal of Zoology* 18:149-155.
- Uriz M-J. 2006. Mineral skeletogenesis in Sponges. *Canadian Journal of Zoology* 86:1-35.
- Vacelet J, Boury-Esnault N. 1995. Carnivorous sponges. *Nature* 373:333-335.
- van Soest RWM, Boury-Esnault N, Hooper JNA, Rützler K, de Voogd NJ, Alvarez de Glasby B, Hajdu E, Pisera AB, Manconi R, Schoenberg C, Janussen D, Tabachnick KR, Klautau M, Picton B, Kelly M, Vacelet J, Dohrmann M, Cristina Díaz M. 2012. World Porifera database. Acessível em <http://www.marinespecies.org/porifera>
- van Soest RWM, Boury-Esnault N, Vacelet J, Dohrmann M, Erpenbeck D, De Voogd NJ, Santodomingo N, Vanhoorne B, Kelly M, Hooper JNA. 2012. Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLoS ONE* 7(4):e35105.
- van Soest RWM, Hajdu E. 1997. Marine area relationships from twenty sponge phylogenies. A comparison of methods and coding strategies. *Cladistics* 13:1-20.
- van Soest RWM, Hajdu E. 2002. Family Mycalidae Lundbeck, 1905. In: Hooper JNA, van Soest RWM, editors. *Systema Porifera. A guide to the classification of sponges*. Volume 1. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. p 669-690.
- van Soest RWM. 1982. A small collection of sponges (Porifera) from Hong Kong. In: Morton BS, Tseng CK, editors. *The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China (Proceedings 1st International Marine Biology Workshop)*. p 85-95.

van Soest RWM. 1984. Marine sponges from Curaçao and other Caribbean localities. Part III. Poecilosclerida. In: Hummelinck PW, van der Steen LJ, editors. Uitgaven van de Natuurwetenschappelijke Studiekring voor Suriname en de Nederlandse Antillen. No. 112. Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean Islands 62: p 1-173.

van Soest RWM. 1987. Phylogenetic exercises with monophyletic groups of sponges. In: Vacelet J, Boury-Esnault N, editors. Taxonomy of Porifera from the N.E. Atlantic; Mediterranean Sea. NATO ASI Series G13. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. p 227-241.

van Soest RWM. 1991. Demosponge higher taxa classification re-examined. In: Reitner J, Keupp H, editors. Fossil and recent sponges. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. p 54-71.

van Soest RWM. 1994. Demosponge distribution patterns. In: van Soest RWM, van Kempen ThMG, Braekman J-C, editors. Sponges in Time and Space. Balkema: Rotterdam. p 213-223.

van Soest RWM. 1996. Recoding widespread distributions for general area cladogram construction. *Vie et Milieu* 46:155-161.

Vargas S, Erpenbeck D, Göcke C, Hall K A, Hooper JNA, Janussen D, Wörheide G. 2012. Molecular phylogeny of *Abyssocladia* (Cladorhizidae: Poecilosclerida) and *Phelloderma* (Phellodermidae: Poecilosclerida) suggests a diversification of chelae microscleres in cladorhizid sponges. *Zoologica Scripta* 42:106-116.

Weckwerth W, Morgenthal K. 2005. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discovery Today* 10:1551-1558.

Wiley EO. 1981. Phylogenetics. The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics. Wiley-Interscience, New York. 439 p.

Wiley EO. 1988. Parsimony analysis and vicariance biogeography. *Systematic Zoology* 37:271-290.

Wilm A, Mainz I, Steger G. 2006. An enhanced RNA alignment benchmark for sequence alignment programs. *Algorithms for Molecular Biology* 1:19.

Wilson HV. 1894. Observations on the gemmule and egg development of marine sponges. *Journal of Morphology* 9:277-406, pls XIV-XXV.

Wörheide G, Nichols S, Goldberg J. 2004. Intragenomic variation of the rDNA internal transcribed spacers (ITS) in sponges (Phylum Porifera): Implications for phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33:816-830.

Wörheide G. 2006. Low variation in partial cytochrome oxidase subunit I (COI) mitochondrial sequences in the coralline demosponge *Astrosclera willeyana* across the Indo-Pacific. *Marine Biology* 148:907-912.

Xia X, Xie Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92:371-373.

Zaragüeta-Bagils R, Bourdon E. 2007. Three-item analysis: Hierarchical representation and treatment of missing and inapplicable data. *Comptes Rendus Palevol* 6:527–534.

Zaragüeta-Bagils R, Ung V, Grand A, Vignes-Lebbe R, Cao N, Ducasse J. 2012. LisBeth: New cladistics for phylogenetics and biogeography. *Comptes Rendus Palevol* 11:563-566.

## APÊNDICE A - Material examinado

Tabela A1. Lista do material examinado. A lista inclui somente as amostras a partir das quais foram geradas sequências de ao menos um marcador molecular. Na tabela estão indicadas a Subordem de Poecilosclerida, Família e Espécie a que as espécies das amostras pertencem, seguido pelo número de tombo destas. A localidade das amostras é dada pelo país de origem do material. As amostras do Brasil estão indicadas pela UF do estado de origem. As extrações de DNA realizadas por colaboradores estão indicadas pelo nome do mesmo sob o tópico Protocolo. Também estão indicadas a concentração da suspensão de DNA estocado (ng/μl), assim como a razão da densidade óptica (OD) nos espectros 230, 260 e 280 nm, quando disponíveis.

Subordem	Família	Espécie	Tombo	Localidade	Extração			
					Protocolo	ng/μl	260/280	260/230
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) americana</i>	EH29	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) americana</i>	UERJ 2	SP	A. Mendes	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) americana</i>	UERJ 826	RJ	-	72	1.7	0.9
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) americana</i>	UERJ 829	RJ	-	9	1.9	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) americana</i>	UERJ 830	RJ	-	7	1.6	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) carmigropila</i>	BT09	Panamá	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) carmigropila</i>	MNRJ 15602	Panamá	-	99.8	1.73	0.76
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) carmigropila</i>	MNRJ 15888	Panamá	-	37.6	1.45	0.5
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) citrina</i>	MNRJ 15636	Panamá	-	66.1	1.84	1.37
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) citrina</i>	MNRJ 15835	Panamá	-	39.1	1.87	0.8
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) citrina</i>	MNRJ 15860	Panamá	-	56.5	1.88	1.14
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 1153	França	-	27	1.6	0.9
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 1167	França	-	120	1.9	0.3
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 1175	França	-	45	1.7	0.4
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 4051	França	A. Mendes	6715	2.0	2.0
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 4057	França	A. Mendes	4230	1.9	1.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 4061	França	A. Mendes	2355	2.0	1.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) contarenii</i>	MNRJ 4076	França	A. Mendes	1765	1.9	1.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) crassissima</i>	BC04	Vietnã	-	5.9	1.8	0.5
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) escarlatei</i>	EHUERJ 010	AL	-	45	1.9	1.2
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) escarlatei</i>	EHUERJ 033	AL	-	88	1.9	1.5

Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) escarlatei</i>	UERJ 11	SP	A. Mendes	1350	1.7	1.6
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) escarlatei</i>	UERJ 822	RJ	-	52	2.0	1.1
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) escarlatei</i>	UERJ 9	SP	A. Mendes	512	2.0	1.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) escarlatei?</i>	EHUERJ 025	AL	-	57	1.9	1.3
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) escarlatei?</i>	EHUERJ 040	AL	-	71	1.9	1.5
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) furcata</i>	BC09	Indonésia	-	16.5	1.4	0.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) furcata</i>	BC10	Indonésia	-	18.1	1.3	0.5
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) lilianae</i>	BC07	Havaí	-	10.0	1.6	0.6
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) magellanica</i>	MNRJ 9178	Chile	-	30	1.9	0.2
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) magellanica</i>	MNRJ 9194	Chile	-	48	1.8	0.2
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) phillippensis</i>	BC08	Vietnã	-	33.8	1.3	0.5
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) syrinx</i>	BC05	Mar Adriático	-	57.9	1.9	1.3
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) tunicata</i>	ZMAPOR19661	Irlanda	B. Cosme	476	2.1	1.8
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) adhaerens</i>	UFRJPOR 4098	?	-	18	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) laxissima</i>	MNRJ 15841	Panamá	-	27.4	1.85	0.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) laxissima</i>	MNRJ 15842	Panamá	-	110.3	1.88	1.32
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) laxissima</i>	UERJ 12	SP	A. Mendes	152	2.0	0.9
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) laxissima</i>	UERJ 4	SP	A. Mendes	569	2.0	1.8
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) laxissima</i>	MNRJ 1027	SP	A. Mendes	1744	1.9	1.8
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) laxissima</i>	MNRJ 2563	BA	A. Mendes	747	1.9	1.6
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) mirabilis</i>	MNRJ 1833	Austrália	-	142	1.8	1.0
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) mirabilis</i>	MNRJ 3005	Austrália	-	138	1.9	1.3
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) mirabilis</i>	MNRJ 3005	Austrália	-	52	1.5	0.5
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) cecilia</i>	BPBM 550	Havaí	-	35	1.7	0.9
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) cecilia (=maunakea)</i>	BPBM 520	Havaí	-	28	1.8	1.2
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) macilenta</i>	MNRJ 3838	?	-	59	1.8	1.8
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) macilenta</i>	MNRJ 3841	?	-	7	1.5	0.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) magnirhaphidifera</i>	MNRJ 15714	Panamá	-	39.2	1.71	0.67
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) magnirhaphidifera</i>	MNRJ 15729	Panamá	-	42.4	1.84	1.37
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) magnirhaphidifera</i>	MNRJ 15730	Panamá	-	54.8	1.82	1.07
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) magnirhaphidifera</i>	MNRJ 1998	SP	-	94	1.9	0.3
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) magnirhaphidifera</i>	MNRJ 14287	AL	-	5	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) magnirhaphidifera</i>	MNRJ 647	Bahamas	A. Mendes	2434	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH1	RJ	-	-	-	-

Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH12	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH13	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH13	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH14	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH15	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH17	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH19	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH2	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH20	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH25	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH28	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH30	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH32	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH34	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH37	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH4	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH6	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EH8	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EHUERJ 002	AL	-	85	1.9	1.6
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EHUERJ 003	AL	-	131	1.9	1.5
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EHUERJ 007	AL	-	75	1.9	1.3
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	EHUERJ 008	AL	-	42	2.0	1.1
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR10	RJ	-	35.7	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR11	RJ	-	46.2	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR12	RJ	-	58.8	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR2	RJ	-	130.2	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR3	RJ	-	52.5	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR4	RJ	-	54.6	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR5	RJ	-	109.2	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR6	RJ	-	77.7	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR7	RJ	-	46.2	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR8	RJ	-	79.8	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiAR9	RJ	-	107.1	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA1	BA	-	82.7	1.84	-

Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA11	BA	-	52.2	1.57	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA12	BA	-	42.4	1.67	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA14	BA	-	36.7	1.62	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA15	BA	-	108.7	1.29	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA16	BA	-	52.8	1.44	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA17	BA	-	23.7	1.65	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA18	BA	-	133.9	1.27	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA19	BA	-	45.4	1.64	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA20	BA	-	30.6	1.46	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA3	BA	-	75.0	1.41	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA4	BA	-	65.8	1.79	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA5	BA	-	97.4	1.73	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA6	BA	-	142.1	1.62	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA7	BA	-	98.2	1.79	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA8	BA	-	221.3	2.01	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS06	SP	-	35.0	1.70	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS106	SP	-	47.7	1.74	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS23	SP	-	75.9	1.33	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS69	SP	-	91.7	1.25	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS89	SP	-	32.5	1.74	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS90	SP	-	40.4	1.30	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 14288	AL	-	86	2.0	1.8
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 14289	AL	-	15	1.6	1.1
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 15644	Panamá	-	62.9	1.92	1.16
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 15664	Panamá	-	104.6	1.89	1.2
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 15672	Panamá	-	81.5	1.87	1.16
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 15696	Panamá	-	176.1	1.86	1
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 15716	Panamá	-	89.2	1.85	1.23
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 655	Bahamas	A. Mendes	7088	1.8	1.4
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 656	Bahamas	A. Mendes	2732	1.9	1.4
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 657	Bahamas	A. Mendes	4627	1.8	1.3
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 184	RJ	A. Mendes	8928	1.9	1.8
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 185	RJ	A. Mendes	1229	1.9	2.0
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 824	RJ	-	79	1.9	0.9

Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 825	RJ	-	69	1.9	0.9
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 827	RJ	-	380	1.7	0.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 834	RJ	-	106	1.9	1.0
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Grapelia) ancorina</i>	UFRJPOR 4242	?	-	20	1.7	0.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Grapelia) ancorina</i>	UFRJPOR 4243	?	-	30	1.7	0.9
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	BT07	Panamá	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	EHUERJ 068	AL	-	84	1.9	1.2
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 14894	AL	-	48	1.8	1.6
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15380	AL	-	71	1.9	1.9
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15733	Panamá	-	54.6	1.8	1.04
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15743	Panamá	-	42.4	1.86	1.46
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15756	Panamá	-	32.4	1.92	1.41
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15789	Panamá	-	55	1.83	1.29
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15793	Panamá	-	33.8	1.91	1.95
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15796	Panamá	-	33.7	1.88	1.67
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15797	Panamá	-	35.4	1.89	1.73
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 4624	AL	-	16	1.8	1.2
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) arenaria</i>	MNRJ 8411	BA	-	32	1.9	0.3
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) arenaria</i>	UERJ 83	RJ	A. Mendes	68	1.9	1.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) armata</i>	MNRJ 10674	?	-	177	1.9	0.5
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) doellojuradoi</i>	MNRJ 10856	?	-	493	2.1	2.2
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) fusca</i>	UFRJPOR 3773	?	-	23	1.7	1.2
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) grandis</i>	BPBM 764	?	-	11	1.9	1.3
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	MNRJ 15693	Panamá	-	68.3	1.85	1.81
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	MNRJ 15694	Panamá	-	69.2	1.89	1.78
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	MNRJ 15703	Panamá	-	54	1.87	1.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis (branca)</i>	MNRJ 15637	Panamá	-	83.3	1.87	1.48
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis (branca)</i>	MNRJ 15742	Panamá	-	45.7	1.82	1.56
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) lingua</i>	ID 225	?	B. Cosme	3	2.4	0.1
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) lingua</i>	ZMAPOR21411	?	B. Cosme	600	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) loveni</i>	cat. 1900-252	?	-	39	1.6	1.5
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) phyllophila</i>	BPBM 722	Havaí	-	111	1.9	1.1
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) thielei</i>	MNRJ 8157	Chile	-	70	1.9	0.2
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) tridens</i>	ZMAPOR13405	Antártica	B. Cosme	37	-	-



Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) vansoesti</i>	BC01	Indonésia	-	76.5	1.7	1.0
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) arcuiris</i>	UERJ 136	SP	A. Mendes	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) sp.</i>	EHS1	BA	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) sp.</i>	EHS2	BA	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) sp.</i>	EHS3	BA	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) sp.</i>	EHS4	BA	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) sp.</i>	EHS5	BA	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) sp.</i>	EHS6	BA	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) sp.</i>	EHS7	BA	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) sp.</i>	EHUER J004	AL	-	87	1.9	1.5
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Oxymycale) acerata</i>	MNRJ 11131	Antártica	-	39	1.9	1.4
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Oxymycale) acerata</i>	MNRJ 13176	Antártica	-	65	1.9	1.3
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Paresperella) sp.</i>	MNRJ 15642	Panamá	-	61.4	1.9	1.95
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Paresperella) sp.</i>	MNRJ 15865	Panamá	-	119.7	1.84	1.21
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	EH10	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	EH11	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	EH18	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	EH21	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	EH22	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	EH23	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	EH3	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	EH5	RJ	-	-	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	MNRJ 15666	Panamá	-	82.5	1.84	1.1
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	MNRJ 15707	Panamá	-	59.2	1.97	1.25
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	MNRJ 15889	Panamá	-	76.9	1.93	1.87
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	Myc01	SP	-	53	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	Myc02	SP	-	34	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	Myc03	SP	-	17	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	Myc06	SP	-	84	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	Myc07	SP	-	91	-	-
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	UERJ 823	RJ	-	379	1.8	1.0
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	UERJ 831	RJ	-	137	1.6	0.7
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) parishi</i>	BC02	Havaí	-	15.0	1.6	0.6
Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) parishi</i>	BC03	Havaí	-	102.0	1.9	1.7

Mycalina	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) parishi</i>	BPBM 544	Havaí	-	7	1.6	1.0
Mycalina	Cladorhizidae	<i>Asbestopluma sp. n.2</i>	MNRJ10866	Chile	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Cladorhizidae	<i>Asbestopluma sp. n.2</i>	MNRJ9118	Chile	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Cladorhizidae	<i>Asbestopluma sp. n.3</i>	MNRJ9119	Chile	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Cladorhizidae	<i>Asbestopluma vacoleti</i>	ZMAPOR13264	Antártica	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Cladorhizidae	<i>Abyssocladia sp.</i>	MNRJ10873	Chile	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Cladorhizidae	<i>Chondrocladia</i>	MNRJ10882	Chile	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Cladorhizidae	<i>Chondrocladia</i>	MNRJ10882	Chile	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Cladorhizidae	<i>Cladorhiza flosabyssi</i>	ZMAPOR21289	?	B. Cosme	3	3.26	0.07
Mycalina	Cladorhizidae	<i>Cladorhiza gelida</i>	ZMAPOR19680	Irlanda	B. Cosme	5	2.16	0.1
Mycalina	Desmacellidae	<i>Biemna caribbea?</i>	MNRJ 14280	AL	-	-	-	-
Mycalina	Desmacellidae	<i>Biemna caribbea?</i>	MNRJ 14893	AL	-	-	-	-
Mycalina	Desmacellidae	<i>Biemna caribbea?</i>	MNRJ 14904	AL	-	-	-	-
Mycalina	Desmacellidae	<i>Biemna caribbea?</i>	MNRJ 14916	AL	-	-	-	-
Mycalina	Desmacellidae	<i>Biemna sp.</i>	MNRJ 10316	Chile	-	60	1.8	2.0
Mycalina	Desmacellidae	<i>Desmacella aff. Anexa</i>	MNRJ13767	?	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Desmacellidae	<i>Dragmatella aberrans</i>	ZMAPOR18038	Espanha	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Desmacellidae	<i>Neofibularia nolitangere</i>	ZMAPOR14177	Cur	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Desmacellidae	<i>Sigmaxinella cearense</i>	MNRJ8687	CE	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Desmacellidae	<i>Sigmaxinella cearense</i>	MNRJ8687	CE	B. Cosme	64	-	-
Mycalina	Esperiopsidae	<i>Amphilectus fucorum</i>	MNRJ3755	França	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Esperiopsidae	<i>Amphilectus sp.</i>	MNRJ 10756	Chile	-	58	1.9	1.9
Mycalina	Esperiopsidae	<i>Esperiopsis sp.</i>	ID 271	Antártica	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Esperiopsidae	<i>Semisuberites cribosa</i>	ZMAPOR17024	Esc	B. Cosme	383	1.9	1.3
Mycalina	Esperiopsidae	<i>Ulosa stuposa</i>	ZMAPOR14109	França	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Guitarridae	<i>Guitarra sepia</i>	MNRJ3923	?	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Guitarridae	<i>Guitarra sp.</i>	ID 241	?	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Guitarridae	<i>Tetrapocillon sp</i>	ZMAPOR15263	Mad	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Hamacanthidae	<i>Hamacantha (Vomerula) falcula</i>	ID 264	Irlanda	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Isodictyidae	<i>Coelocartheria singapoorensis</i>	ZMAPOR17703	Indonésia	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Isodictyidae	<i>Isodyctia sp.</i>	MNRJ 13482	Chile	-	15	1.7	0.7
Mycalina	Merliidae	<i>Merlia normani</i>	MNRJ 15831	Panamá	-	16.7	1.7	1.7
Mycalina	Merliidae	<i>Merlia normani</i>	MNRJ 9454	Panamá	-	6	-	-
Mycalina	Merliidae	<i>Merlia normani</i>	ZMAPOR04765	?	B. Cosme	-	-	-

Mycalina	Mycalidae	<i>Phlyctaenopora sp.</i>	ID 213	?	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Podospongiidae	<i>Diacarnus megaspinorhabdosa</i>	ZMAPOR13278	Indonésia	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Podospongiidae	<i>Podospongia sp.</i>	MNRJ 11666	Antártica	-	-	-	-
Mycalina	Podospongiidae	<i>Sceptrintus richardi</i>	ZMAPOR10791	?	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Podospongiidae	<i>Sceptrintus richardi</i>	ZMAPOR10791	?	B. Cosme	-	-	-
Mycalina	Podospongiidae	<i>Sigmosceptrella sp.</i>	MNRJ10323b	Chile	B. Cosme	-	-	-
Microcionina	Acaridae	<i>Acarus innominatus</i>	MNRJ 14290	AL	-	16	-	-
Microcionina	Microcionidae	<i>Clathria cf calla</i>	BT14	Panamá	-	-	-	-
Microcionina	Microcionidae	<i>Clathria sp.</i>	#100	RJ	-	27	1.7	1.3
Myxillina	Desmacididae	<i>Desmapsamma ancorata</i>	#8	RJ	-	203	1.7	0.9
Myxillina	Tedaniidae	<i>Tedania ignis</i>	BT10	Panamá	-	-	-	-
Myxillina	Tedaniidae	<i>Tedania ignis</i>	BT11	Panamá	-	-	-	-

Tabela A2. Amplificação dos marcadores moleculares por amostra utilizada. A tabela lista a espécie e o número de tombo de cada amostra, além de indicar para cada uma o número de reações de PCR realizadas (T), o número de amplificações bem sucedidas (A) a razão entre o número de sucessos sobre o número de tentativas (A/T) e se o sequenciamento (S) dos produtos amplificados foi realizado, sendo que C indica sequências obtidas de organismos contaminantes ou de baixa qualidade.

Espécie	Tombo	16S			28S				cox1			S	
		T	A	A/T	S	T	A	A/T	S	T	A		A/T
<i>M. (Aegogropila) americana</i>	EH29	1	1	1,00	-	-	-	-	-	2	1	0,50	S
<i>M. (Aegogropila) americana</i>	UERJ 2	3	1	0,33	S	1	1	1,00	S	1	0	0,00	-
<i>M. (Aegogropila) americana</i>	UERJ 826	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) americana</i>	UERJ 829	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) americana</i>	UERJ 830	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) carmigropila</i>	BT09	3	2	0,67	S	1	1	1,00	S	2	0	0,00	-
<i>M. (Aegogropila) carmigropila</i>	MNRJ 15602	1	0	0,00	-	1	1	1,00	S	1	0	0,00	C
<i>M. (Aegogropila) carmigropila</i>	MNRJ 15888	1	0	0,00	-	1	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) citrina</i>	MNRJ 15636	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S
<i>M. (Aegogropila) citrina</i>	MNRJ 15835	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) citrina</i>	MNRJ 15860	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	1	0	0,00	C
<i>M. (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 1153	3	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 1167	5	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 1175	2	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 4051	3	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 4057	5	1	0,20	S	1	1	1,00	S	5	0	0,00	-
<i>M. (Aegogropila) contareni</i>	MNRJ 4061	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) contarenii</i>	MNRJ 4076	3	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) crassissima</i>	BC04	2	1	0,50	S	1	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) escarlatei</i>	EHUERJ 010	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) escarlatei</i>	EHUERJ 033	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) escarlatei</i>	UERJ 11	4	2	0,50	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) escarlatei</i>	UERJ 822	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) escarlatei</i>	UERJ 9	3	2	0,67	S	1	1	1,00	S	2	1	0,50	S
<i>M. (Aegogropila) escarlatei?</i>	EHUERJ 025	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) escarlatei?</i>	EHUERJ 040	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) furcata</i>	BC09	2	0	0,00	-	1	1	1,00	S	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) furcata</i>	BC10	3	2	0,67	-	1	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) lilianae</i>	BC07	2	1	0,50	S	1	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) magellanica</i>	MNRJ 9178	4	2	0,50	S	1	1	1,00	S	4	0	0,00	-
<i>M. (Aegogropila) magellanica</i>	MNRJ 9194	4	1	0,25	S	1	1	1,00	S	-	-	-	S
<i>M. (Aegogropila) phillippensis</i>	BC08	2	1	0,50	S	1	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) syrx</i>	BC05	1	1	1,00	S	1	1	1,00	-	-	-	-	-
<i>M. (Aegogropila) tunicata</i>	ZMAPOR19661	2	2	1,00	S	1	1	1,00	S	4	0	0,00	-
<i>M. (Arenochalina) adhaerens</i>	UFRJPOR 4098	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Arenochalina) laxissima</i>	MNRJ 15841	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-
<i>M. (Arenochalina) laxissima</i>	MNRJ 15842	1	1	1,00	S	-	-	-	S	1	1	1,00	S
<i>M. (Arenochalina) laxissima</i>	UERJ 12	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S
<i>M. (Arenochalina) laxissima</i>	UERJ 4	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-
<i>M. (Arenochalina) laxissima</i>	MNRJ 1027	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Arenochalina) laxissima</i>	MNRJ 2563	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Arenochalina) mirabilis</i>	MNRJ 1833	5	1	0,20	S	2	2	1,00	S	5	0	0,00	-
<i>M. (Arenochalina) mirabilis</i>	MNRJ 3005	5	1	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Arenochalina) mirabilis</i>	MNRJ 3005	6	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) cecilia</i>	BPBM 550	3	1	0,33	S	1	1	1,00	S	1	0	0,00	-



<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA3	2	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA4	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA5	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA6	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA7	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSA8	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS06	2	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS106	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS23	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS69	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS89	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MmiSS90	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 14288	1	1	1,00	S	-	-	-	-	1	0	0,00	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 14289	1	1	1,00	S	-	-	-	-	1	0	0,00	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 15644	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 15664	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 15672	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	1	0	0,00	C	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 15696	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 15716	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 655	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 656	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	MNRJ 657	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 184	3	1	0,33	S	1	1	1,00	S	2	0	0,00	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 185	3	2	0,67	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 824	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 825	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 827	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Carmia) microsigmatosa</i>	UERJ 834	1	1	1,00	S	-	-	-	-	1	0	0,00	-	-
<i>M. (Grapelia) ancorina</i>	UFRJPOR 4242	2	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Grapelia) ancorina</i>	UFRJPOR 4243	4	0	0,00	-	3	0	0,00	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	BT07	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	2	1	0,50	S	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	EHUERJ 068	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 14894	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15380	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	3	0	0,00	-	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15733	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15743	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15756	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15789	1	1	1,00	S	-	-	-	S	1	1	1,00	S	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15793	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15796	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 15797	1	1	1,00	S	-	-	-	S	1	1	1,00	S	-
<i>M. (Mycale) alagoana</i>	MNRJ 4624	2	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) arenaria</i>	MNRJ 8411	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) arenaria</i>	UERJ 83	4	1	0,25	-	3	3	1,00	S	2	1	0,50	S	-
<i>M. (Mycale) armata</i>	MNRJ 10674	5	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) doellojuradoi</i>	MNRJ 10856	2	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) fusca</i>	UFRJPOR 3773	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) grandis</i>	BPBM 764	3	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) laevis</i>	MNRJ 15693	1	1	1,00	S	-	-	-	S	1	1	1,00	S	-
<i>M. (Mycale) laevis</i>	MNRJ 15694	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) laevis</i>	MNRJ 15703	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) laevis (branca)</i>	MNRJ 15637	1	1	1,00	S	-	-	-	S	1	1	1,00	S	-
<i>M. (Mycale) laevis (branca)</i>	MNRJ 15742	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-	-

<i>M. (Mycale) lingua</i>	ID 225	1	1	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. (Mycale) lingua</i>	ZMAPOR21411	6	1	0,17	S	1	1	1,00	S	6	0	0,00	-
<i>M. (Mycale) loveni</i>	cat. 1900-252	2	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) phyllophila</i>	BPBM 722	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	1	0	0,00	-
<i>M. (Mycale) thielei</i>	MNRJ 8157	2	2	1,00	S	1	1	1,00	S	2	0	0,00	C
<i>M. (Mycale) tridens</i>	ZMAPOR13405	-	-	-	-	1	1	1,00	S	-	-	-	-
<i>M. (Mycale) vansoesti</i>	BC01	1	1	1,00	-	1	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>M. (Naviculina) arcuiris</i>	UERJ 136	3	1	0,33	S	1	1	1,00	S	6	0	0,00	C
<i>M. (Naviculina) sp.</i>	EHS1	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Naviculina) sp.</i>	EHS2	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Naviculina) sp.</i>	EHS3	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Naviculina) sp.</i>	EHS4	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Naviculina) sp.</i>	EHS5	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Naviculina) sp.</i>	EHS6	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Naviculina) sp.</i>	EHS7	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Naviculina) sp.</i>	EHUER J004	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Oxymycale) acerata</i>	MNRJ 11131	2	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Oxymycale) acerata</i>	MNRJ 13176	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	3	0	0,00	C
<i>M. (Paresperella) sp.</i>	MNRJ 15642	-	-	-	-	-	-	-	S	1	1	1,00	S
<i>M. (Paresperella) sp.</i>	MNRJ 15865	1	1	1,00	S	-	-	-	S	1	1	1,00	S
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	EH10	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	EH11	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	EH18	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	EH21	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	EH22	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	EH23	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	EH3	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	EH5	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	MNRJ 15666	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	MNRJ 15707	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	MNRJ 15889	1	1	1,00	S	-	-	-	S	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	Myc01	1	1	1,00	S	1	1	1,00	S	1	0	0,00	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	Myc02	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	Myc03	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	Myc06	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	Myc07	1	1	1,00	S	-	-	-	-	6	1	0,17	S
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	UERJ 823	1	1	1,00	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) angulosa</i>	UERJ 831	1	1	1,00	S	-	-	-	-	1	1	1,00	S
<i>M. (Zygomycale) parishii</i>	BC02	4	1	0,25	-	2	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) parishii</i>	BC03	1	1	1,00	-	1	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>M. (Zygomycale) parishii</i>	BPBM 544	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Asbestopluma sp. n.2</i>	MNRJ9118	-	-	-	-	1	1	1,00	S	-	-	-	-
<i>Asbestopluma sp. n.2</i>	MNRJ10866	-	-	-	-	1	1	1,00	S	-	-	-	-
<i>Asbestopluma sp. n.3</i>	MNRJ9119	-	-	-	-	1	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>Asbestopluma vacoleti</i>	ZMAPOR13264	-	-	-	-	1	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>Abyssocladia sp.</i>	MNRJ10873	-	-	-	-	1	0	0,00	-	-	-	-	-
<i>Chondrocladia</i>	MNRJ10882	-	-	-	-	1	1	1,00	-	-	-	-	-
<i>Chondrocladia</i>	MNRJ10882	-	-	-	-	1	1	1,00	S	2	1	0,50	S
<i>Cladorhiza flosabyssi</i>	ZMAPOR21289	-	-	-	-	1	1	1,00	S	-	-	-	-
<i>Cladorhiza gelida</i>	ZMAPOR19680	-	-	-	-	1	1	1,00	-	-	-	-	-
<i>Biemna caribbea?</i>	MNRJ 14893	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1,00	S
<i>Biemna caribbea?</i>	MNRJ 14904	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1,00	S
<i>Biemna caribbea?</i>	MNRJ 14916	-	-	-	-	1	1	1,00	S	-	-	-	-





## APÊNDICE B - Protocolos de extração e amplificação

---

### B1. Protocolo de purificação de DNA

#### Soluções e Tampões

- Tampão de lise: Hidrocloreto de Guanidina (GuHCl) 4 M, Tris-HCl 10 mM (pH 6,4), EDTA 20 mM, e TritonX-100 0,65 %.
- Clorofórmio.
- Suspensão de diatomácea: Terra de diatomácea (Celite) 20 % e HCl 0,32 %.  
Adicionar 50 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ e 500 µl de solução de HCl 32% a 10 g de terra de diatomácea analítica (filtrada por pré-deposição tratada com carbonato de cálcio e calcinada).
- Etanol (100 %).
- Tampão de eluição: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0).

#### Procedimento

1. Amostra triada sob estereoscópio óptico para remoção de parasitas e outros organismos associados;
2. Transferir para microtubo de 1,5 mL um pedaço de cerca de 10 mm<sup>3</sup> de tecido;
3. Adicionar 600 µL de **tampão de lise**.
4. Homogeneizar a solução macerando a amostra com pistilo de polipropileno aplicando movimentos circulares contra o fundo do tubo;
5. Incubar o homogeneizado em banho-maria à 60 °C por no mínimo 2 horas;
6. Adicionar 600 µL de **clorofórmio** e misturar por inversão;
7. Centrifugar à 6000 RPM por 3 minutos à temperatura ambiente em microcentrífuga;
8. Retirar 550 µL do sobrenadante para microtubo de 1,5 mL limpo;
9. Adicionar 40 µL de **suspensão de diatomácea** e incubar à temperatura ambiente por 10' com agitação (é importante que a solução final tenha pH inferior à 6,5 ou o DNA não irá adsorver à sílica);
10. Centrifugar a 6000 RPM por 3 minutos à temperatura ambiente;
11. Descartar o sobrenadante e adicionar 1 mL de **etanol** 100%;
12. Ressuspender o precipitado por agitação em vortex e incubar à -20 °C por no mínimo 15';
13. Repetir os passos 10-12 mais uma vez (é importante a fim de eliminar os traços de GuSCN que poderiam inibir a reação de PCR);
14. Descartar o sobrenadante e secar completamente o precipitado em fluxo laminar ou em concentradores à vácuo;
15. Ressuspender o precipitado em 75 µL do **tampão de eluição** e incubar à 56 °C por 10' (é importante que a solução final tenha pH superior à 7,5 ou o DNA não irá eluir da sílica);
16. Centrifugar à 10.000 RPM por 5';

17. Transferir 60  $\mu$ L do sobrenadante para um microtubo limpo devidamente rotulado.

## B2. Protocolos de amplificação por PCR

### 16S

- Reação de PCR: DNA polimerase GoTaq (Promega) 1 U em tampão próprio com  $MgCl_2$  1,5 mM, dNTP (Qiagen) 0,13 mM, *primers* diplo-rnl-f1 e diplo-rnl-r1 (LAVROV *et al.*, 2008) 0,1  $\mu$ M e DNA fita molde ~ 50 ng.
- Termociclagem: uma fase inicial de desnaturação à 92 °C por 4'; 5 ciclos com desnaturação à 92 °C por 30'', pareamento à 44 °C por 45'', e extensão à 72 °C por 1'; 35 ciclos de desnaturação à 92 °C por 30'', pareamento à 51 °C por 45'', e extensão à 72 °C por 1'; e uma fase final de extensão à 72 °C por 6'.

### 28S

- Reação de PCR: DNA polimerase GoTaq (Promega) 1 U em tampão próprio com  $MgCl_2$  1,5 mM, dNTP (Qiagen) 0,13 mM, *primers* 28SCallyF e 28SCallyR (LÓPEZ-LEGENTIL *et al.*, 2011) 0,1  $\mu$ M e DNA fita molde ~ 50 ng.
- Termociclagem: uma fase inicial de desnaturação à 94 °C por 1'; 40 ciclos com desnaturação à 95 °C por 30'', pareamento à 45 °C por 30'', e extensão à 72 °C por 2'; e uma fase final de extensão à 72 °C por 5'.

### cox1

- Reação de PCR: DNA polimerase GoTaq (Promega) 1 U em tampão próprio com  $MgCl_2$  1,5 mM, dNTP (Qiagen) 0,13 mM, *primers* COIPlo20F (REVEILLAUD *et al.*, 2011) e HCO2198 (FOLMER *et al.*, 1994) 0,1  $\mu$ M e DNA fita molde ~ 50 ng.
- Termociclagem: uma fase inicial de desnaturação à 92 °C por 3'; 40 ciclos com desnaturação à 94 °C por 30'', pareamento à 40 °C por 30'', e extensão à 72 °C por 1'; e uma fase final de extensão à 72 °C por 5'.

## APÊNDICE C - Testes de padronização dos marcadores moleculares

### C1. Conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação por PCR dos marcadores moleculares ao longo deste trabalho

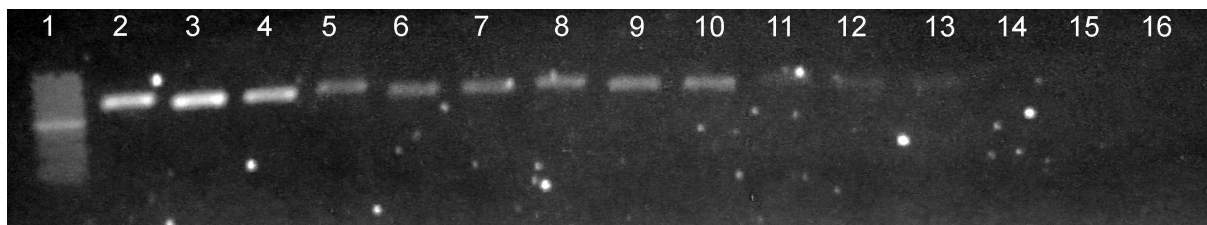
A tabela lista, por ordem de número de reações realizadas, para cada conjunto de primer (#), o marcador molecular (Gene), os oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*) utilizados nas reações, assim como suas sequências (5' > 3') e referência, o número de reações de PCR realizadas (T) e bem sucedidas (A), e a razão entre estes números (A/T), o número de sequenciamentos realizados (S) e o número de sequências aproveitáveis (R), assim como a razão entre estes (R/S) e a razão entre o número de sequências aproveitáveis e o número de reações realizadas (R/T).

#	Gene	Primers	Sequência 5' > 3'	Referência	PCR			Seq.			
					T	A	A/T	S	R	R/S	R/T
1	16S	diplo-rnl-f1	TCGACTGTTTACCAAAAACATAGC	Lavrov <i>et al.</i> (2008)	732	289	0,39	195	163	0,84	0,22
		diplo-rnl-r1	AATTCAACATCGAGGTSGGAAAC	Lavrov <i>et al.</i> (2008)							
2	28S	28SCallyF	TGCGACCCGAAAGATGGTGAACATA	López-Legentil <i>et al.</i> (2011)	204	112	0,55	104	93	0,89	0,46
		28SCallyR	CCAACACCTTTAATGGTATCTGC	López-Legentil <i>et al.</i> (2011)							
3	cox1	COIPlo20F	GCTTTTGCGGGGATGATAGGTAC	Reveillaud <i>et al.</i> (2011)	133	15	0,11	10	8	0,80	0,06
		HCO2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> (1994)							
4	cox1	LCO1490	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> (1994)	79	26	0,33	26	2	0,08	0,03
		HCO2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> (1994)							
5	28S	C'1	ACCCGCTGAATTTAAGCAT	Borchiellini <i>et al.</i> (2004)	78	18	0,23	13	0	0,00	0,00
		RD3r	AGTCTTTCGCCCCTATACCCA	McCormack <i>et al.</i> (2002)							
6	28S	28S.MycB1351F	GTTGCGACCCGAAAGATGGTG	(este trabalho)	53	16	0,30	11	0	0,00	0,00
		28S.MycB2081R	GACTAACCCATGTCCAACCTGCG	(este trabalho)							
7	cox1	Poecilo.cox1.656.674.R	GCAGGATCAAAAAAAGCAG	(este trabalho)	39	2	0,05	2	0	0,00	0,00
		Poecilo.cox1.88.107.F	ATGATAGGGACTGCCTTTAG	(este trabalho)							
8	cox1	dgLCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG	Meyer <i>et al.</i> (2005)	37	23	0,62	22	11	0,50	0,30
		dgHCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAARAAYCA	Meyer <i>et al.</i> (2005)							
9	atp8	trnL.atp8-F	CCAATTGTACTTAAATGCCAC	(este trabalho)	28	0	0,00	-	-	-	-
		ds-atp6-r1	CTACATTAATTTGATCAAAATANGC	D. Lavrov (pers. comm.)							
10	28S	Poecilo.28SX.247.F	CCCCAGGAGCACGTCTGTCTG	(este trabalho)	25	0	0,00	-	-	-	-
		Poecilo.28SX.999.R	CCCTGAGCCTGACGGGGAGCC	(este trabalho)							

11	28S	Por28S-15F Por28S-878R	GCGAGTCACCYGCTGAAT CACTCCTTGGTCCGTGTTTC	Morrow <i>et al.</i> (2012) Morrow <i>et al.</i> (2012)	18	0	0,00	-	-	-	-
12	28S	28S.MycA1431R 28S.MycA683F	CCTCTGGCTTCGCCCTATTC CAAGTACCGTGAGGGAAAGG	(este trabalho) (este trabalho)	18	2	0,11	-	-	-	-
13	28S	C2 D2	GAAAAGAACTTTGRARAGAGAGT TCCGTGTTTCAAGACGGG	Chombard <i>et al.</i> (1998) Chombard <i>et al.</i> (1998)	12	0	0,00	-	-	-	-
14	16S	16S1fw 16SH-mod	TCGACTGTTTACCAAAAACATAGC ATTCAACATCGAGGTC	Watkins e Beckenbach (1999) O. Voigt (pers. comm.)	12	0	0,00	-	-	-	-
15	nad4	diplo-nd4-f1 diplo-nd4-r1	TATTTGARGGNRTATTRATHCCANTG CCATRTGNGCCACHGAAGAATARGC	Lavrov <i>et al.</i> (2008) Lavrov <i>et al.</i> (2008)	12	0	0,00	-	-	-	-
16	18S	18SMycal01F 18SMycal01R	ATAACTGCTCGAACCGTATGGCCT AAACGCTAACATCCACCGATCCCT	Loh <i>et al.</i> (2012) Loh <i>et al.</i> (2012)	10	1	0,10	1	0	0,00	0,00
17	RIM	rnl-F trnl-R	GTACGAAAGGATTGAGTGATAG GTGGCATTTAAGTACAATTGG	(este trabalho) (este trabalho)	9	1	0,11	1	1	1,00	0,11
18	28S	NL2F NL2R	TACCGTGAGGGAAAGGTGAAA CGGAGGGAACAGCTACTAGA	Kober e Nichols (2007) Kober e Nichols (2007)	9	0	0,00	-	-	-	-
19	cox1	diplo-cox1-f1 diplo-cox1-r1	GGTGCWCCRGATATGGCNTTTC GGTACWGAATWATCATNGTWGC	Lavrov <i>et al.</i> (2008) Lavrov <i>et al.</i> (2008)	7	1	0,14	1	0	0,00	0,00
20	cox1	LCO1490 cox1-R1	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA TGTTGRGGGAAAAARGTTAAATT	Folmer <i>et al.</i> (1994) Rot <i>et al.</i> (2006)	7	0	0,00	-	-	-	-
21	cox1	COIPlo20F cox1-R1	GCTTTTGCGGGGATGATAGGTAC TGTTGRGGGAAAAARGTTAAATT	Reveillaud <i>et al.</i> (2011) Rot <i>et al.</i> (2006)	7	0	0,00	-	-	-	-
22	28S	Por28S-1490F Por28S-2170R	AACTCACCTGCCGAATCAAC CCAATCCTTTTCCCAARGTT	Morrow <i>et al.</i> (2012) Morrow <i>et al.</i> (2012)	6	0	0,00	-	-	-	-
23	28S	Por28S-830F Por28S-1520R	CATCCGACCCGTCTTGAA GCTAGTTGATTTCGGCAGGTG	Morrow <i>et al.</i> (2012) Morrow <i>et al.</i> (2012)	6	0	0,00	-	-	-	-
26	18S	18SMycal02F 18SMycal02R	CAACGGGTGACGGAGAATTA TTTCAGCCTTGCGACCATACTC	Loh <i>et al.</i> (2012) Loh <i>et al.</i> (2012)	5	0	0,00	-	-	-	-
27	cytb	diplo-cob-f1m diplo-cob-r1m	ATGTNTNCCTTGRGGWCAAATGTC ATTWGGWATWGANCGYAAWATNGC	Lavrov <i>et al.</i> (2008) Lavrov <i>et al.</i> (2008)	5	0	0,00	-	-	-	-
28	cox2	diplo-cox2-f1m diplo-cox2-r1m	AAGCWATWGGRCATCARTGRTATTG CWATWGGCATAAANGARTGATTNGC	Lavrov <i>et al.</i> (2008) Lavrov <i>et al.</i> (2008)	5	0	0,00	-	-	-	-
<b>Total</b>					<b>1556</b>	<b>506</b>	<b>0,33</b>	<b>386</b>	<b>278</b>	<b>0,72</b>	<b>0,18</b>

## C2. Teste de DNA polimerase para *in vitro*

- Amostras (DNA fita molde ~ 50 ng): Amostras: *Mycale (O.) acerata* (MNRJ 13176), *Mycale (C.) microsigmatosa* (UERJ 184) e *Cinachyra* sp. (ID150);
- *Primers*: diplo-rnl-f1 e diplo-rnl-r1 (LAVROV *et al.*, 2008);
- DNA polimerases: i) GoTaq Green Master Mix (Promega), ii) GoTaq (Promega), iii) GoTaq HotStart (Promega), iv) Tth (Biotools); v) Pfu (não-comercial).
- Reações de PCR:
  - i. Master Mix 1x, *primers* cada 0,14  $\mu$ M, DNA fita molde ~ 50 ng;
  - ii. DNA polimerase 1 U em tampão próprio ( $MgCl_2$  já incluso), dNTP 0,17 mM, *primers* cada 0,12  $\mu$ M;
  - iii. DNA polimerase 1 U em tampão próprio,  $MgCl_2$  1,0 mM, dNTP 0,17 mM, *primers* cada 0,12  $\mu$ M;
  - iv. DNA polimerase 1 U em tampão próprio,  $MgCl_2$  1,7 mM, dNTP 0,11 mM, *primers* cada 0,11  $\mu$ M;
  - v. DNA polimerase 1 U em tampão Biotools,  $MgCl_2$  1,7 mM, dNTP 0,11 mM, *primers* cada 0,11  $\mu$ M;
- Termociclagem: uma fase inicial de desnaturação à 92 °C por 4'; 5 ciclos com desnaturação à 92 °C por 30", pareamento à 44 °C por 45", e extensão à 72 °C por 1'; 35 ciclos de desnaturação à 92 °C por 30", pareamento à 51 °C por 45", e extensão à 72 °C por 1'; e uma fase final de extensão à 72 °C por 6'.



Visualização em gel de agarose 1,0 % da amplificação da região 16S das espécies *Mycale (O.) acerata* (2, 5, 8, 11 e 14), *Mycale (C.) microsigmatosa* (3, 6, 9, 12 e 15) e *Cinachyra* sp. (4, 7, 10, 13 e 16) a partir de diferentes enzimas DNA polimerase. Raias: (1) marcador de tamanho de fragmento Gene Ruler® 100pb DNA ladder (Fermentas); (2-4) GoTaq Green Master Mix (Promega); (5-7) GoTaq (Promega); (8-10) GoTaq HotStart (Promega); (11-13) Tth (Biotools); (14-16) Pfu (não-comercial).

## APÊNDICE D - Sequências de bancos de dados públicos na Internet utilizadas neste trabalho

A tabela indica o grupo (G) de Desmospongiae, a Ordem (O) e a Espécie a que as sequências pertencem, seguidos pelo número de acesso em bancos de dados públicos na Internet dos marcadores moleculares em questão (16S, 28S e cox1), sendo a maioria proveniente do NCBI. Além disso, para as amostras de Poecilosclerida estão indicadas a Subordem (Sub) e Família (Fam). As ordens estão abreviadas pelas três primeiras letras e as subordens pelas quatro primeiras letras do nome do táxon.

G	O	Sub	Fam	Espécie	16S	28S	cox1
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) adhaerens</i>	-	GU324501	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) carmigropila</i>	-	GU324497	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) rotalis</i>	-	HQ379296	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Aegogropila) sullevoidea</i>	-	GU324503	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Anomomycale) titubans</i>	-	HQ379297	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) laxissima</i>	-	GU324494	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) laxissima</i>	-	GU324495	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) laxissima</i>	-	GU324496	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Arenochalina) mirabilis</i>	-	HE611633	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) fistulifera</i>	-	GU324499	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Carmia) microsigmatosa</i>	-	GU324500	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) grandis</i>	-	GU324506	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	GU324492	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	GU324493	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709325	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709326	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709327	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709328	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709329	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709330	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709331	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709332	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709333	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709334	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709335	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709336	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709337	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) laevis</i>	-	HQ709338	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Mycale) lingua</i>	-	GU324505	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) flagellifera</i>	-	AY319321	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Naviculina) flagellifera</i>	-	-	AY625664
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale (Zygomycale) parishii</i>	-	GU324502	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale fibrexilis</i>	-	JN162064	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale fibrexilis</i>	-	AY026376	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale fibrexilis</i>	-	-	AJ843890
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale sp.</i>	-	GU324498	-
G4	Poe	Myca	Mycalidae	<i>Mycale sp.</i>	-	GU324504	-
G4	Poe	Myca	Cladorhizidae	<i>Chondrocladia sp</i>	-	HE611631	-
G4	Poe	Myca	Cladorhizidae	<i>Cladorhiza cf. gelida</i>	-	HE611629	-
G4	Poe	Myca	Desmacellidae	<i>Biemna fistulosa</i>	-	-	AM076982
G4	Poe	Myca	Desmacellidae	<i>Biemna saucia</i>	-	-	JF773146

G4	Poe	Myca	Desmacellidae	<i>Biemna variantia</i>	-	HQ379292	-
G4	Poe	Myca	Desmacellidae	<i>Desmacella cf. annexa</i>	-	HQ379293	-
G4	Poe	Myca	Desmacellidae	<i>Neofibularia hartmani</i>	-	-	JQ034574
G4	Poe	Myca	Desmacellidae	<i>Neofibularia hartmani</i>	-	-	JF773145
G4	Poe	Myca	Desmacellidae	<i>Neofibularia hartmani</i>	-	-	JQ034575
G4	Poe	Myca	Desmacellidae	<i>Neofibularia irata</i>	-	-	JQ034576
G4	Poe	Myca	Desmacellidae	<i>Neofibularia nolitangere</i>	-	-	EF519653
G4	Poe	Myca	Desmacellidae	<i>Sigmaxinella hipposiderus</i>	-	-	JF773147
G4	Poe	Myca	Esperiopsidae	<i>Amphilectus fucorum</i>	-	HQ379294	-
G4	Poe	Myca	Isodictyidae	<i>Coelocarteria singaporensis</i>	-	AY561874	-
G4	Poe	Myca	Isodictyidae	<i>Coelocarteria sp.</i>	-	AY561875	-
G4	Poe	Myca	Podospongiidae	<i>Diacarnus spinipoculum</i>	-	AY561881	-
G4	Poe	Myca	Podospongiidae	<i>Negombata magnifica</i>	AM420314	-	-
G4	Poe	Myca	Podospongiidae	<i>Negombata magnifica</i>	-	-	-
G4	Poe	Micr		<i>Antho involvens</i>	-	HQ379291	-
G4	Poe	Micr		<i>Artemisina melana</i>	-	-	EF519576
G4	Poe	Micr		<i>Axechina raspailioides</i>	-	DQ299260	-
G4	Poe	Micr		<i>Axechina raspailioides</i>	-	-	JQ034545
G4	Poe	Micr		<i>Clathria kylista</i>	-	EF646844	-
G4	Poe	Micr		<i>Clathria kylista</i>	-	-	SBD1049
G4	Poe	Micr		<i>Clathria oxeota</i>	-	-	EF519605
G4	Poe	Micr		<i>Clathria prolifera</i>	-	-	AJ843888
G4	Poe	Micr		<i>Clathria prolifera</i>	AF362005	-	-
G4	Poe	Micr		<i>Clathria schoenus</i>	-	-	EF519607
G4	Poe	Micr		<i>Echinodictyum mesenterinum</i>	-	-	JQ034557
G4	Poe	Micr		<i>Ectyoplasia ferox</i>	EU237480	-	-
G4	Poe	Micr		<i>Ectyoplasia ferox</i>	-	-	-
G4	Poe	Micr		<i>Endectyon delaubenfelsi</i>	-	HQ379269	-
G4	Poe	Micr		<i>Endectyon fruticosum</i>	-	-	JQ034559
G4	Poe	Micr		<i>Eurypon cf. clavatum</i>	-	-	AJ843893
G4	Poe	Micr		<i>Eurypon clavigerum</i>	-	HQ379272	-
G4	Poe	Micr		<i>Holopsamma helwigi</i>	-	-	EF519628
G4	Poe	Micr		<i>Hymenaphia verticillata</i>	-	HQ379276	-
G4	Poe	Micr		<i>Microcionia prolifera</i>	AF362005	-	-
G4	Poe	Micr		<i>Pandaros acanthifolium</i>	-	-	EF519662
G4	Poe	Micr		<i>Raspaciona aculeata</i>	-	HQ379278	-
G4	Poe	Micr		<i>Raspailia elegans</i>	-	-	JQ034542
G4	Poe	Micr		<i>Raspailia ramosa</i>	-	HQ379281	-
G4	Poe	Micr		<i>Thrinacophora cervicornis</i>	-	-	JQ034585
G4	Poe	Myxi		<i>Crambe crambe</i>	-	AY561883	-
G4	Poe	Myxi		<i>Crella rosea</i>	-	HQ379299	-
G4	Poe	Myxi		<i>Desmapsamma anchorata</i>	-	GU324491	-
G4	Poe	Myxi		<i>Desmapsamma anchorata</i>	-	-	JX228946
G4	Poe	Myxi		<i>Hemimyscale columella</i>	-	HQ379300	-
G4	Poe	Myxi		<i>Hymedesmia pansa</i>	-	HQ379301	-
G4	Poe	Myxi		<i>Iotrochota birotulata</i>	EU237486	-	-
G4	Poe	Myxi		<i>Iotrochota birotulata</i>	-	AY561884	-
G4	Poe	Myxi		<i>Iotrochota birotulata</i>	-	-	-
G4	Poe	Myxi		<i>Lissodendoryx jenjonesae</i>	-	HQ379298	-
G4	Poe	Myxi		<i>Lissodendoryx sigmata</i>	-	-	EF519643
G4	Poe	Myxi		<i>Monanchora arbuscula</i>	-	-	EF519647
G4	Poe	Myxi		<i>Monanchora clathrata</i>	-	HE611641	-
G4	Poe	Myxi		<i>Myxilla cf. rosacea</i>	-	HQ379305	-

G4	Poe	Myxi	<i>Phorbas dives</i>	-	HQ379303	-
G4	Poe	Myxi	<i>Phorbas fictitius</i>	-	-	GQ273491
G4	Poe	Myxi	<i>Plocamionida microcionides</i>	-	FR687245	-
G4	Poe	Myxi	<i>Strongylacidon bermudae</i>	-	-	AJ843889
G4	Poe	Myxi	<i>Tedania ignis</i>	-	-	EF519689
G4	Hal		<i>Acanthella acuta</i>	-	HQ379259	-
G4	Spo		<i>Ephydatia muelleri</i>	EU237481	-	-
G4	Spo		<i>Eunapius subterraneus</i>	GU086203	-	-
G4	Hal		<i>Halichondria panicea</i>	-	AY319315	-
G4	Hal		<i>Halichondria sp</i>	AF362003	-	-
G4	Hal		<i>Hymeniacidon perlevis</i>	-	AY319317	-
G4	Spo		<i>Lubomirskia baicalensis</i>	GU385217	-	-
G4	Hal		<i>Myrmekioderma granulata</i>	-	AY319319	-
G4	Hal		<i>Ptilocaulis sp.</i>	-	DQ299252	-
G4	Hal		<i>Ptilocaulis walpersi</i>	EU237488	-	-
G4	Hal		<i>Ptilocaulis walpersi</i>	-	-	NC010209
G4	Hal		<i>Scopalina lophyropoda</i>	-	HQ379268	-
G4	Hal		<i>Svenzea devoogdae</i>	-	AY618726	-
G4	Hal		<i>Topsentia halichondroides</i>	-	AY618727	-
G4	Hal		<i>Topsentia ophiraphidites</i>	EU237482	-	-
G4	Hal		<i>Topsentia ophiraphidites</i>	-	-	NC010204
G4	Had		<i>Cliona sp</i>	AF362004	-	-
G4	Had		<i>Diplastrella megastellata</i>	-	AY561893	-
G4	Had		<i>Hemiastrella sp.</i>	-	AY561947	-
G4	Had		<i>Pione sp.</i>	-	AY626280	-
G4	Had		<i>Placospongia sp.</i>	-	AY626299	-
G4	Had		<i>Polymastia penicillus</i>	-	HQ393899	-
G4	Had		<i>Prosuberites longispinus</i>	-	HQ379320	-
G4	Had		<i>Sollasella moretonensis</i>	-	EF507834	-
G4	Had		<i>Sphecospongia peleia</i>	-	AY626287	-
G4	Had		<i>Spirastrella aff. inconstans</i>	-	AY626296	-
G4	Had		<i>Stelligera rigida</i>	-	HQ379285	-
G4	Had		<i>Suberites domuncula</i>	AM690374	-	-
G4	Had		<i>Suberites domuncula</i>	-	AJ620113	-
G4	Had		<i>Suberites domuncula</i>	-	-	NC010496
G4	Had		<i>Tethya actinia</i>	AY320033	-	-
G4	Had		<i>Tethya actinia</i>	-	-	NC006991
G4	Had		<i>Tethya citrina</i>	-	HQ379312	-
G4	Had		<i>Tethya sp.</i>	-	AY626300	-
G4	Had		<i>Tethytimea stellagrandis</i>	-	AY561920	-
G4	Ast		<i>Geodia neptuni</i>	AY320032	-	-
G4	Ast		<i>Pachymatisma johnstonia</i>	-	HQ379258	-
G4	Ast		<i>Stelletta grubii</i>	-	HQ379255	-
G4	Ast		<i>Stryphnus ponderosus</i>	-	HQ379257	-
G4	Spi		<i>Aciculites sp.</i>	-	AY561945	-
G4	Spi		<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	EU237479	-	-
G4	Spi		<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	-	-	NC010198
G4	Spi		<i>Cinachyrella sp.</i>	-	AY561943	-
G4	Spi		<i>Tetilla arb</i>	-	AY561944	-
G4	Spi		<i>Tetilla sp</i>	AF035265	-	-
G4	Age		<i>Agelas nakamurai</i>	-	AY618704	-
G4	Age		<i>Agelas schmidti</i>	EU237475	-	-
G4	Age		<i>Agelas schmidti</i>	-	-	NC010213



G4	Age	<i>Astrosclera willeyana</i>	-	AY561928	-
G3	Hap	<i>Aka coralliphaga</i>	-	AF441345	-
G3	Hap	<i>Amphimedo compressa</i>	EU237474	-	-
G3	Hap	<i>Amphimedo compressa</i>	-	-	NC010201
G3	Hap	<i>Amphimedo compressa</i>	-	AF441351	-
G3	Hap	<i>Callyspongia plicifera</i>	EU237477	-	-
G3	Hap	<i>Callyspongia plicifera</i>	-	AF441343	-
G3	Hap	<i>Callyspongia plicifera</i>	-	-	NC010206
G3	Hap	<i>Chalinula hooperi</i>	-	JN178956	-
G3	Hap	<i>Haliclona walentinae</i>	-	JN178946	-
G4	Spo	<i>Nudospongilla sp.</i>	-	JN178982	-
G3	Hap	<i>Oceanapia sp.</i>	-	AY561857	-
G3	Hap	<i>Petrosia hoeksemai</i>	-	JN178961	-
G4	Spo	<i>Spongilla lacustris</i>	-	HQ379327	-
G3	Hap	<i>Xestospongia muta</i>	EU237490	-	-
G3	Hap	<i>Xestospongia muta</i>	-	-	NC010211
G3	Hap	<i>Xestospongia subtriangularis</i>	-	AF441341	-
G2	Ver	<i>Aplysina aerophoba</i>	-	HQ379253	-
G2	Ver	<i>Aplysina fulva</i>	NC010203	-	-
G2	Ver	<i>Aplysina fulva</i>	-	-	NC010203
G2	Ver	<i>Aplysinella rhax</i>	-	JQ082657	-
G2	Ver	<i>Porphyria flintae</i>	-	JQ082757	-
G2	Cho	<i>Chondrilla aff nucula</i>	EU237478	-	-
G2	Cho	<i>Chondrosia sp.</i>	-	AJ005916	-
G2	Cho	<i>Halisarca dujardini</i>	EU237483	-	-
G1	Dic	<i>Hippospongia ammata</i>	-	JQ082721	-
G1	Dic	<i>Hippospongia lachne</i>	NC010215	-	-
G1	Dic	<i>Hippospongia lachne</i>	-	-	NC010215
G1	Dic	<i>Ircinia ramosa</i>	-	JQ082735	-
G1	Dic	<i>Ircinia strobilina</i>	GQ337013	-	-
G1	Dic	<i>Ircinia strobilina</i>	-	-	GQ337013
G1	Dic	<i>Vaceletia sp</i>	NC010218	-	-
G1	Den	<i>Darwinella rosacea</i>	-	JQ082688	-
G1	Den	<i>Igernella notabilis</i>	EU237485	-	-
G1	Den	<i>Igernella notabilis</i>	-	JQ082732	-
G1	Den	<i>Igernella notabilis</i>	-	-	EU237485

## APÊNDICE E - Estimativa de modelos de substituição de nucleotídeos

### E1. Sumário dos alinhamentos

Alinhamento	# Sequências	# pb (Total)	# pb (Informativos)	# pb (Mutações únicas)
16S (supra)	78	454	222	57
16S (sub)	91	462	153	24
28S (supra)	125	336	73	17
28S (sub)	69	322	13	47
cox1	69	559	289	24
cox1 (1 <sup>a</sup> )	69	187	78	16
cox1 (2 <sup>a</sup> )	69	186	32	7
cox1 (3 <sup>a</sup> )	69	186	179	1

### E2. Estimativa de modelo de substituição do alinhamento 16S-Supra

Modelo	# Par,	BIC	AICc	<i>lnL</i>	(+I)	(+G)	R
GTR+G	162	14388,46	13028,22	-6351,31	n/a	0,44	2,24
GTR+G+I	163	14397,81	13029,18	-6350,78	0,08	0,51	2,23
T92+G	156	14399,37	13089,45	-6387,98	n/a	0,43	2,29
TN93+G	159	14403,85	13068,77	-6374,61	n/a	0,43	2,28
T92+G+I	157	14409,06	13090,76	-6387,63	0,06	0,49	2,29
HKY+G	158	14411,81	13085,12	-6383,8	n/a	0,43	2,33
TN93+G+I	160	14413,86	13070,39	-6374,41	0,06	0,49	2,27
HKY+G+I	159	14421,25	13086,17	-6383,31	0,08	0,51	2,32
K2+G	155	14466,25	13164,72	-6426,62	n/a	0,44	2,26
K2+G+I	156	14475,41	13165,49	-6426	0,08	0,52	2,25
GTR+I	162	14902,15	13541,91	-6608,15	0,34	n/a	1,99
T92+I	156	14926,99	13617,08	-6651,79	0,34	n/a	1,98
HKY+I	158	14938,26	13611,57	-6647,02	0,34	n/a	2,03
TN93+I	159	14943,06	13607,99	-6644,22	0,34	n/a	2,01
K2+I	155	14973,03	13671,5	-6680,02	0,34	n/a	1,99
JC+G	154	15025,25	13732,11	-6711,33	n/a	0,47	0,5
JC+G+I	155	15033,48	13731,95	-6710,24	0,1	0,59	0,5
JC+I	154	15495,47	14202,33	-6946,44	0,34	n/a	0,5
GTR	161	15553,76	14201,91	-6939,16	n/a	n/a	1,89
T92	155	15571,24	14269,71	-6979,12	n/a	n/a	1,89
TN93	158	15582,09	14255,4	-6968,94	n/a	n/a	1,89
HKY	157	15593,42	14275,12	-6979,81	n/a	n/a	1,89
K2	154	15627,1	14333,95	-7012,25	n/a	n/a	1,89
JC	153	16134,51	14849,76	-7271,16	n/a	n/a	0,5

## E3. Estimativa de modelo de substituição do alinhamento 16S-Sub

Modelo	# Par,	BIC	AICc	<i>lnL</i>	(+I)	(+G)	R
T92+G	182	6778,204	5206,146	-2420,28	n/a	0,32	1,64
K2+G	181	6784,184	5220,755	-2428,59	n/a	0,32	1,59
T92+G+I	183	6786,998	5206,312	-2419,35	0,31	0,63	1,65
HKY+G	184	6787,529	5198,213	-2414,29	n/a	0,32	1,6
K2+G+I	182	6793,095	5221,037	-2427,72	0,31	0,67	1,6
TN93+G	185	6795,55	5197,605	-2412,98	n/a	0,31	1,59
HKY+G+I	185	6796,02	5198,076	-2413,22	0,33	0,69	1,61
TN93+G+I	186	6804,647	5198,074	-2412,21	0,3	0,63	1,6
T92+I	182	6807,013	5234,955	-2434,68	0,57	n/a	1,54
K2+I	181	6811,077	5247,648	-2442,04	0,57	n/a	1,51
HKY+I	184	6813,409	5224,093	-2427,23	0,57	n/a	1,53
GTR+G	188	6819,308	5195,478	-2408,89	n/a	0,32	1,6
TN93+I	185	6823,572	5225,628	-2426,99	0,57	n/a	1,53
GTR+G+I	189	6828,073	5195,615	-2407,95	0,32	0,69	1,61
GTR+I	188	6845,027	5221,197	-2421,75	0,57	n/a	1,53
JC+G	180	6866,643	5311,843	-2475,14	n/a	0,34	0,5
JC+G+I	181	6876,114	5312,685	-2474,56	0,34	0,78	0,5
JC+I	180	6888,24	5333,44	-2485,94	0,57	n/a	0,5
K2	180	7012,205	5457,405	-2547,92	n/a	n/a	1,39
T92	181	7014,124	5450,695	-2543,56	n/a	n/a	1,4
HKY	183	7020,208	5439,521	-2535,96	n/a	n/a	1,38
TN93	184	7030,813	5441,498	-2535,94	n/a	n/a	1,38
GTR	187	7046,396	5431,195	-2527,76	n/a	n/a	1,38
JC	179	7087,155	5540,985	-2590,72	n/a	n/a	0,5

## E4. Estimativa de modelo de substituição do alinhamento 28S-Supra

Modelo	# Par,	BIC	AICc	<i>lnL</i>	(+I)	(+G)	R
K2+G+I	250	7291,955	5133,605	-2315,3	0,58	0,34	2,61
T92+G+I	251	7302,583	5135,611	-2315,29	0,58	0,34	2,61
TN93+G+I	254	7324,387	5131,553	-2310,23	0,59	0,38	2,57
K2+G	249	7330,929	5181,2	-2340,11	n/a	0,15	2,6
HKY+G+I	253	7331,504	5147,29	-2319,11	0,57	0,34	2,79
T92+G	250	7338,29	5179,94	-2338,47	n/a	0,15	2,56
GTR+G+I	257	7349,373	5130,676	-2306,75	0,58	0,39	2,55
TN93+G	253	7362,227	5178,013	-2334,47	n/a	0,16	2,54
HKY+G	252	7371,427	5195,834	-2344,39	n/a	0,15	2,76
GTR+G	256	7385,087	5175,01	-2329,93	n/a	0,16	2,54
JC+G+I	249	7471,1	5321,371	-2410,2	0,58	0,39	0,5
JC+G	248	7507,256	5366,149	-2433,6	n/a	0,16	0,5
TN93+I	253	7534,317	5350,103	-2420,51	0,72	n/a	2,21
GTR+I	256	7555,331	5345,255	-2415,05	0,73	n/a	2,19
K2	248	8097,91	5956,803	-2728,92	n/a	n/a	2,12
TN93	252	8098,385	5922,792	-2707,87	n/a	n/a	2,13
T92	249	8108,2	5958,471	-2728,75	n/a	n/a	2,12
K2+I	249	8108,548	5958,819	-2728,92	0	n/a	2,12
T92+I	250	8118,837	5960,487	-2728,74	0	n/a	2,12
GTR	255	8123,373	5921,917	-2704,4	n/a	n/a	2,13

HKY	251	8142,477	5975,506	-2735,24	n/a	n/a	2,11
HKY+I	252	8153,115	5977,522	-2735,23	0	n/a	2,11
JC	247	8261,247	6128,762	-2815,91	n/a	n/a	0,5
JC+I	248	8271,885	6130,777	-2815,91	0	n/a	0,5

### E5. Estimativa de modelo de substituição do alinhamento 28S-Sub

Modelo	# Par,	BIC	AICc	<i>lnL</i>	(+I)	(+G)	R
K2+G	137	3046,794	1951,32	-837,804	n/a	0,11	2,63
K2+G+I	138	3051,832	1948,375	-835,319	0,62	0,33	2,83
T92+G	138	3056,316	1952,859	-837,561	n/a	0,11	2,63
T92+I	138	3058,905	1955,448	-838,855	0,75	n/a	2,53
T92+G+I	139	3061,324	1949,884	-835,06	0,61	0,33	2,84
JC+G	136	3062,032	1974,542	-850,427	n/a	0,13	0,5
JC+G+I	137	3067,351	1971,877	-848,082	0,62	0,3	0,5
K2+I	137	3073,603	1978,129	-851,208	0,39	n/a	1,57
HKY+G	140	3075,286	1955,862	-837,037	n/a	0,11	2,71
HKY+I	140	3077,56	1958,136	-838,174	0,75	n/a	2,74
TN93+G	141	3079,223	1951,816	-834,001	n/a	0,14	2,4
HKY+G+I	141	3080,307	1952,9	-834,543	0,62	0,34	2,95
K2	136	3082,761	1995,271	-860,792	n/a	n/a	1,48
TN93+I	141	3082,999	1955,592	-835,889	0,73	n/a	2,18
TN93+G+I	142	3085,228	1949,838	-831,999	0,57	0,34	2,74
T92	137	3092,219	1996,745	-860,516	n/a	n/a	1,48
JC	135	3094,049	2014,543	-871,44	n/a	n/a	0,5
JC+I	136	3104,076	2016,586	-871,449	0	n/a	0,5
GTR+G	144	3104,484	1953,129	-831,619	n/a	0,1	3,07
GTR+I	144	3108,771	1957,416	-833,762	0,75	n/a	2,72
GTR+G+I	145	3109,823	1950,486	-829,284	0,61	0,29	3,06
HKY	139	3111,795	2000,355	-860,296	n/a	n/a	1,48
TN93	140	3112,359	1992,935	-855,574	n/a	n/a	1,49
GTR	143	3140,349	1996,977	-854,556	n/a	n/a	1,48

### E6. Estimativa de modelo de substituição do alinhamento cox1

Modelo	# Par,	BIC	AICc	<i>lnL</i>	(+I)	(+G)	R
T92+G+I	139	22249,614	21063,79	-10392,377	0,31	0,46	1,72
HKY+G+I	141	22249,78	21046,908	-10381,922	0,28	0,41	1,41
HKY+G	140	22250,106	21055,758	-10387,354	n/a	0,24	1,87
T92+G	138	22280,622	21103,321	-10413,151	n/a	0,25	1,77
TN93+G+I	142	22283,436	21072,042	-10393,481	0,27	0,41	1,36
TN93+G	141	22307,349	21104,478	-10410,707	n/a	0,26	1,38
GTR+G+I	145	22347,733	21110,769	-10409,821	0,28	0,44	1,12
GTR+G	144	22376,492	21148,051	-10429,47	n/a	0,27	1,12
K2+G+I	138	22488,746	21311,446	-10517,213	0,33	0,53	1,38
K2+G	137	22535,081	21366,305	-10545,65	n/a	0,27	1,4
JC+G+I	137	22858,788	21690,012	-10707,503	0,35	0,61	0,5
JC+G	136	22915,182	21754,929	-10740,969	n/a	0,29	0,5
GTR+I	144	23726,732	22498,29	-11104,59	0,44	n/a	1,25

HKY+I	140	23742,75	22548,402	-11133,676	0,44	n/a	1,24
T92+I	138	23750,626	22573,325	-11148,153	0,44	n/a	1,2
TN93+I	141	23767,891	22565,02	-11140,977	0,44	n/a	1,06
K2+I	137	23837,587	22668,811	-11196,903	0,44	n/a	1,13
JC+I	136	24136,524	22976,271	-11351,64	0,44	n/a	0,5
GTR	143	26229,441	25009,523	-12361,214	n/a	n/a	1,11
TN93	140	26282,492	25088,144	-12403,547	n/a	n/a	1,1
HKY	139	26298,117	25112,292	-12416,629	n/a	n/a	1,1
T92	137	26302,33	25133,554	-12429,274	n/a	n/a	1,09
K2	136	26321,086	25160,834	-12443,921	n/a	n/a	1,26
JC	135	26590,809	25439,081	-12584,052	n/a	n/a	0,5

### E7. Estimativa de modelo de substituição do alinhamento cox1 (1ª posição)

Modelo	# Par,	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R
K2+G	137	5173,156	4156,411	-1939,692	n/a	0,32	1,57
T92+G	138	5181,542	4157,398	-1939,163	n/a	0,31	1,67
K2+G+I	138	5182,599	4158,455	-1939,691	0	0,32	1,57
T92+G+I	139	5190,986	4159,443	-1939,163	0	0,31	1,67
GTR+G	144	5196,595	4128,063	-1918,359	n/a	0,35	1,32
GTR+G+I	145	5199,562	4123,634	-1915,121	0,4	1,3	1,31
K2+I	137	5223,822	4207,077	-1965,025	0,5	n/a	1,49
TN93+G	141	5234,382	4188,042	-1951,417	n/a	0,36	1,94
TN93+G+I	142	5235,418	4181,681	-1947,214	0,4	1,25	1,98
T92+I	138	5239,826	4215,682	-1968,305	0,49	n/a	1,53
GTR+I	144	5240,761	4172,229	-1940,442	0,48	n/a	1,59
JC+G	136	5254,564	4245,219	-1985,118	n/a	0,33	0,5
JC+G+I	137	5264,008	4247,264	-1985,118	0	0,33	0,5
TN93+I	141	5279,489	4233,15	-1973,971	0,49	n/a	1,69
HKY+G	140	5287,271	4248,33	-1982,584	n/a	0,3	1,91
HKY+G+I	141	5296,715	4250,376	-1982,584	0	0,3	1,91
JC+I	136	5301,134	4291,789	-2008,403	0,5	n/a	0,5
HKY+I	140	5350,295	4311,354	-2014,096	0,5	n/a	1,61
K2	136	5480,843	4471,498	-2098,257	n/a	n/a	1,39
T92	137	5504,919	4488,175	-2105,574	n/a	n/a	1,39
GTR	143	5525,043	4463,909	-2087,305	n/a	n/a	1,46
TN93	140	5547,578	4508,637	-2112,737	n/a	n/a	1,45
JC	135	5553,321	4551,376	-2139,218	n/a	n/a	0,5
HKY	139	5623,662	4592,12	-2155,501	n/a	n/a	1,39

### E8. Estimativa de modelo de substituição do alinhamento cox1 (2ª posição)

Modelo	# Par,	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R
GTR+G	144	2699,165	1631,441	-670,039	n/a	0,16	0,74
JC+G	136	2708,36	1699,776	-712,388	n/a	0,1	0,5
HKY+G	140	2708,595	1670,439	-693,63	n/a	0,09	0,65
GTR+G+I	145	2708,603	1633,488	-670,039	0	0,16	0,74
TN93+G	141	2715,252	1669,703	-692,239	n/a	0,09	0,66
K2+G	137	2715,846	1699,869	-711,412	n/a	0,1	0,71
JC+G+I	137	2717,752	1701,775	-712,365	0	0,09	0,5

HKY+G+I	141	2718,031	1672,482	-693,628	0	0,09	0,65
TN93+G+I	142	2724,69	1671,749	-692,239	0	0,09	0,66
K2+G+I	138	2726,875	1703,504	-712,207	0	0,1	0,71
T92+G	138	2731,081	1707,71	-714,311	n/a	0,1	0,66
T92+G+I	139	2740,484	1709,72	-714,293	0	0,1	0,66
GTR	143	2743,36	1683,028	-696,855	n/a	n/a	0,68
GTR+I	144	2752,798	1685,073	-696,855	0	n/a	0,68
HKY	139	2766,232	1735,468	-727,167	n/a	n/a	0,68
JC	135	2771,481	1770,292	-748,668	n/a	n/a	0,5
TN93	140	2773,629	1735,473	-726,147	n/a	n/a	0,68
HKY+I	140	2775,661	1737,505	-727,163	0	n/a	0,68
K2	136	2779,299	1770,716	-747,858	n/a	n/a	0,68
JC+I	136	2780,919	1772,335	-748,668	0	n/a	0,5
TN93+I	141	2783,066	1737,518	-726,146	0	n/a	0,68
K2+I	137	2788,737	1772,76	-747,858	0	n/a	0,68
T92	137	2790,133	1774,156	-748,556	n/a	n/a	0,68
T92+I	138	2799,57	1776,2	-748,555	0	n/a	0,68

### E9. Estimativa de modelo de substituição do alinhamento cox1 (3ª posição)

Modelo	# Par,	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R
TN93+G+I	142	15752,747	14699,807	-7206,268	0,03	1,27	2,52
TN93+G	141	15754,205	14708,656	-7211,715	n/a	0,85	2,66
T92+G+I	139	15780,92	14750,157	-7234,511	0,03	1,39	1,99
T92+G	138	15792,163	14768,792	-7244,852	n/a	0,85	2,02
HKY+G+I	141	15810,197	14764,648	-7239,711	0,03	1,34	2,19
HKY+G	140	15820,891	14782,734	-7249,777	n/a	0,84	2,21
GTR+G+I	145	15905,956	14830,84	-7268,715	0,03	1,62	1,3
GTR+G	144	15913,945	14846,221	-7277,429	n/a	1,17	1,28
K2+G	137	16127,062	15111,085	-7417,02	n/a	1,02	1,95
K2+G+I	138	16129,127	15105,757	-7413,334	0,03	1,34	1,97
TN93+I	141	16297,486	15251,937	-7483,356	0,03	n/a	1,51
T92+I	138	16330,869	15307,499	-7514,205	0,03	n/a	1,38
JC+G+I	137	16355,965	15339,988	-7531,472	0,03	1,72	0,5
JC+G	136	16357,255	15348,672	-7536,836	n/a	1,34	0,5
HKY+I	140	16363,432	15325,276	-7521,048	0,03	n/a	1,44
GTR+I	144	16380,238	15312,514	-7510,575	0,03	n/a	1,02
TN93	140	16440,74	15402,584	-7559,702	n/a	n/a	1,46
GTR	143	16509,376	15449,043	-7579,863	n/a	n/a	0,97
T92	137	16516,227	15500,25	-7611,603	n/a	n/a	1,29
HKY	139	16533,442	15502,678	-7610,772	n/a	n/a	1,35
K2+I	137	16725,749	15709,772	-7716,364	0,03	n/a	1,77
K2	136	16835,889	15827,306	-7776,153	n/a	n/a	1,77
JC+I	136	16851,811	15843,228	-7784,114	0,03	n/a	0,5
JC	135	16956,883	15955,693	-7841,369	n/a	n/a	0,5

**APÊNDICE F** - Dados morfológicos de *Mycale* Gray, 1867 revisados da literatura e referências utilizadas por espécie

---

**F1. Descritores morfológicos tentativamente tabulados da literatura**

Morfologia externa

1. Forma de crescimento: encrustante; lobada; tubular; ereta ramificada; maciça
2. Superfície: hispida; lisa; conulosa; fistulosa; sulcada; rugosa; espinada; poros sulcados
3. Consistência: frágil; macia; compressível; firme; resiliente
4. Coloração: azul; laranja; roxo; amarelo; vermelho; verde; rosa; bege; marrom; branco
5. Canais subectossomais: não-visível; visível
6. Exudação de muco: ausente; presente

Morfologia interna

Organização do esqueleto

7. Esqueleto ectossomal: não-especializado; especialização tangencial reticulada; confuso.
8. Composição: <tipos de espículas>
9. Diâmetro da seção transversal do feixe de espículas [não-aplicável a: não-especializado e confuso]: <numérico>
10. Número de espículas por seção transversal do feixe de espículas [não-aplicável a: não-especializado e confuso]: <numérico>
11. Arranjo das malhas [não-aplicável a: não-especializado e confuso]: triangular, quadrangular/retangular, poligonal
12. Diâmetro das malhas [não-aplicável a: não-especializado e confuso]: <numérico>
13. Poros por malha [não-aplicável a: não-especializado e confuso]: <numérico>
14. Esqueleto coanossomal: plumoso; plumoreticulado; reticulado
15. Composição: <tipos de espículas>
16. Fibras de espongina: pouco expressiva, muito expressiva, cerne com material externo
17. Tratos: multispiculares, paucispiculares
18. Diâmetro da seção transversal do feixe de espículas: <numérico>
19. Número de espículas por seção transversal do feixe de espículas: <numérico>
20. Arranjo das malhas [não-aplicável a: plumoso e plumoreticulado]: triangular, quadrangular/retangular, poligonal
21. Diâmetro das malhas [não-aplicável a: plumoso e plumoreticulado]: <numérico>

Elementos do esqueleto

### Megascleras

22. Subtilóstilos: ausente, uma categoria, duas categorias, três categorias
23. Subtilóstilo I [não-aplicável a: ausente]: robusto, delgado
24. Lúmen: visível, não-visível
25. Curvatura: reto, ligeiramente curvado, curvado
26. Protuberância da cabeça: bem demarcada, ligeiramente demarcada, não demarcada
27. Extremidade final: pontiaguda em "V", pontiaguda em "Y", arredondada
28. Comprimento total: <numérico>
29. Largura máxima: <numérico>
30. Largura da cabeça: <numérico>
31. Distribuição: coanossomo, ectossomo
32. Ocorrência: comum, incomum, raro
33. Subtilóstilo II [não-aplicável a: ausente e uma categoria]: robusto, delgado
- 34 - 42. idem a 24 - 32
43. Subtilóstilo III [não-aplicável a: ausente, uma categoria e duas categorias]: robusto, delgado
- 44 - 52. idem a 24 - 32
53. Óxeas: ausente, presente
44. Lúmen [não-aplicável a: ausente]: visível, não-visível
55. Curvatura [não-aplicável a: ausente]: reto, ligeiramente curvado, curvado
56. Extremidade [não-aplicável a: ausente]: pontiaguda em "V", pontiaguda em "Y", arredondada
57. Comprimento total [não-aplicável a: ausente]: <numérico>
58. Largura máxima [não-aplicável a: ausente]: <numérico>
59. Distribuição [não-aplicável a: ausente]: coanossomo, ectossomo
60. Ocorrência [não-aplicável a: ausente]: comum, incomum, raro

### Microscleras

61. Anisoquelas: ausente, uma categoria, duas categorias, três categorias
62. Anisoquela I [não-aplicável a: ausente]: A, B, C, D ("curvoquela"), naviculiquela, anomoquela, quela unguiferada
63. Cabeça (%): <numérico>
64. Ângulo de curvatura da cabeça: <numérico>
65. Ângulo de abertura da ala frontal da cabeça: <numérico>
66. Ângulo de abertura entre as alas laterais da cabeça: <numérico>
67. Ângulo de abertura entre as alas frontal e lateral da cabeça: <numérico>



68. Pé (%): <numérico>
69. Ângulo de curvatura do pé: <numérico>
70. Ângulo de abertura da ala frontal do pé: <numérico>
71. Ângulo de abertura entre as alas laterais do pé: <numérico>
72. Curvatura do eixo: : <numérico>
73. Comprimento total: <numérico>
74. Distribuição: coanossomo, ectossomo
75. Ocorrência: comum, incomum, raro
76. Arranjo: somente disperso, podendo formar rosetas
77. Micro-características: nenhuma, projeção digitiforme, esporão basal, falce ondulada, poro arredondado, pé não fusionado
78. Anisoquela II [não-aplicável a: ausente e uma categoria]: A, B, C, D (= "curvoquela"), naviculiquela, anomoquela, quela unguiferada
- 79 - 93. idem a 63 - 77
94. Anisoquela III [não-aplicável a: ausente, uma categoria e duas categorias]: A, B, C, D (= "curvoquela"), naviculiquela, anomoquela, quela unguiferada
- 95 - 109. idem a 63 - 77
110. Isoquelas: ausente, uma categoria, duas categorias
111. Isoquela I [não-aplicável a: ausente]: A, B, C, D
112. Cabeça (%) : <numérico>
113. Ângulo de curvatura da cabeça: <numérico>
114. Ângulo de abertura da ala frontal da cabeça: <numérico>
115. Ângulo de abertura entre as alas laterais da cabeça: <numérico>
116. Ângulo de abertura entre as alas frontal e lateral da cabeça: <numérico>
117. Curvatura do eixo: : <numérico>
118. Comprimento total: <numérico>
119. Distribuição: coanossomo, ectossomo
120. Ocorrência: comum, incomum, raro
121. Arranjo: somente disperso, podendo formar rosetas
122. Isoquela II [não-aplicável a: ausente e uma categoria]: A, B, C, D
- 123 - 132. idem a 112 - 121
133. Sigmas: ausente, uma categoria, duas categorias, três categorias
134. Sigma I [não-aplicável a: ausente]: lisa, serreada
135. Comprimento total: <numérico>
136. Distribuição: coanossomo, ectossomo

137. Ocorrência: comum, incomum, raro
138. Dobradura dos ganchos: abrupta, suave
139. Sigma II [não-aplicável a: ausente e uma categoria]: lisa, serreada
- 140 - 143. idem a 135 - 138
144. Sigma III [não-aplicável a: ausente, uma categoria e duas categorias]: lisa, serreada
- 145 - 148. idem a 135 - 138
149. Ráfides e derivadas: ausente, uma categoria, duas categorias, três categorias
150. Ráfide I [não-aplicável a: ausente]: normal/reta, rafidotoxa/sinuosa, toxa/inflada, micróxea, micracantóxea
151. Comprimento total: <numérico>
152. Distribuição: coanossomo, ectossomo
153. Ocorrência: comum, incomum, raro
154. Arranjo: somente disperso, podendo ocorrer em feixes (tricrodragmatas/toxodragmatas)
155. Ráfide II [não-aplicável a: ausente e uma categoria]: normal/reta, rafidotoxa/sinuosa, toxa/inflada
- 156 - 159. idem a 151 - 154
160. Ráfide III [não-aplicável a: ausente, uma categoria e duas categorias]: normal/reta, rafidotoxa/sinuosa, toxa/inflada
- 161 - 164. idem a 151 - 154

## F2. Referências da tabulação de características morfológicas por táxon

<b>Táxon</b>	<b>Referência</b>
<i>M. (Aeg.) adhaerens</i>	Carballo e Cruz-Barraza, 2010; Lambe, 1893
<i>M. (Aeg.) americana</i>	Muricy e Hajdu, 2006; van Soest, 1984
<i>M. (Aeg.) carmigropila</i>	Hajdu e Rützler, 1998
<i>M. (Aeg.) citrina</i>	Hajdu e Rützler, 1998
<i>M. (Aeg.) contareni</i>	van Soest e Hajdu, 2002
<i>M. (Aeg.) crassissima</i>	Dendy, 1905, Pulitzer-Finalli, 1993
<i>M. (Aeg.) escarlatei</i>	Hajdu e Teixeira, 2011; Hajdu <i>et al.</i> , 1995; Muricy e Hajdu, 2006
<i>M. (Aeg.) liliana</i>	Carballo e Hajdu, 2001
<i>M. (Aeg.) magellanica1</i>	Ridley, 1881
<i>M. (Aeg.) magellanica2</i>	Ridley, 1881
<i>M. (Aeg.) rotalis</i>	Topsent, 1924; Boury-Esnault e Lopes, 1985
<i>M. (Aeg.) sulevoidea</i>	Sollas, 1902; Pulitzer-Finalli, 1993
<i>M. (Aeg.) syrinx</i>	Topsent, 1924; Levi, 1960
<i>M. (Are.) laxissima_Brasil</i>	Muricy e Hajdu, 2006; Hajdu <i>et al.</i> , 2011
<i>M. (Are.) laxissima_Caribe</i>	Duchssaing e Michelotti, 1864; Hajdu e Rützler, 1998; van Soest, 1984
<i>M. (Are.) mirabilis</i>	Lendenfeld, 1887; van Soest e Hajdu, 2002
<i>M. (Car.) cecilia</i>	Carballo e Cruz-Barraza, 2010
<i>M. (Car.) fistulifera</i>	Row, 1911
<i>M. (Car.) magnirhaphidifera</i>	Carballo e Cruz-Barraza, 2010; Carballo e Hajdu, 2001; Hajdu e Rützler, 1998; van Soest, 1984
<i>M. (Car.) microsigmatosa</i>	Arndt, 1927; Hajdu e Rützler, 1998; Hechtel, 1965; Muricy e Hajdu, 2006; van Soest, 1984
<i>M. (Myc.) alagoana</i>	Cedro <i>et al.</i> , 2011
<i>M. (Myc.) arenaria</i>	Hajdu e Boury-Esnault, 1991; Hajdu e Desqueyroux-Faúndez, 1994; Muricy e Hajdu, 2006
<i>M. (Myc.) grandis</i>	Pulitzer-Finalli, 1993; Thomas, 1973
<i>M. (Myc.) laevis</i>	Carter, 1882; Hajdu e Desqueyroux-Faúndez, 1994; Hajdu e Rützler, 1998; Hechtel, 1965; van Soest, 1984
<i>M. (Myc.) lingua</i>	Ackers <i>et al.</i> , 1992; Boury-Esnault <i>et al.</i> , 1994; Bowerbank, 1866; van Soest e Hajdu, 2002
<i>M. (Myc.) phylophilla</i>	Lévi, 1963; van Soest, 1982
<i>M. (Myc.) thielei</i>	Hajdu e Desqueyroux-Faúndez, 1994
<i>M. (Myc.) vansoesti</i>	Calcinai <i>et al.</i> , 2006
<i>M. (Nav.) arcuris</i>	Lerner e Hajdu, 2002
<i>M. (Nav.) flagellifera</i>	Vacelet e Vasseur, 1971
<i>M. (Oxy.) acerata</i>	Hentschel, 1914; Kirkpatrick, 1907; Kirkpatrick, 1908; Rios <i>et al.</i> , 2004
<i>M. (Par.) sp. citrina</i>	not described
<i>M. (Zyg.) angulosa</i>	Muricy e Hajdu, 2006; van Soest, 1984
<i>M. (Zyg.) parishii</i>	Lévi, 1963; Hechtel, 1965; Thomas, 1973; van Soest e Hajdu, 2002

**APÊNDICE G** - Resultado univariado para cada variável dependente (VD) e testes *post-hoc* de Bonferoni dos Testes Multivariado de Significância (MTS) entre os haplótipos e localidades

Tabela G1. Resultado univariado para cada VD e testes *post-hoc* de Bonferoni no MTS entre os haplótipos A-D do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. Os haplótipos usados como variáveis independentes (A-D) foram restritos a uma única localidade (RJ). As variáveis dependentes (VD) do modelo L, W, T e T/W são descritas na seção 3.2.4. Os graus de liberdade (df, do inglês *degree of freedom*) para cada conjunto de dados foram:  $df_{\text{Haplótipo}} = 3$ ;  $df_{\text{Erro}} = 17$ ;  $df_{\text{Total}} = 20$ . Abreviaturas dadas como: soma dos quadrados (SS); médias quadráticas (MS); valor de F (F); valor-p do teste (p). Os testes com valor-p  $\leq 0.05$  estão em negrito.

Variável	Efeito	SS	MS	F	p
<b>L</b>	Haplótipo	<b>3587,443</b>	<b>1195,814</b>	<b>15,496</b>	<b>0,000</b>
	Erro	1311,850	77,168		
	Total	4899,293			
<b>W</b>	Haplótipo	<b>18,229</b>	<b>6,076</b>	<b>21,852</b>	<b>0,000</b>
	Erro	4,727	0,278		
	Total	22,956			
<b>T</b>	Haplótipo	<b>8,519</b>	<b>2,840</b>	<b>11,404</b>	<b>0,000</b>
	Erro	4,233	0,249		
	Total	12,753			
<b>T/W</b>	Haplótipo	<b>0,179</b>	<b>0,060</b>	<b>13,555</b>	<b>0,000</b>
	Erro	0,075	0,004		
	Total	0,254			

Teste *post-hoc* de Bonferroni (df = 17)

Variável	MS	p					
		(A-B)	(A-C)	(A-D)	(B-C)	(B-D)	(C-D)
L	77,168	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	1,000	1,000	1,000
W	0,278	0,230	0,058	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	0,362	<b>0,000</b>
T	0,249	1,000	<b>0,003</b>	1,000	<b>0,003</b>	1,000	<b>0,000</b>
T/W	0,004	0,529	0,873	<b>0,000</b>	1,000	<b>0,036</b>	<b>0,003</b>

Tabela G2. Resultado univariado para cada VD e testes *post-hoc* de Bonferroni no MTS entre os haplótipos A-C do complexo *Mycale (Carmia) microsigmata* Arndt, 1927. Os haplótipos usados como variáveis independentes (A-C) foram restritos a uma única localidade (RJ). As variáveis dependentes (VD) do modelo L, W, T, T/W, S e A são descritas na seção 3.2.4. Os graus de liberdade (df, do inglês *degree of freedom*) para cada conjunto de dados foram:  $df_{\text{Haplótipo}} = 2$ ;  $df_{\text{Erro}} = 12$ ;  $df_{\text{Total}} = 14$ . Abreviaturas dadas como: soma dos quadrados (SS); médias quadráticas (MS); valor de F (F); valor-p do teste (p). Os testes com valor-p  $\leq 0.05$  estão em negrito.

Variável	Efeito	SS	MS	F	p
<b>L</b>	Haplótipo	<b>2171,934</b>	<b>1085,967</b>	<b>17,892</b>	<b>0,000</b>
	Erro	728,348	60,696		
	Total	2900,282			
<b>W</b>	Haplótipo	<b>5,782</b>	<b>2,891</b>	<b>8,027</b>	<b>0,006</b>
	Erro	4,322	0,360		
	Total	10,103			
<b>T</b>	Haplótipo	<b>6,248</b>	<b>3,124</b>	<b>11,346</b>	<b>0,002</b>
	Erro	3,304	0,275		
	Total	9,552			
<b>T/W</b>	Haplótipo	<b>0,018</b>	<b>0,009</b>	<b>2,347</b>	<b>0,138</b>
	Erro	0,047	0,004		
	Total	0,065			
<b>S</b>	Haplótipo	14,764	7,382	2,312	0,141
	Erro	38,309	3,192		
	Total	53,073			
<b>A</b>	Haplótipo	<b>67,553</b>	<b>33,776</b>	<b>22,127</b>	<b>0,000</b>
	Erro	18,317	1,526		
	Total	85,870			

Teste <i>post-hoc</i> de Bonferroni (df = 12)				
Variável	MS	p(A-B)	p(A-C)	p(B-C)
L	60,696	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>	1,000
W	0,360	0,216	0,074	<b>0,006</b>
T	0,275	1,000	<b>0,004</b>	<b>0,005</b>
T/W	0,004	0,237	0,395	1,000
S	3,192	1,000	0,165	0,671
A	1,527	0,903	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>

Tabela G3. Resultado univariado para cada VD e testes *post-hoc* de Bonferoni no MTS entre localidades do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. As localidades usadas como variáveis independentes (Hav, Pan e RJ) foram restritas a um único haplótipo (A). As variáveis dependentes (VD) do modelo L, W, T, T/W, S e A são descritas na seção 3.2.4. Os graus de liberdade (df, do inglês *degree of freedom*) para cada conjunto de dados foram:  $df_{\text{Haplótipo}} = 2$ ;  $df_{\text{Erro}} = 11$ ;  $df_{\text{Total}} = 13$ . Abreviaturas dadas como: soma dos quadrados (SS); médias quadráticas (MS); valor de F (F); valor-p do teste (p). Os testes com valor-p  $\leq 0.05$  estão em negrito.

Variável	Efeito	SS	MS	F	p
<b>L</b>	Haplótipo	259,050	129,525	2,412	0,135
	Erro	590,800	53,709		
	Total	849,850			
<b>W</b>	Haplótipo	2,389	1,194	3,454	0,069
	Erro	3,803	0,346		
	Total	6,192			
<b>T</b>	Haplótipo	0,171	0,085	0,366	0,702
	Erro	2,566	0,233		
	Total	2,736			
<b>T/W</b>	Haplótipo	<b>0,033</b>	<b>0,016</b>	<b>5,046</b>	<b>0,028</b>
	Erro	0,036	0,003		
	Total	0,069			
<b>S</b>	Haplótipo	11,841	5,921	1,359	0,297
	Erro	47,908	4,355		
	Total	59,750			
<b>A</b>	Haplótipo	<b>19,248</b>	<b>9,624</b>	<b>4,827</b>	<b>0,031</b>
	Erro	21,930	1,994		
	Total	41,178			

Teste <i>post-hoc</i> de Bonferroni (df = 11)				
Variável	MS	p(Hav-Pan)	p(Hav-RJ)	p(Pan-RJ)
L	53,709	1,000	1,000	0,153
W	0,346	1,000	0,183	0,162
T	0,233	1,000	1,000	1,000
T/W	0,003	0,955	0,054	0,124
S	4,355	1,000	0,662	0,600
A	1,994	0,056	0,883	0,100

Tabela G4. Resultado univariado para cada VD no MTS entre localidades do complexo *Mycale (Carmia) microsigmatosa* Arndt, 1927. As localidades usadas como variáveis independentes (AL e RJ) foram restritas a um único haplótipo (B). As variáveis dependentes (VD) do modelo L, W, T, T/W, S e A são descritas na seção 3.2.4. Os graus de liberdade (df, do inglês *degree of freedom*) para cada conjunto de dados foram:  $df_{\text{Haplótipo}} = 1$ ;  $df_{\text{Erro}} = 6$ ;  $df_{\text{Total}} = 7$ . Abreviaturas dadas como: soma dos quadrados (SS); médias quadráticas (MS); valor de F (F); valor-p do teste (p). Os testes com valor-p  $\leq 0.05$  estão em negrito.

Variável	Efeito	SS	MS	F	p
<b>L</b>	Haplótipo	25,240	25,240	0,391	0,555
	Erro	387,044	64,507		
	Total	412,284			
<b>W</b>	Haplótipo	<b>1,616</b>	<b>1,616</b>	<b>15,451</b>	<b>0,008</b>
	Erro	0,628	0,105		
	Total	2,244			
<b>T</b>	Haplótipo	0,732	0,732	3,774	0,100
	Erro	1,164	0,194		
	Total	1,896			
<b>T/W</b>	Haplótipo	0,011	0,011	4,409	0,081
	Erro	0,015	0,003		
	Total	0,026			
<b>S</b>	Haplótipo	2,125	2,125	2,845	0,143
	Erro	4,480	0,747		
	Total	6,605			
<b>A</b>	Haplótipo	<b>7,904</b>	<b>7,904</b>	<b>14,950</b>	<b>0,008</b>
	Erro	3,172	0,529		
	Total	11,076			

**APÊNDICE H** - Matriz de presença e ausência de espécies de *Mycale* Gray, 1867 em relação a áreas de endemismo

Reinos biogeográficos conforme definidos por Spalding e colaboradores (2007). A saber, os reinos marinhos abrangem as seguintes áreas: Ártico (A); Atlântico Norte Temperado (TNA); Pacífico Norte Temperado (TNP); Atlântico Tropical (TA); Indo-Pacífico Ocidental (WIP); Indo-Pacífico Central (CIP); Indo-Pacífico Oriental (EIP); Pacífico Oriental Tropical (TEP); América do Sul Tropical (TSA); África do Sul Temperada (TSAF); Australásia Temperada (TAA); e Oceano Sul (SO).

<b>Espécies</b>	<b>TNA</b>	<b>CIP</b>	<b>TAA</b>	<b>TEP</b>	<b>WIP</b>	<b>TNP</b>	<b>A</b>	<b>TA</b>	<b>TSA</b>	<b>TSAF</b>	<b>SO</b>	<b>EIP</b>
<i>Mycale (Aegogropila) adhaerens</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) americana</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) arndti</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) bamfieldensis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) carmigropila</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) cavernosa</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) citrina</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) crassissima</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) denticulata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Mycale (Aegogropila) dubia</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) escarlatei</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) flagelliformis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) jukdoensis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) kolletae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) lilianae</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) magellanica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) magnitoxa</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) meridionalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) militaris</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) nodulosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) parvasigma</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) pectinicola</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) pellucida</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) plumosa</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) porosa</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) retifera</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) rotalis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) serpens</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) simonis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) sullevoidea</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) syrinx</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) tapetum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mycale (Aegogropila) tunicata</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Arenochalina) anapipes</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Arenochalina) anomala</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Mycale (Arenochalina) aphysilloides</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Arenochalina) euplectelloides</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Arenochalina) flammula</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Arenochalina) incrustans</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mycale (Arenochalina) laxissima</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

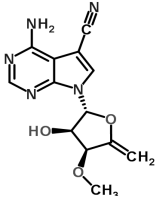
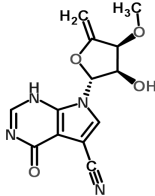
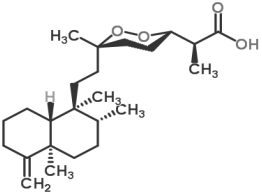
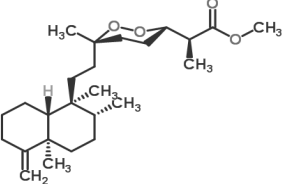






<b>Espécies</b>	<b>TNA</b>	<b>CIP</b>	<b>TAA</b>	<b>TEP</b>	<b>WIP</b>	<b>TNP</b>	<b>A</b>	<b>TA</b>	<b>TSA</b>	<b>TSAF</b>	<b>SO</b>	<b>EIP</b>
<i>Mycale (Mycale) tyloa</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Mycale) vansoesti</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) arcuiris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) chungjae</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) cleistochela</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) cliftoni</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) diversisigmata</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) flagellifera</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) neunggulensis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) obscura</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) purpurata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) thaumatochela</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Naviculina) ulleungensis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Oxymycale) acerata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Mycale (Oxymycale) intermedia</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Oxymycale) koreana</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Oxymycale) paradoxa</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Oxymycale) renieroides</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mycale (Oxymycale) rhoi</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Oxymycale) stecarmia</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Oxymycale) stephensae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mycale (Paresperella) atlantica</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mycale (Paresperella) bidentata</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) curvisigma</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mycale (Paresperella) dentata</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) dichela</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) levii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mycale (Paresperella) macrosigma</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) microsigma</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) moluccensis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) penicillium</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) psila</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) repens</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) serratohamata</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) serrulata</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) spinosigma</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) toxifera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mycale (Paresperella) undulata</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Paresperella) vitellina</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mycale (Rhaphidotheca) arctica</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Rhaphidotheca) coronata</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Rhaphidotheca) loricata</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mycale (Rhaphidotheca) marshallhalli</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Zygomycale) angulosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Mycale (Zygomycale) parishii</i>	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycale (Zygomycale) ramulosa</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>46</b>	<b>36</b>	<b>6</b>	<b>27</b>	<b>37</b>	<b>14</b>	<b>30</b>	<b>20</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>

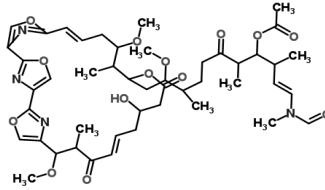
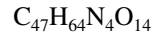
**Apêndice I** - Lista dos metabólitos secundários isolados a partir de espécies de *Mycale* Gray, 1867 obtida da literatura

Nome do composto	Fórmula molecular	Estrutura química	Classe / Atividade farmacológica	Espécie de origem
Mycalisine A (Kato et al., 1985)	$C_{13}H_{13}N_5O_3$		Nucleosídeo / Inibidor de divisão celular	<i>Mycale</i> sp.
Mycalisine B (Kato et al., 1985)	$C_{13}H_{12}N_4O_4$		Nucleosídeo / Inibidor de divisão celular	<i>Mycale</i> sp.
Enantio Sigmosceptrellin-A (Capon & McLeod, 1985)	$C_{24}H_{40}O_4$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale</i> cf. <i>ancorina</i>
Enantio Sigmosceptrellin-A methyl ester (Capon & McLeod, 1985) (Capon et al., 1997)	$C_{25}H_{44}O_5$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale</i> cf. <i>ancorina</i> <i>Mycale</i> sp.

Ciclic peroxide 4 (Capon & McLeod, 1987)	$C_{24}H_{38}O_4$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale cf. ancorina</i>
Ciclic peroxide ester 7 (Capon & McLeod, 1987) (Capon et al., 1997)	$C_{25}H_{42}O_4$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale cf. ancorina</i> <i>Mycale</i> sp.
Ciclic peroxide 5 (Capon & McLeod, 1987)	$C_{24}H_{40}O_4$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale cf. ancorina</i>
Ciclic peroxide ester 8 (Capon & McLeod, 1987) (Capon et al., 1997)	$C_{25}H_{42}O_4$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale cf. ancorina</i> <i>Mycale</i> sp.
MycalAmida A (Perry et al, 1988) (Roush & Pfeifer, 2000) (Hood et al., 2001) (Zimmermann et al., 2009)	$C_{24}H_{41}NO_{10}$		Amida / Antiviral Antitumoral Apoptótico	<i>Mycale hentscheli</i> <i>Mycale</i> sp.

## mycalonide A

(Fusetani et al., 1989)  
 (Matsunaga et al., 1999)  
 (Liu & Panek, 2000)  
 (Panek & Liu, 2000)  
 (Matsunaga & Fusetani, 2004)  
 (Teukamoto et al., 2005)

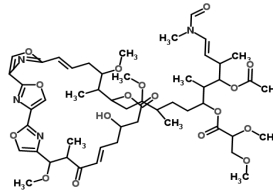
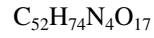


Macrolídeo /  
 Citotóxico  
 Despolimerizador de  
 actina

*Mycale* sp.  
*Mycale magellanica*

## Mycalolide B

(Fusetani et al., 1989)  
 (Matsunaga et al., 1999)  
 (Matsunaga & Fusetani, 2004)

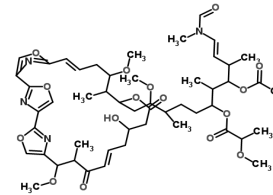
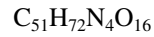


Macrolídeo /  
 Citotóxico

*Mycale* sp.  
*Mycale magellanica*

## Mycalolide C

(Fusetani et al., 1989)  
 (Matsunaga et al., 1999)  
 (Matsunaga & Fusetani, 2004)

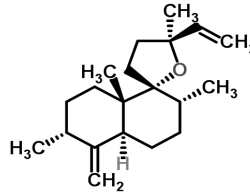
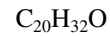


Macrolídeo /  
 Citotóxico

*Mycale* sp.  
*Mycale magellanica*

## Rotalin A

(Corriero et al., 1989)

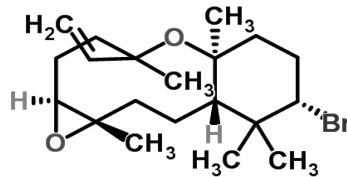
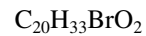


Diterpeno /  
 -

*Mycale rostralis*

## Rotalin B

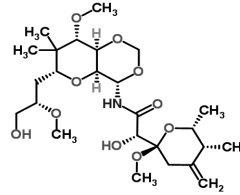
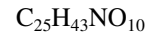
(Corriero et al., 1989)



Diterpeno /  
 -

*Mycale rostralis*

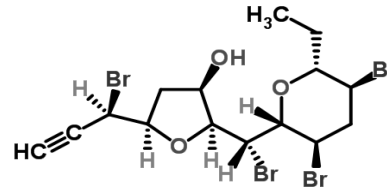
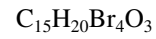
MycaAmida B  
(Perry et al., 1990)  
(Kocienski et al., 1998)  
(Kocienski et al., 2000)



Amida /  
Antiviral  
Antitumoral

*Mycale* sp.

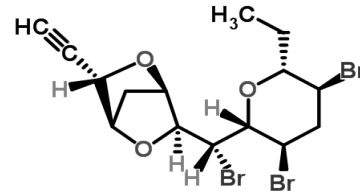
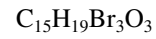
20-hydroxyscalarolide?  
(Giordano et al, 1990)



Acetogenina  
(polibrominado) /  
-

*Mycale rotalis*

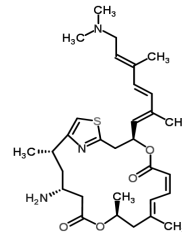
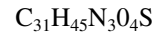
20-hydroxyscalarolide?  
(Giordano et al, 1990)



Acetogenina  
(polibrominado) /  
-

*Mycale rotalis*

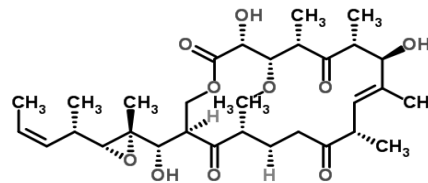
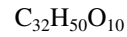
mateamine A  
(Northcote et al., 1991)  
(Rzasa et al., 1998)  
(Romo et al., 1998)  
(Remuiñán & Pattenden, 2000)  
(Bordeleau et al, 2005)  
(Low et al., 2005)  
(Dang et al., 2000)



Macrolídeo /  
Citotóxico  
Imunossupresor

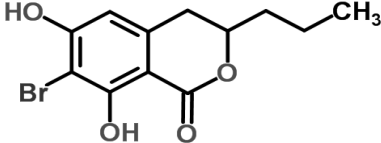
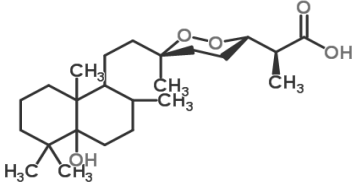
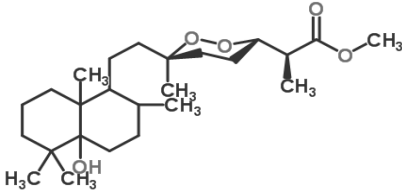
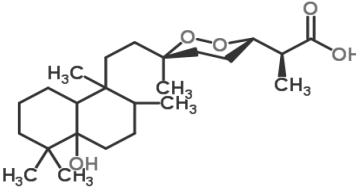
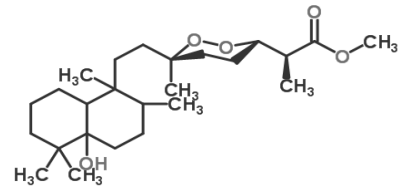
*Mycale hentscheli*  
*Mycale* sp.

13-deoxytedanolide  
(Fusetani et al., 1991)  
(Smith et al., 2003)  
(Nishimura et al, 2005)

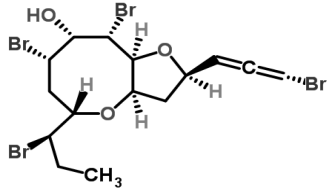
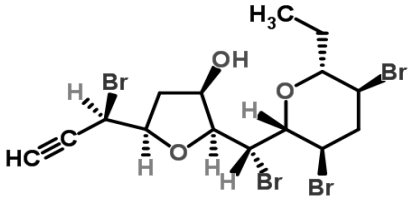
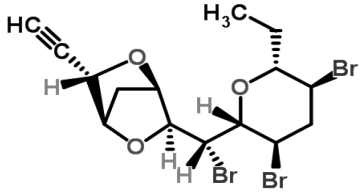
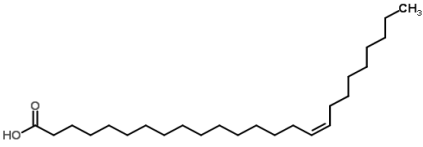
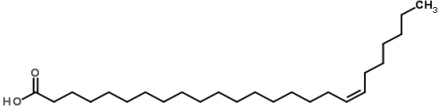


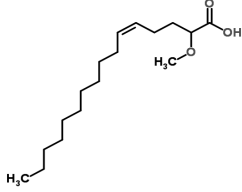
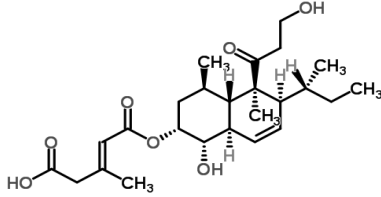
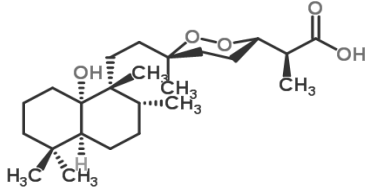
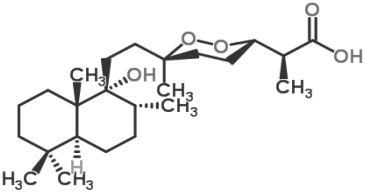
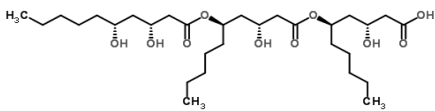
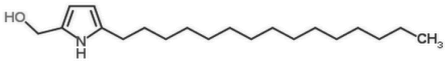
- /  
Citotóxico

*Mycale adhaerens*

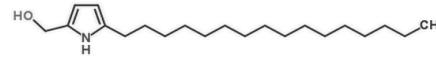
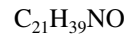
<p>Hiburipyranone (Fusetani et al., 1991) (Uchida et al., 1997) (Uchida et al., 1998)</p>	$C_{12}H_{13}BrO_4$		<p>-/ Citotóxico</p>	<p><i>Mycale adhaerens</i></p>
<p>Mycaperoxide F (Capon, 1991)</p>	$C_{25}H_{42}O_4$		<p>Norsesterterpeno / -</p>	<p><i>Mycalespongiosa</i></p>
<p>Mycaperoxide F methyl ester (Capon, 1991) (capon et al., 1998)</p>	$C_{25}H_{44}O_5$		<p>Norsesterterpeno / -</p>	<p><i>Mycalespongiosa</i> <i>Mycale</i> sp.</p>
<p>Mycaperoxide E (Capon, 1991)</p>	$C_{24}H_{42}O_5$		<p>Norsesterterpeno / -</p>	<p><i>Mycale spongiosa</i></p>
<p>Mycaperoxide E methyl ester (Capon, 1991)</p>	$C_{25}H_{44}O_5$		<p>Norsesterterpeno / -</p>	<p><i>Mycale spongiosa</i></p>



"Non-nominated" cyclic polybrominated C15 Acetogenina (Notaro et al., 1992)	$C_{15}H_{20}Br_4O_3$		Acetogenina (polibrominado) / -	<i>Mycale rotalis</i>
20-hydroxyscalarolide (isomer1) (Notaro et al., 1992)	$C_{15}H_{20}Br_4O_3$		Acetogenina (polibrominado) / -	<i>Mycale rotalis</i>
20-hydroxyscalarolide (isomer2) (Notaro et al., 1992)	$C_{15}H_{19}Br_3O_3$		Acetogenina (polibrominado) / -	<i>Mycale rotalis</i>
16-pentacosenoic acid (Carballeira et al., 1992)	$C_{25}H_{48}O_2$		Ácido graxo fosfolípideo / -	<i>Mycale laevis</i>
18-pentacosenoic acid (Carballeira et al., 1992)	$C_{25}H_{48}O_2$		Ácido graxo fosfolípideo / -	<i>Mycale laevis</i>

2-Methoxy-5-hexadecenoic acid (Carballeira et al., 1992)	$C_{17}H_{32}O_3$		Ácido graxo fosfolipídeo / -	<i>Mycale laevis</i>
Trichoharzin (Kobayashi et al., 1993)	$C_{25}H_{38}O_7$		Policetídeo / -	<i>Mycale cecilia</i> a partir do fungo <i>Trichoderma harzianum</i>
Mycaperoxide A (Tanaka et al., 1993) (Harwood et al, 1999)	$C_{24}H_{42}O_5$		Norsesterterpeno / Citotóxico Antiviral	<i>Mycale</i> sp.
Mycaperoxide B (Tanaka et al., 1993) (Harwood et al, 1999)	$C_{24}H_{42}O_5$		Norsesterterpeno / Citotóxico Antiviral	<i>Mycale</i> sp.
Exophilin A (Doshida et al., 1996)	$C_{30}H_{56}O_{10}$		- / Antimicrobial	<i>Mycale adhaerens</i> a partir do fungo <i>Exophiala pisciphila</i>
"Non-nominated" 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (1) (Venkateswarlu et al., 1996)	$C_{20}H_{37}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale monanchorata</i> <i>Mycale mytilorum</i>

"Non-nominated" 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (2)  
(Venkateswarlu et al., 1996)

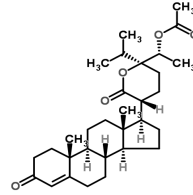
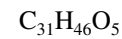


Hidroximetilpirrol /

*Mycale monanchorata*  
*Mycale mytilorum*

-

Mycalone  
(Rochfort et al., 1996)  
(Capon et al., 1997)

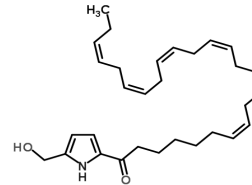
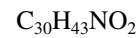


Lactona (esteroidal) /

*Mycale* spp.

-

Mycalazol 1  
(Ortega et al., 1997)

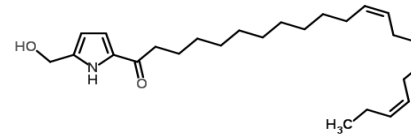
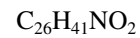


Hidroximetilpirrol /

*Mycale micracanthoxea*

-

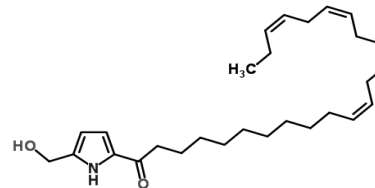
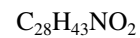
Mycalazol 2  
(Ortega et al., 1997)



Hidroximetilpirrol /  
Citotóxico

*Mycale micracanthoxea*

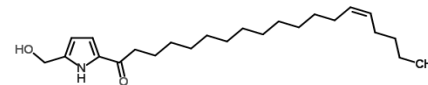
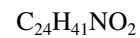
Mycalazol 3  
(Ortega et al., 1997)



Hidroximetilpirrol /  
Citotóxico

*Mycale micracanthoxea*

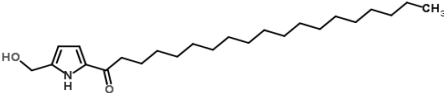
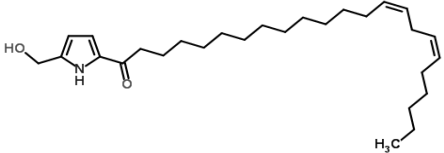
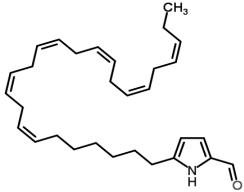
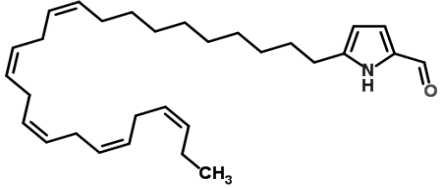
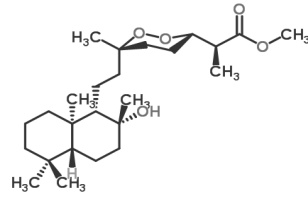
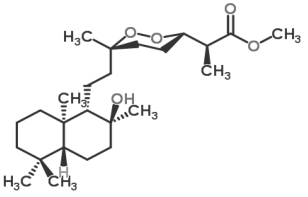
Mycalazol 4  
(Ortega et al., 1997)



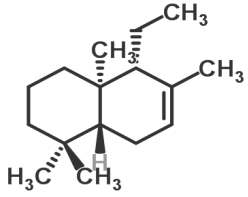
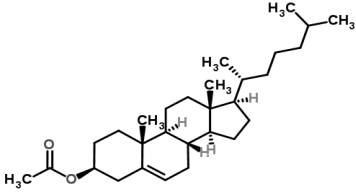
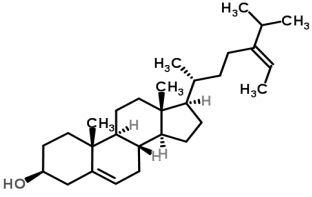
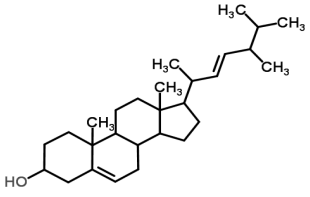
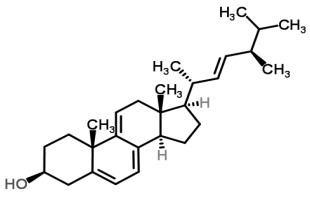
Hidroximetilpirrol /  
Citotóxico

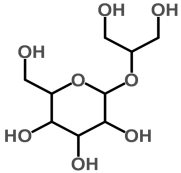
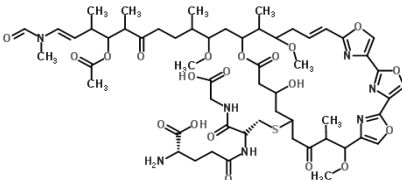
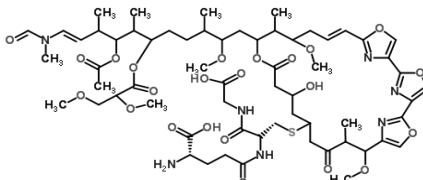
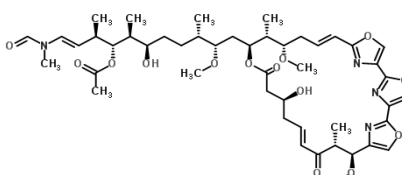
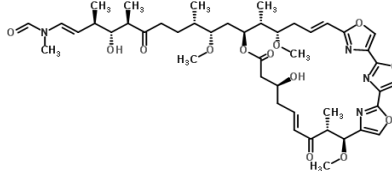
*Mycale micracanthoxea*

<p>Mycalazol 5 (Ortega et al., 1997) (Hansen &amp; Skattebøl, 2004)</p>	$C_{30}H_{45}NO_2$		<p>Hidroximetilpirrol / Citotóxico</p>	<p><i>Mycale micracanthoxea</i></p>
<p>Mycalazol 6 (Ortega et al., 1997)</p>	$C_{26}H_{43}NO_2$		<p>Hidroximetilpirrol / Citotóxico</p>	<p><i>Mycale micracanthoxea</i></p>
<p>Mycalazol 7 (Ortega et al., 1997)</p>	$C_{23}H_{41}NO_2$		<p>Hidroximetilpirrol / Citotóxico</p>	<p><i>Mycale micracanthoxea</i></p>
<p>Mycalazol 8 (Ortega et al., 1997)</p>	$C_{28}H_{45}NO_2$		<p>Hidroximetilpirrol / Citotóxico</p>	<p><i>Mycale micracanthoxea</i></p>
<p>Mycalazol 9 (Ortega et al., 1997)</p>	$C_{30}H_{47}NO_2$		<p>Hidroximetilpirrol / Citotóxico</p>	<p><i>Mycale micracanthoxea</i></p>
<p>Mycalazol 10 (Ortega et al., 1997)</p>	$C_{26}H_{45}NO_2$		<p>Hidroximetilpirrol / Citotóxico</p>	<p><i>Mycale micracanthoxea</i></p>

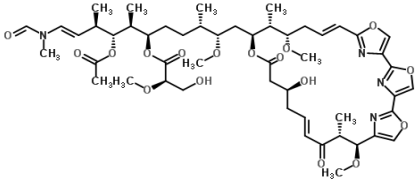
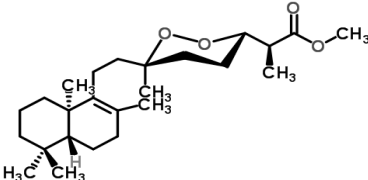
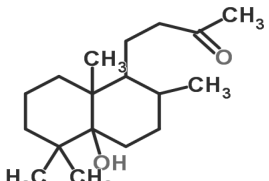
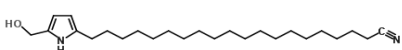
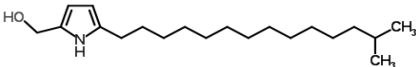
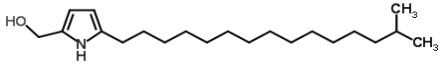
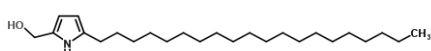
<p>Mycalazol 11 (Ortega et al., 1997) (Nabbs &amp; Abell, 1999)</p>	$C_{24}H_{43}NO_2$		<p>Hidroximetilpirrol / Citotóxico</p>	<p><i>Mycale micracanthoxea</i></p>
<p>Mycalazol 12 (Ortega et al., 1997)</p>	$C_{28}H_{47}NO_2$		<p>Hidroximetilpirrol / Citotóxico</p>	<p><i>Mycale micracanthoxea</i></p>
<p>Mycalazol 1 (Ortega et al., 1997)</p>	$C_{30}H_{43}NO$		<p>Hidroximetilpirrol / Citotóxico</p>	<p><i>Mycale micracanthoxea</i></p>
<p>Mycalazol 2 (Ortega et al., 1997) (Hansen &amp; Skattebøl, 2004)</p>	$C_{30}H_{45}NO$		<p>Hidroximetilpirrol / Citotóxico</p>	<p><i>Mycale micracanthoxea</i></p>
<p>Mycaperoxide C methyl ester (Capon et al., 1997)</p>	$C_{25}H_{44}O_5$		<p>Norsesterterpeno / -</p>	<p><i>Mycale</i> sp.</p>
<p>Mycaperoxide D methyl ester (Capon et al., 1997)</p>	$C_{25}H_{44}O_5$		<p>Norsesterterpeno / -</p>	<p><i>Mycale</i> sp.</p>

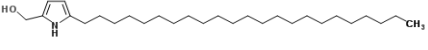
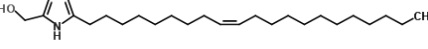
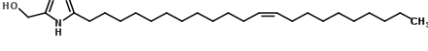
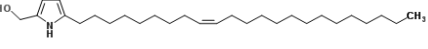
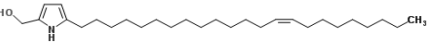
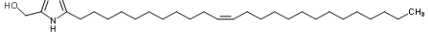
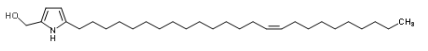
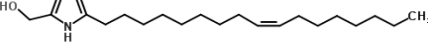
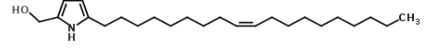
Ketone (+)-6 (Capon et al., 1997)	$C_{18}H_{30}O$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale</i> sp.
Ketone 7 (Capon et al., 1997)	$C_{18}H_{30}O$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale</i> sp.
Alcohol 8 (Capon et al., 1997)	$C_{18}H_{32}O$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale</i> sp.
Hydrocarbon 9 (Capon et al., 1997)	$C_{16}H_{28}$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale</i> sp.
Hydrocarbon 10 (Capon et al., 1997)	$C_{16}H_{28}$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale</i> sp.

Hydrocarbon 11 (Capon et al., 1997)	$C_{16}H_{28}$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale</i> sp.
CholeEsterol, acetate (Venkateswarlu et al., 1998)	$C_{29}H_{48}O_2$		Esterol / -	<i>Mycale parishii</i>
FucoEsterol (Venkateswarlu et al., 1998)	$C_{29}H_{48}O$		Esterol / -	<i>Mycale parishii</i>
CrinoEsterol (Venkateswarlu et al., 1998)	$C_{28}H_{46}O$		Esterol / -	<i>Mycale parishii</i>
DehydroergoEsterol (Venkateswarlu et al., 1998)	$C_{28}H_{42}O$		Esterol / -	<i>Mycale parishii</i>

Floridoside (Venkateswarlu et al., 1998)	$C_9H_{18}O_8$		- / -	<i>Mycale parishi</i>
Thiomycalolide A (Matsunaga et al., 1998a)	$C_{57}H_{81}N_7O_{20}S$		Macrolídeo / Citotóxico	<i>Mycale</i> sp.
Thiomycalolide B (Matsunaga et al., 1998a)	$C_{62}H_{91}N_7O_{23}S$		Macrolídeo / Citotóxico	<i>Mycale</i> sp.
30-hydroxymycalolide A (Matsunaga et al., 1998b) (Matsunaga et al., 1999) (Matsunaga & Fusetani, 2004) (Tsukamoto et al., 2005)	$C_{47}H_{66}N_4O_{14}$		Macrolídeo / Citotóxico	<i>Mycale magellanica</i>
32-hydroxymycalolide A (Matsunaga et al., 1998b) (Matsunaga et al., 1999) (Matsunaga & Fusetani, 2004)	$C_{45}H_{62}N_4O_{13}$		Macrolídeo / Citotóxico	<i>Mycale magellanica</i>



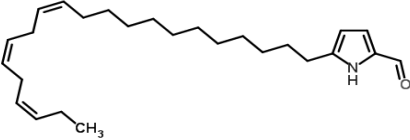
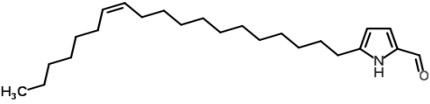
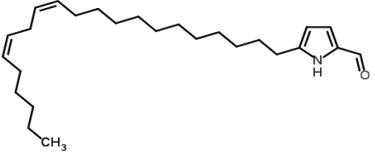
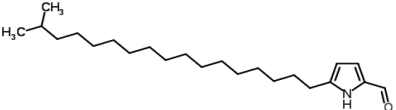
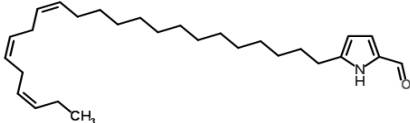
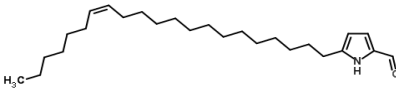
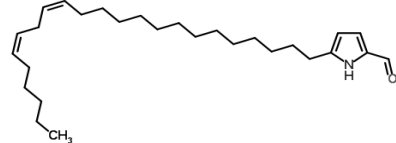
38-hydroxymycalolide B (Matsunaga et al., 1998b) (Matsunaga et al., 1999) (Matsunaga & Fusetani, 2004)	$C_{51}H_{72}N_4O_{17}$		Macrolídeo / Citotóxico	<i>Mycale magellanica</i>
Mycaperoxide G methyl ester (Capon et al., 1998)	$C_{25}H_{42}O_4$		Norsesiterpeno / -	<i>Mycale</i> spp.
Ketone 11	$C_{18}H_{32}O_2$		Norterpene / -	<i>Mycale</i> spp.
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (283) (Compagnone et al., 1999)	$C_{25}H_{44}N_2O$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (284) (Compagnone et al., 1999)	$C_{20}H_{37}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (285) (Compagnone et al., 1999)	$C_{21}H_{39}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (286) (Compagnone et al., 1999)	$C_{25}H_{47}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>

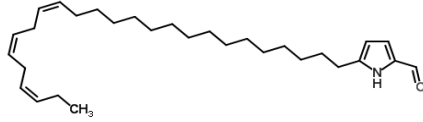
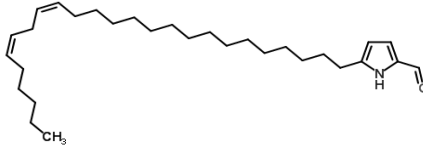
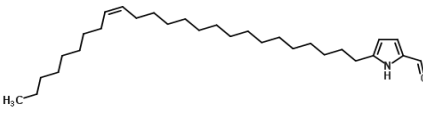
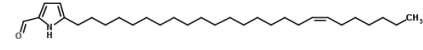
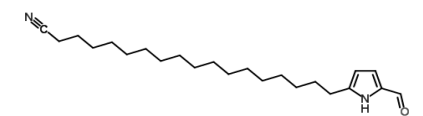
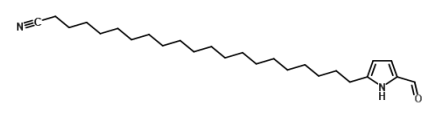
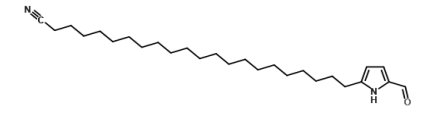
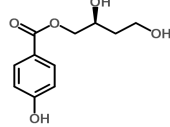
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (287) (Compagnone et al., 1999)	$C_{28}H_{53}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (288) (Compagnone et al., 1999)	$C_{26}H_{47}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (289) (Compagnone et al., 1999)	$C_{27}H_{49}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (290) (Compagnone et al., 1999)	$C_{28}H_{51}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (291) (Compagnone et al., 1999)	$C_{28}H_{51}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (292) (Compagnone et al., 1999)	$C_{30}H_{55}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (293) (Compagnone et al., 1999)	$C_{30}H_{55}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (294) (Compagnone et al., 1999)	$C_{22}H_{39}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>
Non-nominated 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde (295) (Compagnone et al., 1999)	$C_{24}H_{43}NO$		Hidroximetilpirrol / -	<i>Mycale microsigmatosa</i>

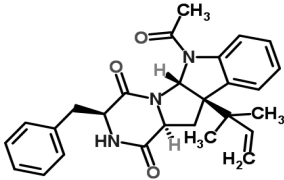
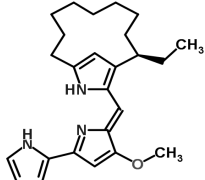
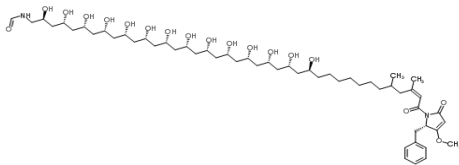
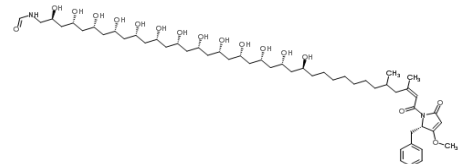
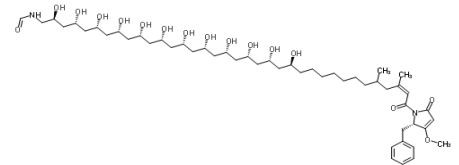
MycalAmida D (West et al., 2000a)	$C_{23}H_{39}NO_{10}$		Amida / Citotóxico	<i>Mycale</i> sp.
Peloruside A (West et al., 2000b) (Liao et al., 2003)	$C_{27}H_{48}O_{11}$		Macrolídeo / Citotóxico (estabilizante de microtúbulos)	<i>Mycale</i> sp.
Mycalexine (Venkatesham et al., 2000)	$C_{22}H_{34}N_2O_3$		Hidroxitilpirrol / -	<i>Mycale tenuispiculata</i>
(6'Z)-5-(23'-cyanotricos-6'- enyl)pyrrole-2-caldehyde (Venkatesham et al., 2000)	$C_{29}H_{48}N_2O$		Hidroxitilpirrol / -	<i>Mycale tenuispiculata</i>
(6'E)-5-(pentadec-6'-enyl)pyrrole-2- carbaldehide (Venkatesham et al., 2000)	$C_{20}H_{33}NO$		Hidroxitilpirrol / -	<i>Mycale tenuispiculata</i>
30,32-Dihydroxymycalolide A (Phuwapraisirisan et al., 2002)	$C_{45}H_{64}N_4O_{13}$		Macrolídeo / Citotóxico	<i>Mycale izuensis</i>

Mycaloside A (Kalinovsky et al., 2002)	$C_{51}H_{84}O_{23}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / -	<i>Mycale laxissima</i>
Mycaperoxide H (Phuwapraisirisan et al., 2003)	$C_{24}H_{40}O_4$		Sesterterpene / Citotóxico	<i>Mycale</i> sp.
Mycaloside B (Antonov et al., 2003)	$C_{50}H_{82}O_{23}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / Espermostático	<i>Mycale laxissima</i>
Mycaloside C (Antonov et al., 2003)	$C_{50}H_{82}O_{23}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / Espermostático	<i>Mycale laxissima</i>
Mycaloside D (Antonov et al., 2003)	$C_{53}H_{86}O_{24}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / Espermostático	<i>Mycale laxissima</i>

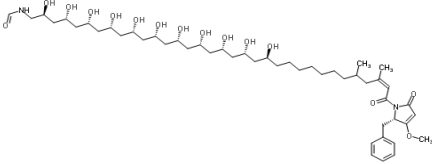
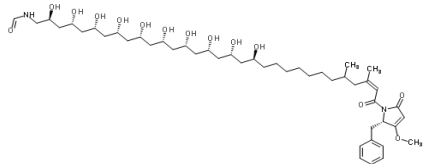
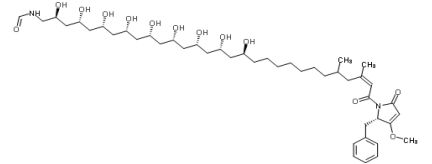
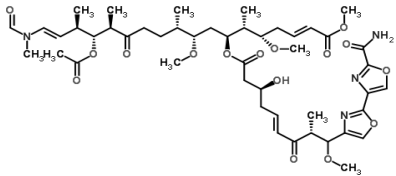
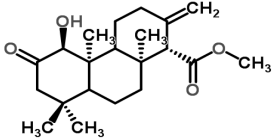
Mycaloside E (Antonov et al., 2003)	$C_{50}H_{82}O_{22}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / Espermostático	<i>Mycale laxissima</i>
Mycaloside F (Antonov et al., 2003)	$C_{52}H_{84}O_{24}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / Espermostático	<i>Mycale laxissima</i>
Mycaloside G (Antonov et al., 2003)	$C_{50}H_{82}O_{23}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / Espermostático	<i>Mycale laxissima</i>
Mycaloside H (Antonov et al., 2003)	$C_{51}H_{82}O_{23}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / Espermostático	<i>Mycale laxissima</i>
Mycaloside I (Antonov et al., 2003)	$C_{52}H_{86}O_{22}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / Espermostático	<i>Mycale laxissima</i>

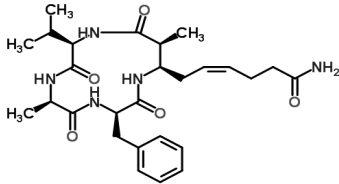
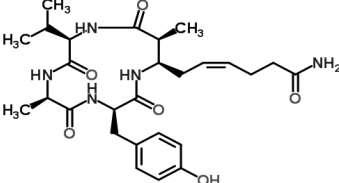
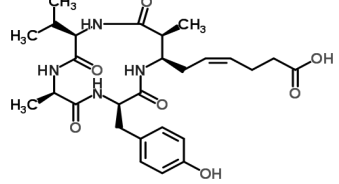
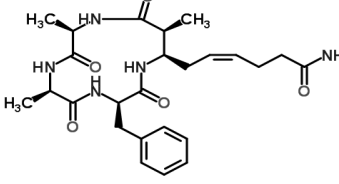
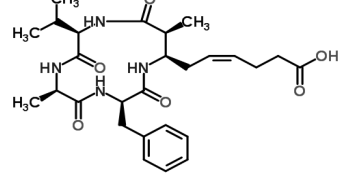
Mycalazal 3 (Ortega et al., 2004)	$C_{26}H_{41}NO$		Hidroxi metilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalazal 4 (Ortega et al., 2004)	$C_{24}H_{41}NO$		Hidroxi metilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalazal 5 (Ortega et al., 2004)	$C_{26}H_{43}NO$		Hidroxi metilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalazal 6 (Ortega et al., 2004)	$C_{23}H_{41}NO$		Hidroxi metilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalazal 7 (Ortega et al., 2004)	$C_{28}H_{45}NO$		Hidroxi metilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalazal 8 (Ortega et al., 2004)	$C_{26}H_{45}NO$		Hidroxi metilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalazal 9 (Ortega et al., 2004)	$C_{28}H_{47}NO$		Hidroxi metilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>

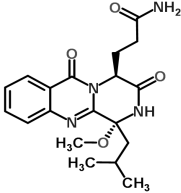
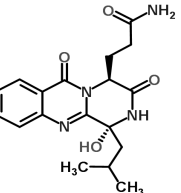
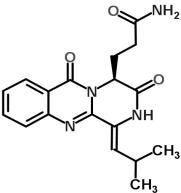
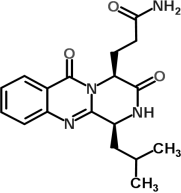
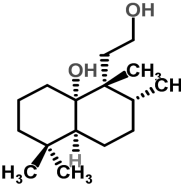
Mycalazal 10 (Ortega et al., 2004)	$C_{30}H_{49}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalazal 11 (Ortega et al., 2004)	$C_{30}H_{51}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalazal 12 (Ortega et al., 2004)	$C_{30}H_{53}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalazal 13 (Ortega et al., 2004)	$C_{30}H_{53}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalenitrile 1 (Ortega et al., 2004)	$C_{23}H_{38}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalenitrile 2 (Ortega et al., 2004)	$C_{26}H_{44}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
Mycalenitrile 3 (Ortega et al., 2004)	$C_{27}H_{46}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico	<i>Mycale cecilia</i>
2,4-dihydroxy-1-butyl(4-hydroxy)benzoate (Xin et al., 2005)	$C_{11}H_{14}O_5$		- / Citotóxico	<i>Mycale plumose</i> a partir do fungo <i>Penicillium auratiogriseum</i>

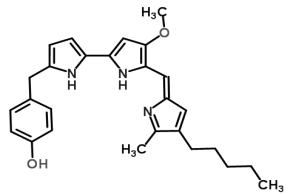
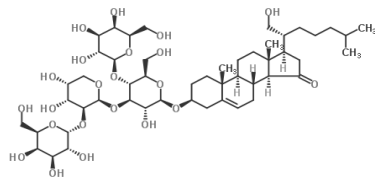
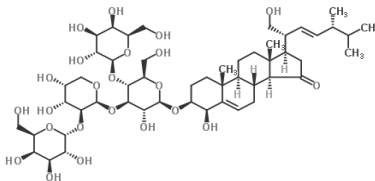
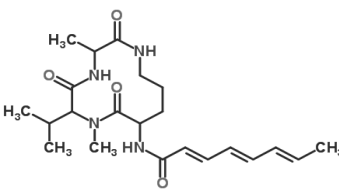
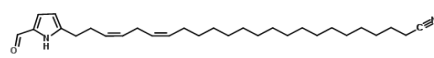
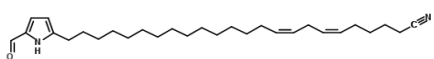
Fructigenine A (Xin et al., 2005)	$C_{27}H_{29}N_3O_3$		- / Citotóxico	<i>Mycale plumose</i> a partir do fungo <i>Penicillium</i> <i>auratiogriseum</i>
Metacycloprodigosin (Liu et al., 2005)	$C_{25}H_{33}N_3O$		- / Citotóxico	<i>Mycale plumose</i> a partir do fungo <i>Saccharopolyspora sp.</i>
Mycapolyol A (Phuwapraisirisan et al., 2005)	$C_{55}H_{94}N_2O_{18}$		Poliol / Citotóxico	<i>Mycale izuensis</i>
Mycapolyol B (Phuwapraisirisan et al., 2005)	$C_{53}H_{90}N_2O_{17}$		Poliol / Citotóxico	<i>Mycale izuensis</i>
Mycapolyol C (Phuwapraisirisan et al., 2005)	$C_{51}H_{86}N_2O_{16}$		Poliol / Citotóxico	<i>Mycale izuensis</i>

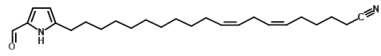
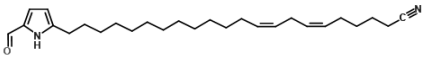
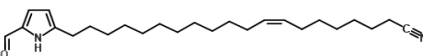
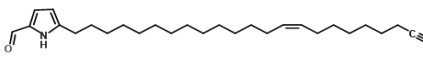
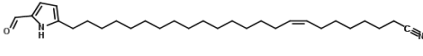
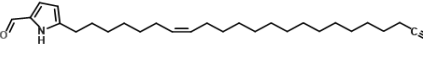
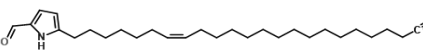
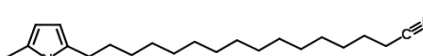
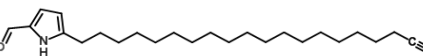
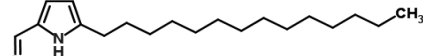


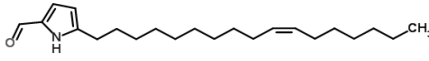
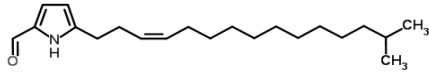
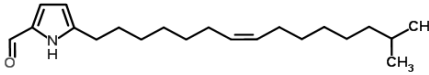
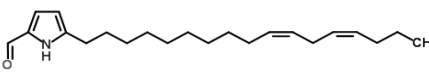
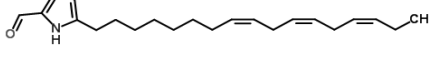
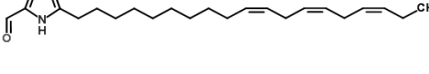
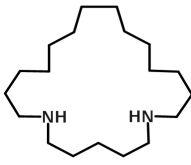
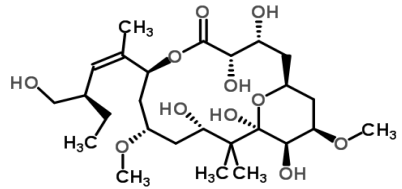
Mycapolyol D (Phuwapraisirisan et al., 2005)	$C_{49}H_{82}N_2O_{15}$		Poliol / Citotóxico	<i>Mycale izuensis</i>
Mycapolyol E (Phuwapraisirisan et al., 2005)	$C_{47}H_{78}N_2O_{14}$		Poliol / Citotóxico	<i>Mycale izuensis</i>
Mycapolyol F (Phuwapraisirisan et al., 2005)	$C_{45}H_{74}N_2O_{13}$		Poliol / Citotóxico	<i>Mycale izuensis</i>
Secomycalolide A (Tsukamoto et al., 2005)	$C_{47}H_{68}N_4O_{16}$		Macrolídeo / Inibidor de atividade proteossômica	<i>Mycale</i> sp.
Mycgranol (Rudi et al., 2005)	$C_{21}H_{32}O_4$		Diterpeno (isocopalano) / -	<i>Mycale</i> aff. <i>graveleyi</i>

<p>AzumAmida A (Nakao et al., 2006) (Izzo et al., 2006)</p>	$C_{27}H_{39}N_5O_5$		<p>Tetrapeptídeo (cíclico) / Inibidor de histona desacetilase</p>	<p><i>Mycale izuensis</i></p>
<p>AzumAmida B (Nakao et al., 2006) (Izzo et al., 2006)</p>	$C_{27}H_{39}N_5O_6$		<p>Tetrapeptídeo (cíclico) / Inibidor de histona desacetilase</p>	<p><i>Mycale izuensis</i></p>
<p>AzumAmida C (Nakao et al., 2006) (Izzo et al., 2006)</p>	$C_{27}H_{38}N_4O_7$		<p>Tetrapeptídeo (cíclico) / Inibidor de histona desacetilase</p>	<p><i>Mycale izuensis</i></p>
<p>AzumAmida D (Nakao et al., 2006) (Izzo et al., 2006)</p>	$C_{25}H_{35}N_5O_5$		<p>Tetrapeptídeo (cíclico) / Inibidor de histona desacetilase</p>	<p><i>Mycale izuensis</i></p>
<p>AzumAmida E (Nakao et al., 2006) (Izzo et al., 2006)</p>	$C_{27}H_{38}N_4O_6$		<p>Tetrapeptídeo (cíclico) / Inibidor de histona desacetilase</p>	<p><i>Mycale izuensis</i></p>

Aurantiomide A (Xin et al., 2007)	$C_{19}H_{24}N_4O_4$		Alcalóide (quinazolina) / -	<i>Mycale plumose</i> a partir do fungo <i>Penicillium</i> <i>auratiogriseum</i>
Aurantiomide B (Xin et al., 2007)	$C_{18}H_{22}N_4O_4$		Alcalóide (quinazolina) / Citotóxico	<i>Mycale plumose</i> a partir do fungo <i>Penicillium</i> <i>auratiogriseum</i>
Aurantiomide C (Xin et al., 2007)	$C_{18}H_{20}N_4O_3$		Alcalóide (quinazolina) / Citotóxico	<i>Mycale plumose</i> a partir do fungo <i>Penicillium</i> <i>auratiogriseum</i>
Anacine (Xin et al., 2007)	$C_{18}H_{22}N_4O_3$		Alcalóide (quinazolina) / -	<i>Mycale plumose</i> a partir do fungo <i>Penicillium</i> <i>auratiogriseum</i>
Euplectellodiol (Salmoun et al., 2007)	$C_{16}H_{30}O_2$		Norsesterterpeno / -	<i>Mycale euplectelloides</i>

2-(p-Hydroxybenzyl)prodigiosin (Fehér et al., 2008)	$C_{27}H_{31}N_3O_2$		Azafulveno / Citotóxico Inibidor de topoiomerase I	<i>Mycale armata</i> a partir do fungo <i>Pseudoalteromonas rubra</i>
Mycaloside J (Afiyatullof et al., 2008)	$C_{50}H_{82}O_{22}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / -	<i>Mycale laxissima</i>
Mycaloside K (Afiyatullof et al., 2008)	$C_{51}H_{82}O_{23}$		Esteróide (oligoglicosídeo) / -	<i>Mycale laxissima</i>
N-demethyl aspochracin (Motohashi et al., 2008)	$C_{22}H_{34}N_4O_4$		- / -	<i>Mycale</i> sp. a partir do fungo <i>Aspergillus sclerotiorum</i>
Mycalenitrile 4 (Mao et al., 2009)	$C_{29}H_{46}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalenitrile 5 (Mao et al., 2009)	$C_{29}H_{46}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.

Mycalenitrile 6 (Mao et al., 2009)	$C_{25}H_{38}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalenitrile 7 (Mao et al., 2009)	$C_{27}H_{42}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalenitrile 8 (Mao et al., 2009)	$C_{25}H_{40}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalenitrile 9 (Mao et al., 2009)	$C_{27}H_{44}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalenitrile 10 (Mao et al., 2009)	$C_{29}H_{48}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalenitrile 11 (Mao et al., 2009)	$C_{27}H_{44}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalenitrile 12 (Mao et al., 2009)	$C_{28}H_{46}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalenitrile 13 (Mao et al., 2009)	$C_{21}H_{34}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalenitrile 14 (Mao et al., 2009)	$C_{24}H_{40}N_2O$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalazal 14 (Mao et al., 2009)	$C_{19}H_{33}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.

Mycalazal 15 (Mao et al., 2009)	$C_{22}H_{37}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalazal 16 (Mao et al., 2009)	$C_{21}H_{35}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalazal 17 (Mao et al., 2009)	$C_{21}H_{35}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalazal 18 (Mao et al., 2009)	$C_{22}H_{35}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalazal 19 (Mao et al., 2009)	$C_{22}H_{33}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
Mycalazal 20 (Mao et al., 2009)	$C_{24}H_{37}NO$		Hidroximetilpirrol / Citotóxico Inibidor de HIF-1	<i>Mycale</i> sp.
1,5-Diazacyclohenicosane (Coello et al., 2009)	$C_{19}H_{40}N_2$		Diamina (cíclico) / Citotóxico	<i>Mycale</i> sp.
Peloruside B (Singh et al., 2010)	$C_{26}H_{46}O_{11}$		Macrolídeo / Citotóxico Estabilizante de microtúbulos	<i>Mycale hentscheli</i>

**APÊNDICE J** - Lista e matriz de presença e ausência de sinais de frequência dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos para as amostras de *Mycale* Gray, 1867

A tabela abaixo mostra a ausência (0) ou presença (1) dos sinais de frequência (em ppm) nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos para as amostras de *Mycale* (*Zygomycala*) *angulosa* (A2, A12 e A14), *Mycale* (*Aegogropila*) *americana* (E6, E9, E10, E11 e E13) e *Mycale* (*Carmia*) *microsigmatosa* (I5, I7 e I16) em referência à ausência total de sinais (OUT), onde o ponto (.) representa identidade com a mesma.

	ppm																																	
	9.33	9.24	8.94	8.93	8.92	8.91	8.90	8.88	8.87	8.82	8.81	8.79	8.78	8.65	8.61	8.60	8.58	8.56	8.55	8.54	8.53	8.51	8.48	8.36	8.35	8.34	8.25	8.20	8.14	8.13	8.12	8.10	8.09	
OUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	.	.	1	1	.	1	1	1	1
A12	.	1	.	1	.	1	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	.	1	.	.	.	.	1	1	.
A14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	1	.	.	.	.	.	1	1	1
E6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	1	1
E9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	1	1
E10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	1	1
E11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	1	1
E13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	1	1
I5	.	1	.	1	.	1	1	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	1	.	1	1
I7	1	1	1	.	.	1	1	.	.	.	1	1	1	1	.	.	1	.	1	.	1	1	1	1	.	1	1	.	.	1	.	1	1	
I16	.	1	.	.	1	1	.	1	1	.	1	1	1	.	1	1	1	1	1	.	1	1	.	.	1	.	1	.	.	1	.	1	1	

	8.08	8.07	8.05	8.04	8.03	8.02	8.01	8.00	7.99	7.97	7.96	7.95	7.94	7.93	7.89	7.82	7.78	7.76	7.74	7.73	7.72	7.71	7.67	7.64	7.63	7.62	7.58	7.57	7.50	7.47	7.46	7.44	7.43	
OUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	1	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.
A12	1	.	.	1	.	.	.	.	.	.	1	1	.	1	.	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	1	.	.	.	.	1	1	.	
A14	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	1	.	1	1	.	1	.	.	.	.	1	2	.	1	1	1	.	.	1	.	.	.	1	
E6	.	.	.	1	.	.	.	.	1	.	.	.	1	.	.	1	.	.	.	.	.	2	.	1	1	1	.	.	.	.	1	.	.	
E9	.	.	.	1	.	1	1	.	.	.	1	1	.	1	.	.	.	.	.	.	2	2	1	1	2	1	1	1	.	.	.	.	.	
E10	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	1	.	.	1	.	1	.	1	.	.	.	.	.	1	.	.	
E11	1	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	1	1	1	2	.	1	2	1	.	.	.	.	.	.	.	
E13	.	.	.	1	.	1	.	1	.	.	1	1	.	1	.	1	.	.	.	.	.	1	.	1	.	1	.	.	.	.	.	.	.	
I5	1	.	.	1	.	1	1	1	1	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	1	.	1	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.
I7	1	.	.	1	1	.	1	1	1	.	1	1	1	.	1	1	1	1	.	.	1	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	
I16	.	1	1	.	1	.	1	1	1	1	.	1	1	.	1	1	.	.	.	1	1	2	.	1	2	1	.	.	.	1	.	.	1	





		4.86
		4.73
		4.72
		4.71
		4.70
		4.66
		4.65
		4.64
		4.63
		4.62
		4.61
		4.60
		4.59
		4.57
		4.55
		4.54
		4.49
		4.48
		4.47
		4.46
		4.45
		4.43
		4.41
		4.40
		4.39
		4.38
		4.37
		4.36
		4.35
		4.34
		4.33
		4.32
		4.31
OUT	0	0
A2	1	.
A12	1	.
A14	1	.
E6	1	.
E9	1	.
E10	1	.
E11	1	1
E13	1	.
I5	1	.
I7	1	1
I16	1	.

		4.30
		4.29
		4.28
		4.27
		4.25
		4.24
		4.22
		4.21
		4.20
		4.18
		4.17
		4.16
		4.15
		4.14
		4.13
		4.11
		4.09
		4.08
		4.06
		4.05
		4.04
		4.03
		4.01
		4.00
		3.98
		3.97
		3.96
		3.95
		3.94
		3.93
		3.92
		3.91
		3.90
OUT	0	0
A2	1	.
A12	.	1
A14	1	.
E6	.	.
E9	.	1
E10	.	.
E11	.	1
E13	.	1
I5	.	1
I7	.	1
I16	1	.

		3.89
		3.88
		3.87
		3.86
		3.85
		3.84
		3.83
		3.82
		3.81
		3.80
		3.79
		3.78
		3.77
		3.76
		3.75
		3.74
		3.73
		3.71
		3.70
		3.69
		3.66
		3.65
		3.64
		3.63
		3.61
		3.60
		3.59
		3.58
		3.57
		3.56
		3.55
		3.54
		3.53
OUT	0	0
A2	1	.
A12	.	1
A14	1	.
E6	.	1
E9	.	1
E10	.	1
E11	.	1
E13	.	1
I5	.	1
I7	.	1
I16	.	1

	3.52
OUT	0
A2	. 1
A12	. .
A14	. .
E6	. .
E9	. .
E10	. .
E11	. .
E13	. .
I5	1 1
I7	. .
I16	. .
	3.49
	3.48
	3.47
	3.46
	3.45
	3.43
	3.42
	3.41
	3.40
	3.39
	3.38
	3.37
	3.36
	3.35
	3.34
	3.33
	3.31
	3.29
	3.27
	3.26
	3.25
	3.24
	3.23
	3.22
	3.21
	3.20
	3.19
	3.18
	3.17
	3.16
	3.15

	3.14
OUT	0
A2	. 1
A12	. .
A14	. 1
E6	. 1
E9	. 1
E10	. .
E11	. 1
E13	. 2
I5	. 1
I7	1 .
I16	. 1
	3.13
	3.12
	3.11
	3.10
	3.09
	3.08
	3.07
	3.06
	3.05
	3.04
	3.03
	3.02
	3.01
	2.99
	2.98
	2.97
	2.96
	2.95
	2.94
	2.93
	2.92
	2.91
	2.90
	2.89
	2.88
	2.87
	2.86
	2.85
	2.84
	2.83
	2.82
	2.81

	2.80
OUT	0
A2	. .
A12	. .
A14	. .
E6	. .
E9	1 .
E10	. .
E11	1 .
E13	. .
I5	. 1
I7	. 1
I16	. .
	2.79
	2.78
	2.77
	2.76
	2.75
	2.74
	2.72
	2.70
	2.67
	2.66
	2.65
	2.64
	2.60
	2.59
	2.58
	2.57
	2.55
	2.53
	2.52
	2.51
	2.50
	2.49
	2.47
	2.46
	2.45
	2.44
	2.43
	2.42
	2.41
	2.40
	2.38
	2.37



	1.12	1.11	1.10	1.09	1.08	1.07	1.06	1.05	1.04	1.03	1.02	1.01	0.99	0.98	0.97	0.96	0.95	0.94	0.93	0.92	0.91	0.90	0.89	0.88	0.87	0.86	0.85	0.84	0.83	0.82	0.81	0.80	0.77	
OUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A2	1	.	.	1	.	1	.	1	1	.	1	.	1	1	.	1	1	.	1	1	1	1	.	1	1	.	2	.	1	.	1	1	.	
A12	1	.	.	1	.	1	.	.	.	.	1	.	1	1	.	1	1	.	1	.	1	1	.	1	1	.	1	.	1	.	.	.	1	
A14	1	.	.	1	.	1	.	1	1	.	1	.	1	1	.	1	1	.	2	.	1	1	.	1	1	.	2	.	1	.	1	1	.	
E6	1	.	.	1	.	1	.	.	1	.	1	.	1	1	.	1	1	.	1	.	1	1	.	1	1	.	2	.	1	.	.	.	.	
E9	1	.	.	1	1	1	.	.	1	.	1	1	1	.	.	1	1	.	1	1	1	1	.	1	1	.	2	.	1	.	1	1	.	
E10	1	.	.	.	1	1	.	.	1	.	1	1	1	.	1	2	1	.	1	.	1	1	.	1	1	.	1	.	1	.	.	.	.	
E11	1	.	.	1	1	1	.	.	1	.	1	1	2	.	.	1	1	.	1	1	1	1	2	.	1	1	.	2	.	1	1	1	.	
E13	1	.	.	.	.	1	1	.	.	.	2	1	1	.	1	1	2	1	.	1	1	1	1	.	1	1	.	1	.	1	.	.	.	
I5	1	.	1	1	.	1	1	.	.	.	1	.	.	.	.	1	1	.	1	.	1	1	.	1	1	.	2	.	1	.	1	.	.	
I7	1	1	.	1	.	1	1	.	1	1	1	.	1	.	1	1	1	.	1	1	1	1	1	.	1	1	.	2	.	1	.	1	1	.
I16	1	1	1	.	.	1	1	.	.	1	1	.	1	.	1	1	.	1	1	1	1	1	1	.	1	1	.	1	.	1	.	1	.	.

	0.73	0.72	0.69	0.68	0.66	0.65	0.59	0.56
OUT	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	1	1	.	1	.	.	.	.
A12	.	1	.	.	.	.	1	.
A14	1	1	1	.	1	.	1	.
E6	1	1	.	.	.	1	1	.
E9	1	1	1	.	.	1	.	.
E10	1	1	.	.	.	1	1	.
E11	1	1	.	1	.	.	.	.
E13	1	1	.	1	.	1	.	.
I5	1	1	.	1	.	.	.	.
I7	1	1	.	1	1	.	1	1
I16	1	1	.	1	.	.	.	.

**20 anos da primeira sequencia de DNA publicada de Porifera: ou o que aprendemos até agora dos estudos moleculares em ecologia e evolução em esponjas**

Thiago Silva de Paula & Gisele Lôbo-Hajdu

Laboratório de Genética Marinha, Departamento de Genética, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, PHLC 201, Maracanã, CEP 20550-013, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Resumo

O filo Porifera (poríferos, esponjas) é um dos principais componentes de comunidades bentônicas de vários ambientes aquáticos, com ampla distribuição no tempo e no espaço. Um dos principais problemas para estudos sobre a biologia de esponjas se deve ao fato de que a classificação destes animais é muito complexa para não especialistas. A biologia molecular vem atuando como mais uma importante ferramenta para estudos em sistemática e, por meio do uso de marcadores genéticos, é possível inferir processos populacionais e filogenéticos. Ao longo das últimas décadas diversos marcadores moleculares, tanto nucleares como mitocondriais, vêm sendo utilizados em diferentes estudos em Porifera. Este trabalho de revisão visa sumarizar os principais marcadores moleculares utilizados em estudos evolutivos e sistemáticos em esponjas reportados na literatura.

Palavras-Chave: Esponjas, Sistemática molecular, Filogenia, DNAmít, rRNA, 18S, 28S, COI, ITS.

## Introdução

O filo Porifera (poríferos, esponjas, do latim *porus*, poro + *phoros*, portador de) compreende organismos com uma organização morfológica, sendo um dos principais componentes de comunidades bentônicas de vários ambientes aquáticos. As esponjas são animais sésseis, que geralmente se alimentam das menores frações orgânicas em suspensão na água e tem alto potencial filtrador. Existem cerca de 8260 espécies recentes de esponjas conhecidas (Van Soest *et al.*, 2011), que podem ser encontradas desde a superfície da água até mais de 8.000 metros de profundidade, e seu registro fóssil data as esponjas desde a era pré-cambriana (Bergquist, 1978).

Um dos principais problemas para estudos sobre a biologia de esponjas é o fato da classificação destes animais ser muito complexa para não especialistas. Os poríferos apresentam também uma grande variabilidade genética (Solé-Cava & Boury-Esnault, 1999; Boury-Esnault & Solé-Cava 2004, Wörheide *et al.*, 2004a) acompanhando a plasticidade fenotípica. Para a separação de espécies é necessária a compilação de uma vasta série de caracteres morfológicos e moleculares, quando possível. Na verdade estes problemas são também comuns em uma grande variedade de invertebrados onde ocorrem complexos de espécies crípticas, organismos estreitamente relacionados e semelhantes morfológicamente, onde a separação de espécies é difícil quando se utiliza técnicas taxonômicas convencionais, como a observação de espículas e esqueletos no caso das esponjas (Knowlton 1993).

A biologia molecular é uma importante ferramenta para estudos em sistemática e, por meio do uso de marcadores genéticos, é possível inferir processos populacionais e filogenéticos (Avice, 2004). Embora o termo marcador molecular se aplique a utilização de qualquer molécula, seja proteína, açúcar, lipídeo ou ácido nucléico, como fonte de dados, no escopo deste trabalho este termo se aplica somente ao DNA, uma vez que nas

últimas décadas este se tornou a principal molécula utilizada em estudos comparativos. As análises a partir das seqüências de DNA podem providenciar informações a respeito de eventos e processos evolutivos tanto qualitativa quanto quantitativamente, com grande serventia para estudos sistemáticos (Hillis *et al.*, 1996). Estes estudos, entretanto, levaram um longo tempo para se estabelecer nas pesquisas com esponjas, comparativamente à outros grupos animais, que começaram a aparecer somente no início da década de 1990 (Kelly-Borges *et al.*, 1991). Contudo, hoje há um crescente número de trabalhos na literatura com extensivo uso de dados moleculares com seqüências de DNA gerados para Porifera, que têm fornecido novas perspectivas a cerca da sistemática e evolução das esponjas (*e.g.*, Borchiellini *et al.*, 2001; Nichols & Wörheide, 2005; Lavrov *et al.*, 2008), e mesmo da evolução dos metazoários (*e.g.*, Müller *et al.*, 2001).

Diversos marcadores moleculares, tanto nucleares como mitocondriais vêm sendo utilizados para fins filogenéticos em Porifera (para uma revisão, ver Erpenbeck & Wörheide, 2007). As seqüências parciais ou completas dos genes do RNA ribossomal (RNAr) 18 S e 28 S são correntemente empregados pelos pesquisadores para reconstruir filogenias em diferentes níveis (Borchiellini *et al.*, 2000). Contudo, outros genes nucleares, como o do Fator de alongamento 1 alfa (Erpenbeck *et al.*, 2005a), o do intron 2 da tubulina (Schröder *et al.*, 2003), o da família das proteínas de choque térmico Hsp70 (Borchiellini *et al.*, 1998), o do segundo intron da subunidade beta da ATP sintetase (Bentlage & Wörheide, 2007) ou de seqüências homeobox (Richelle-Maurer *et al.*, 2006 e referências citadas) têm começado a ser explorados por alguns poucos trabalhos, mostrando um grande potencial na elucidação das relações evolutivas entre os diversos grupos de esponjas. O gene mitocondrial da subunidade I da Citocromo *c* oxidase (*coxI*), geralmente é usado para estudos biogeográficos ou para reconstruções

filogenéticas de menor nível taxonômico, e, em esponjas, incluem-se trabalhos para resolver relações dentro de complexos de espécies (*e.g.*, Duran *et al.*, 2004a; Erpenbeck *et al.*, 2005c; Nichols, 2005; Wörheide, 2006). Certos estudos mostram que, na maioria dos casos, este marcador pode ser muito conservativo para resolver relações no nível de espécies ou populações (mas ver Duran & Rützler, 2006), mas, a despeito disso, este gene continua sendo o marcador mitocondrial mais utilizado na literatura. Mas com o advento da era genômica, e a publicação cada vez maior de seqüência de genomas mitocondriais completos de esponjas (*e.g.*, Lavrov *et al.*, 2005; Wang & Lavrov, 2008), tem começado o uso de dados genômicos completos para inferir as relações evolutivas de Porifera e auxiliar a sistemática desse grupo (*e.g.*, Lavrov *et al.*, 2008).

Nesta revisão, foi sumarizado os principais marcadores moleculares utilizados em estudos evolutivos e sistemáticos em esponjas reportados na literatura. Nós apontamos as principais abordagens realizadas a partir destes marcadores, e listamos aqui a seqüência dos principais oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) existentes para cada marcador.

## Marcadores moleculares

### *Genes do RNAr nuclear*

O RNA ribossomal (RNAr) é o componente principal dos ribossomos, local de síntese de proteínas de todas as células vivas. A função dos RNAr é fornecer um mecanismo de decodificação do RNA mensageiro (RNAm) em aminoácidos e de interagir via a atividade da enzima peptidil transferase com os RNA transportadores (RNAt) durante a tradução.



O ribossomo de 80 S é formado por duas subunidades, nomeadas de acordo com a velocidade de sedimentação quando sujeitas a centrifugação. O Svedberg (símbolo S) é a unidade utilizada para coeficientes de sedimentação. Esta unidade é nomeada em honra ao químico sueco Theodor Svedberg (1884-1971), vencedor do prêmio Nobel de 1926 por seu trabalho em química de colóides e a invenção da ultra centrífuga.

Os eucariotos apresentam quatro tipos de RNA ribossomal (RNAr): 28 S, 18 S, 5.8 S e 5 S. O RNAr 18 S junto com 33 proteínas ribossomais formam a subunidade menor do ribossomo (SSU, small subunit) de 40 S. A subunidade maior do ribossomo dos eucariotos (LSU, large subunit), de 60 S, é composta por 49 proteínas ribossomais + RNAr 5 S + RNAr 5.8 S + RNAr 28 S. Os genes do RNAr se encontram agrupados em um único bloco transcricional (com exceção do 5 S) que se encontra repetido em múltiplas cópias *in tandem* no genoma, separados por espaçadores não transcritos (NTS, *Nontranscribed Spacers*) que intercalam repetições individuais dentro do mesmo cromossomo. A organização desses genes em sua unidade transcricional é: ETS – 18 S – ITS 1 – 5.8 S – ITS 2 – 28 S, onde ETS é um espaçador externo transcrito (*External Transcribed Spacer*), e ITS1 e ITS2 são dois espaçadores internos transcritos (*Internal Transcribed Spacers*) (Hillis & Dixon, 1991).

A diversidade intra-genômica das seqüências dos genes do DNAr pode ser extremamente conservada, sugerindo que estas entidades não evoluiriam independentemente, como explicado pela “evolução em concerto” (Arnheim, 1983, Elder & Turner, 1995; Liao, 1999). Isto permitiria o uso destas seqüências sem grandes problemas quanto à sua homologia. Contudo, o mais indicado é que antes de qualquer reconstrução filogenética se estime o grau de homoplasia produzido pela variação intra-genômica de marcadores que potencialmente sofreriam evolução em concerto (Hillis & Davis, 1988; ver também Wörheide *et al.*, 2004b).

Extremamente conservado em estrutura e possivelmente em função ao longo da evolução da vida, os RNAr, e particularmente o 18 S (SSU), tornaram-se os marcadores moleculares mais comumente utilizados para estabelecer relações filogenéticas entre organismos. Mutações nas regiões centrais conservadas dos RNAr são pesadamente direcionadas na direção de substituição de nucleotídeos relativamente as deleções e inserções (*indels*). Isso, juntamente com a existência de uma estrutura secundária universal, facilita consideravelmente o processo de alinhamento. Foi a partir de filogenias moleculares com base nas sequências dos RNAr que se chegou a conclusão da existência dos três domínios da vida: Bacteria, Archaea e Eukarya (Woese *et al.*, 1990).

### 18 S

O 18 S, RNAr da subunidade menor do ribossomo (SSU), dos principais marcadores filogenéticos, é talvez um dos menos utilizados em esponjas, e raramente sozinho. A literatura possui casos de excelentes resultados para investigação de relações inter-filos até inter-gêneros. O marcador possui regiões com diferentes taxas evolutivas, como normalmente encontrado em 28 S, *cox1* e muitos outros marcadores, sendo, desta forma, versátil para diferentes níveis de abordagem (gêneros, famílias, ordens, etc), e uma ferramenta disponível e que deve ser utilizada.

Zrzavý *et al.* (1998) estudou relação entre filos, empregando tanto 18 S quanto dados morfológicos. Os resultados foram interessantes, porém, a topologia apresentada foi posteriormente considerada conservadora. Medina *et al.* (2001), utilizando seqüências completas de 18 S e 28 S, considerou este hábil para estudos interfilo, cujos resultados são mais consistentes quando utilizados seqüências completas e associadas à 28 S. Borchiellini *et al.* (2004b), tal como Medina *et al.* (2001), considera o uso de

seqüências completas preferível e encontrou forte congruência entre as topologias geradas por 18 S e 28 S para relações de interordem.

Kober & Nichols (2007) utilizando seqüências completas e parciais de 18 S e 28 S apresentaram uma topologia com forte suporte para famílias, apesar do estudo ter como objetivo principal entender a relação das ordens Poecilosclerida e Hadromerida. Desta forma os marcadores mostraram-se excelentes para o nível de família.

Redmond *et al.* (2007) considera o 18 S uma marcador com grande potencial e versatilidade. Redmond & McCormarck (2008) estudaram essas regiões variáveis em Haplosclerida (grupos marinhos) afim de comparar os indels (inserções e deleções), estes foram suficientes em fornecer dados suficientes para os autores contestarem a atual organização em subordens.

## 28S

Maior gene do RNA ribossomal, o 28S tem sido repetidamente utilizado como marcador filogenético, apresentando diferentes resultados, em parte por possuir diferente taxas evolutivas ao longo de suas várias regiões cerne e segmentos de expansão (para a descrição dos domínios do 28 S ver Hancock *et al.*, 1988). Enquanto as regiões cerne (core, C) do 28 S podem ser bastante conservadas estruturalmente ao longo da árvore da vida, os domínios de expansão (expansion domains, D) podem variar enormemente, mesmo entre linhagens recentes (Hillis & Dixon, 1991).

Medina *et al.* (2001) estudando grandes grupos considerou que seqüências completas de 28 S, quando associadas a 18 S, são hábeis em elucidar filogenias de filos e classes, sendo 18 S mais resiliente em formar agrupamentos anômalos.

McCormarck *et al.* (2002) empreitou uma análise filogenética da ordem Haplosclerida (Demospongiae) utilizando seqüências parciais de 28 S. Como resultado,

os autores consideraram o conjunto de dados utilizado pequeno, e o resultado incongruente com topologias moleculares previamente apresentadas. Além disso, consideraram a região D3 extremamente variável, excluindo grande parte de sua seqüência por mostrarem alinhamento pouco confiável. Entretanto os autores argumentam que esta região parece possuir uma taxa de substituição mais acelerada na ordem Haplosclerida, que nas demais ordens de Demospongiae. Em contra partida Alvarez *et al.* (2000) considerou a região D3 sensível para explicitar novos agrupamentos dentro da família Axinellidae. Contudo, Barucca *et al.* (2007), numa tentativa preliminar em reconstruir as relações filogenéticas de Clionidae, considera que a região D2 seja mais variável que a D3, e desta forma mais apropriada para filogenias de famílias.

Nichols (2005), estudando o suporte monofilético da classe Demospongiae e suas ordens, utilizou seqüências parciais de 28 S, obtendo agrupamentos anômalos, tal como McCormack *et al.* (2002), e considerou este menos sensível que *cox1* ou dados combinados dos dois marcadores (28 S parcial + *cox1*). Entretanto Nichols (2005) não descreve quais domínios são abrangidos pelos primer utilizados por ele, apenas explana que com base em seqüências completas publicadas em Medina *et al.* (2001) a região mostra-se suficiente variável para responder a sua pergunta.

Borchiellini *et al.* (2004b) considerou sequencias parciais de 28 S menos hábil que 18 S em resolver relações inter-ordens de Demospongiae, resultado semelhante, como previamente apresentado em Medina *et al.* (2001). Chombard *et al.* (1998) estudando a filogenia de Tetractinellida obteve resultados consistentes e com suporte morfológico. Estes autores utilizaram as regiões C1, D1, C2, D2 sendo esta última muito variável, bem como a região D8.

Erpenbeck *et al.* (2007f) obteve bons resultados utilizando as regiões C1-D1 para determinar a filogenia de Raspailiidae (Demospongiae: Poecilosclerida: Microcionina). Previamente Borchiellini *et al.* (2000) em revisão mostra que as quatro primeiras regiões do LSU foram muito utilizadas com bons resultados. Sendo que a região D2, pela sua alta variabilidade, seria recomendada para categorias taxonômicas mais inferiores, contrariamente às regiões C1-D1-C2, indicadas para categorias superiores.

Apesar das diversas críticas a respeito do uso de seqüências parciais de 28 S (Borchiellini *et al.*, 2000; Boury-Esnault *et al.*, 2006), estas se mostraram excelentes marcadores filogenéticos, desde que seja escolhida uma região com taxa de evolução congruente com a pergunta a ser repondida e o objeto de estudo.

O uso do 28 S em análises filogenéticas, por possuir diferentes taxas evolutivas e diferenças em sua estrutura secundária, pode causar um viés no resultado das análises, e como medida sensata, Erpenbeck *et al.* (2004b) sugerem que a estrutura secundária do DNAr seja usada no alinhamento das seqüências. Ainda, eles indicam que mais de um gene seja utilizado, a fim de produzir topologias mais robustas, contanto que sejam mutuamente independentes.

### *Genes mitocondriais*

A mitocôndria é uma organela citoplasmática relacionada com a produção da maior parte da energia nas células não-fotossintetizantes e possui seu próprio genoma. As células humanas contêm algumas centenas de mitocôndrias que se autoduplicam e, durante a divisão mitótica, segregam-se ao acaso entre as células-filhas. Cada mitocôndria apresenta até 10 cópias de um cromossomo circular, o cromossomo

mitocondrial, e como existem diversas mitocôndrias por célula, existem diversos genomas de organela por célula.

O DNAmít é normalmente herdado na forma haplóide sempre da célula materna (transmissão uniparental matrilinear). Um efeito da herança materna é que a seqüência de DNAmít é mais sensível do que o DNA nuclear (cuja herança é diplóide, exceto nas células germinativas e nos cromossomos X e Y) ao processo de coalescência (ver Hudson, 1991). Visto que o DNAmít não recombina (não existem cromossomos homólogos) e é herdado uniparentalmente, ele contém informação filogenética e o tempo de ancestralidade compartilhada (ou monofiletismo recíproco) é  $\frac{1}{4}$  do esperado para genes nucleares. A ausência de recombinação faz com que o genoma mitocondrial comporte-se como uma única entidade herdável (efetivamente um locus único com alelos múltiplos).

O DNAmít é bastante utilizado para reconstruções filogenéticas e estudos em Sistemática, notadamente os genes do RNAr mitocondrial (16 S e 12 S), com seqüências de nucleotídeos de evolução lenta, a subunidade I da Citocromo c oxidase (*coxI*), e o Citocromo b (*cytb*), que possuem regiões conservadas e variáveis.

### cox1

A Citocromo c oxidase é uma enzima chave no metabolismo aeróbico promovendo bombeamento de prótons, a qual é composta por várias subunidades. O gene da subunidade I da Citocromo c oxidase (*coxI* ou COI) é mitocondrialmente codificado e possui aproximadamente 1500 pb. Poucos trabalhos utilizam a seqüência completa de *coxI*, e praticamente nenhum deles possui como objetivo inferência evolutiva ou sistemática, sendo este utilizado quase sempre parcialmente. Desta forma,

costuma-se referir na literatura a segmentos ou regiões de *cox1*, o que não implica em divisões estruturais na molécula, como no caso de 28 S, por exemplo.

A região “Folmer”, em referência ao primeiro autor do trabalho de publicação de primers universais para invertebrados, largamente utilizados (Folmer *et al.*, 1994), se localiza na extremidade 5' do gene *cox1*. A região possui ca. 640 pb na maioria dos grupos, e é rodeada de regiões de seqüências conservadas, o que a torna fácil de isolar e analisar. O Sistema de identificação microgenômica *DNA Barcoding*, que tem como pretensão a discriminação de todas as espécies vivas através da utilização de um marcador molecular padrão, tem, por meio de seu concórcio internacional iBoL (International Barcode of Life, <http://ibol.org>), promovido a região “Folmer” como segmento padrão para a maior parte dos grupos de animais (Herbert *et al.*, 2003). Esta abordagem representa uma estratégia extremamente promissora para o diagnóstico da biodiversidade, embora haja um intenso debate a respeito dos benefícios e problemas nesta iniciativa de pesquisa (e.g., Solé-Cava & Wörheide, 2007). O projeto *Sponge Barcoding* (<http://www.spongebarcoding.org>) vem apoiando tecnicamente e estimulando a utilização deste gene (Wörheide *et al.*, 2007).

Um crescente número de estudos demonstrou que seqüências de *cox1* de espécies estreitamente relacionadas diferem o suficiente para identificar espécies com alta confiança. Contudo, argumenta-se que a região utilizada pelo *Barcode of Life* fragmento não apresenta variabilidade suficiente em Porifera (Duran & Rützler 2006, Wörheide 2006), e outra região adjacente com alta taxa de substituição é sugerida (Erpenbeck *et al.*, 2005c). A chamada região “I3-M11”, de cerca de 1100 pares de bases apresenta um alto número de sítios variáveis.

Erpenbeck *et al.* (2007e) produziram uma árvore baseada em *cox1*, região “Folmer”, utilizando esponjas do Caribe, com intuito de avaliar a posição e inter-relações

das classes de Demospongiae. Segundo estes autores este marcador além de corroborar agrupamentos previamente demonstrados utilizando 28 S, abriu novas perspectivas no cenário da taxonomia de Porifera. Entretanto, o marcador não foi hábil em resolver questões mais profundas, pois sua resolução é baixa.

Em contrapartida, Erpenbeck *et al.* (2006a) e Huang *et al.* (2008) argumentam que *cox1* sofre uma evolução mais lenta em esponjas, e, desta forma, é adequado como marcador informativo desde o nível de espécie até família, sendo que os primeiros recomendam o uso de uma região adjacente supostamente mais variável em metazoários basais (“I3-M11”, 3’ *downtream* à região “Folmer”) . Raleigh *et al.* (2007), utilizando a região “I3-M11”, realizou uma análise filogenética da ordem Haplosclerida, a fim de testar os agrupamentos revelados por trabalhos prévios com 18 S e 28 S, encontrando muitos agrupamentos congruentes. Os autores recorrentemente afirmam que em seus dados, a região “I3-M11” é capaz de resolver relações intra e inter-genéricas e intra-familiares. Contudo, a variabilidade entre as regiões “Folmer” e “I3-M11” de *cox1* devem ser mais profundamente analisadas, uma vez que podem variar marcadamente entre diferentes grupos taxonômicos (de Paula, pers. obs.)

### Genoma mitocondrial

Os genes do genoma mitocondrial podem ser utilizados como marcadores moleculares em Porifera. Estudos recentes em esponjas mostraram que o DNAmit desses organismos apresenta tamanho em torno de 16,4 - 28,9 Kpb e uma grande variação na quantidade de genes: de 18 a 44. Em geral, além dos 37 genes típicos de mamíferos, algumas esponjas apresentam genes extras de RNAt e um gene para subunidade 9 (subunidade c) da ATP sintase (Figura 2) (Lavrov *et al.*, 2005; Wang & Lavrov, 2008). Todos os genes apresentam a mesma orientação transcricional e não há



presença de íntrons, com raras exceções. Entretanto, em contraste com os demais metazoários, a distribuição de nucleotídeos não codificantes é mais regular (Lavrov *et al.*, 2005).

O genoma mitochondrial da esponja *Oscarella carmela* contém genes extras, incluindo o *tatC*, um gene da subunidade c da translocase da Arginina, que não é encontrado em nenhum outro DNAmít animal (Wang & Lavrov, 2008). Em contrapartida, o DNAmít de *Plakortis angulospiculatus*, outra esponja, possui apenas seis genes de RNAt, e contém dois íntrons tipo 1 na *coxI* (este foi o segundo relato de íntrons no DNAmít de esponjas, Lavrov *et al.*, 2008). Genomas mitocondriais das ordens Dendroceratida, Dictyoceratida, e Verticillitida, de Demospongiae, possuem apenas dois genes RNAt (*trnM(cau)* e *trnW(uca)*) e possuem um conteúdo gênico praticamente idêntico ao de indivíduos do filo Cnidaria (Beagley *et al.*, 1995; Shao *et al.*, 2006).

Em Demospongiae, o número extremamente variável (de 2 a 27 genes) de RNAts é consequência de perdas frequentes ou duplicações nos genes de RNAt. A maioria das espécies também exibe um iniciador e prolongador distinto, o RNAt-Met (Gissi *et al.*, 2008). A partir do estudo das diferenças entre o DNAmít de esponjas e de outros grupos animais busca-se obter informações úteis na reconstrução filogenética e no esclarecimento das relações dos animais. Dezesete genomas mitocondriais completos de diferentes esponjas foram publicados por Wang & Lavrov (2008) e nos dois anos seguintes, outros dez genomas completos foram depositados no *Genbank*.

Segundo Gissi *et al.* (2008), Porifera está entre os nove filos que possuem grande variabilidade na arquitetura de seu genoma mitochondrial, que leva em consideração tanto o conteúdo do gene (sequência), quanto a sua ordem no genoma. A arquitetura do DNAmít consiste na ordem de todo o conjunto de genes codificantes

funcionais, incluindo genes duplicados e raros. A observação da grande variabilidade na arquitetura do DNAmít em vários grupos distantes filogeneticamente indica que a aceleração na taxa de rearranjos genômicos ocorreu de maneira independente várias vezes na história evolutiva dos metazoários. E sugere ainda que as causas desse aumento da taxa possam ser investigadas por meio da análise de características fisiológicas e metabólicas comuns aos táxons distantes que compartilham o mesmo padrão evolutivo (Gissi *et al.*, 2008).

Embora esteja claro que genes codificantes de proteínas são menos móveis que genes de RNAt, isto pode ocorrer tanto devido a diferenças no tamanho quanto a diferenças seletivas – a probabilidade de um rearranjo gênico mitocondrial ser letal ou uma desvantagem seletiva (e.g., por não englobar o gene todo) pode ser muito maior para um gene grande do que para um pequeno (Dowton *et al.*, 2009).

A relativa raridade de rearranjos genômicos faz estes caracteres muito atrativos como fontes de dados filogenéticos (Wang *et al.*, 2002). Comparar os arranjos dos genomas mitocondriais é uma boa ferramenta para inferir relações filogenéticas (Boore & Brown, 1998; Boore, 1999). O grande número de possíveis rearranjos gênicos em poríferos sugere que é improvável que tenha havido uma convergência na ordem dos genes (Lavrov & Lang, 2005a).

Atualmente, existem 27 genomas mitocondriais completos disponíveis no GenBank, e muitos mais a serem publicados (D. Lavrov, pers. comm.).

#### *Outros marcadores moleculares*

Alguns marcadores moleculares foram tão esporadicamente utilizados em esponjas que dificilmente se pode estabelecer alguma discussão a respeito desses resultados. Contudo, vale a pena ressaltar seu uso e as conclusões obtidas pelos autores.

As proteínas de choque térmico (Hsp) foram utilizadas por Borchiellini *et al.* (1998) para inferir a relação filogenética entre os diploblastos. Os autores justificam o uso do marcador pela sua ubiquidade e conservatividade em eucariotos. Neste estudo, a filogenia de eucariotos utilizando Hsp70 resultou numa monofilia entre os diploblastos, unindo Porifera, Cnidária e Ctenophora num mesmo clado.

Schröder *et al.* (2003) utilizaram o intron-2 do gene da tubulina para reconstruir a relação filogenética entre as esponjas endêmicas do lago Baikail, além do marcador *cox1*. Embora *cox1* tenha se mostrado muito conservativo, não tendo apresentado resolução suficiente para resolver a relação entre boa parte das espécies, o intron-2 da tubulina foi capaz de resolver as relações internas entre estas esponjas, que constituem um grupo monofilético.

Erpenbeck *et al.* (2005a) caracterizaram e testaram a adequação do fator de alongamento 1 alfa (Ef1a) como marcador filogenético em demosponjas. Os autores aconselham cautela no uso do marcador devido à abundante contaminação nas amplificações realizadas em seu trabalho. Concluem, ainda, que este não deva ser utilizado para resolver relações filogenéticas profundas, embora possam suportar relações ao nível de família. Os autores argumentam também que este marcador possivelmente apresenta conflito em seu sinal filogenético, ao invés de não tê-lo, uma vez que o comprimento de ramos sem suporte filogenético muitas das vezes excede o de ramos com suporte.

Alguns marcadores recentes em esponjas estão começando a aparecer por meio de abordagens multi-*loci* (a utilização de mais de um marcador a fim de se obter maior suporte nas análises ou confrontar diferentes histórias evolutivas). Entre estes se destacam: a subunidade 8 da ATP-sintetase (*atp8*) (Xavier *et al.*, 2010), os espaçadores

mitocondriais (Erpenbeck *et al.*, 2009; T.S. de Paula, unpub. data), e o gene 16 S do RNAr mitocondrial (Dohrmann *et al.*, 2008)

### ITS

Os espaçadores internos transcritos (ITS) dos genes que codificam para o RNAr (ver acima), por não possuir função gênica, servindo apenas como um separador entre os genes dos RNAr, postuladamente, apresentam altas taxas evolutivas. Existem dois espaçadores no DNAr, o ITS1 e o ITS2, com taxas de evolução diferentes entre si, variando de organismo para organismo, embora o ITS2 comumente pareça ser mais variável (ref.).

Embora tenha sido muito utilizado para filogenias em níveis taxonômicos basais e filogeografia de diversos eucariotos (Van Oppen *et al.*, 2000; Coleman, 2003), em esponjas, contudo, o uso deste marcador para estudos filogenéticos é limitado a poucos trabalhos (ver Tabela 1), sendo majoritariamente empregado para estudos populacionais. A maioria destes trabalhos demonstrou que os ITS apresentam velocidade de acúmulo de mutações apropriada para estudar relações de esponjas em nível de espécie e para diferenciação de complexos de espécies (espécies crípticas). Contudo, por se apresentarem em cópias múltiplas no genoma dos eucariotos, algum grau de variação intra-genômica pode existir, a onde utilização desta região em análises filogenéticas em outros níveis deve ser cuidadosamente considerada (Wörheide *et al.*, 2004b).

### SRTs

As seqüências curtas repetidas *in tandem* (do inglês *short tandem repeats*, STR), ou micros-satélites, apresentam repetições com unidade básica de 2-6 pares de base e o

polimorfismo. Micro-satélites são tipicamente neutros e co-dominantes, e são normalmente utilizados como marcadores moleculares para estudos de parentesco ou clonalidade, populações, e outros. Um exemplo comum de micro-satélite é a repetição de  $(CA)_n$ , na qual  $n$  é uma variável entre alelos. Estes marcadores muitas vezes apresentam altos níveis de polimorfismo inter- e intra-específico, principalmente quando as repetições destes se repetem dez ou mais vezes (Queller *et al.*, 1993).

Embora sejam marcadores moleculares versáteis, particularmente para análises de populações, os STRs apresentam algumas limitações. Primeiramente, STRs desenvolvidos para uma espécie em particular são específicos, podendo, em alguns casos, ser aplicados apenas a espécies próximas, pois a porcentagem de *loci* amplificados com sucesso decai com o aumento da distância genética (Jarne & Lagoda, 1996). E em segundo lugar, por consistirem de regiões anônimas, não é possível estabelecer nenhum critério de homologia entre os diferentes *loci*, desta forma, único tratamento analítico possível para estes dados é uma abordagem fenética (distância), impossibilitando qualquer reconstrução filogenética a partir destes.

Embora o uso de seqüências repetidas tenha começado a partir de 1985, com o advento da impressão digital de DNA (Jeffreys *et al.*, 1985), somente na última década, com o barateamento do processo de desenvolvimento de primers de micro-satélites, que seu uso em estudos evolutivos e sistemáticos teve uma representatividade considerável. Em esponjas, o seu uso ainda é muito restrito, porém com importantes trabalhos pioneiros demonstrando a utilidade destes marcadores. Somente seis espécies de esponjas já tiveram algum trabalho com descrição ou utilização de micro-satélites como marcador molecular: *Crambe crambe*, *Spongia officinalis*, *Spongia agaricina*, *Scopalina lophyropoda*, *Hymeniacidon sinapium*, *Halichondria panicea*.

Duran *et al.* (2002) foi o primeiro trabalho a reportar micro-satélites em Porifera. Neste trabalho, os autores encontraram uma grande variação entre o número de alelos por *loci* em *C. crambe*, variando de três à 16, e ainda, que nas duas populações analisadas a distribuição dos alelos foi consideravelmente diferentes, indicando uma bem demarcada diferenciação genética entre elas. Numa continuação do trabalho anterior, analisando 11 populações de *C. crambe*, Duran *et al.* (2004b) concluiu que os loci micro-satélites utilizados foram capazes de verificar altos níveis de estrutura populacional entre as localidades e um significativo isolamento por distância, além de encontrar uma forte estrutura genética dentro de cada área.

Hoshino & Fujita (2006) também encontraram uma alta variação no polimorfismo de STRs em *H. sinapium*, que variaram entre dois a 10 alelos, que não desviaram de um modelo de neutralidade com expectativas de Hardy-Weinberg. Contudo, os autores reportaram um significativo desequilíbrio de ligação entre duas de suas amostras (de 24 no total). Em contra-partida, Noyer *et al.* (2009) reportaram alguns loci de STRs em *S. agaricina* que desviaram de Hardy-Weinberg, e um polimorfismo por loci menor, variando de um a sete. Contudo, como reportado por Dailianis & Tsigenopoulos (2010) *S. officinalis* aparentemente apresenta uma diversidade alélica muito maior que *S. agaricina* em seus STRs, que variou cinco a 34 no trabalho desses autores.

Blanquer *et al.* (2009), após análise de STRs, apontam um padrão de forte estrutura genética espacial em pequena escala em *S. lophyropoda*, propiciando um isolamento por distância. Contudo, nenhum endocruzamento foi detectado nas populações analisadas, confirmado descobertas anteriores em invertebrados marinhos que uma forte estrutura genética espacial não necessariamente implica em endocruzamento.

## Conclusões

Embora muitos marcadores moleculares estejam sendo utilizados em estudos evolutivos e sistemáticos em esponjas, muitos trabalhos mais precisam ser conduzidos a fim de podermos avaliar quais marcadores são os mais indicados para cada nível de estudo ou grupo taxonômico (Erpenbeck *et al.*, 2005a). Apesar do uso predominante de determinados marcadores, estes não necessariamente significam que sejam os melhores ou os mais indicados para toda e qualquer análise evolutiva. As abordagens multi-loci tem mostrado que a história genealógica de um único marcador quase sempre não reflete a história completa dos organismos estudados (Brower *et al.*, 1996; Nichols, 2001). Essa abordagem geralmente produz resultados mais robustos e confiáveis, sendo, desta forma, preferíveis em relação a uma abordagem reducionista (Erpenbeck *et al.*, 2006b).

O projeto PortoL (The Porifera Tree of Life), um consórcio internacional cuja pretensão é estabelecer uma filogenia abrangente de Porifera ([www.portol.org](http://www.portol.org)) tem tentado estabelecer uma diretriz para estudos filogenéticos e evolutivos em esponjas utilizando a abordagem multi-loci. Idealmente para o PorToL: 1) estudos de filogenias de táxons basais (como de classes, ordens ou famílias) deveriam ser conduzidas com ao menos nove genes nucleares, genomas mitocondriais completos, e seqüências completas dos genes de RNAr; 2) filogenias de nível taxonômico menores (como famílias pequenas ou evolutivamente recentes e gêneros) deveriam ser reconstruídas com ao menos um gene nuclear, três genes mitocondriais e seqüências completas dos genes do RNAr (R. Thacher, pers. comm., pesquisador líder do PorTol)

Contudo, só porque cada vez mais marcadores moleculares têm sido publicados, e seu uso se tornado cada vez mais abrangente, as análises morfológicas não devem ser

deixadas de lado. Embora a sistemática molecular tenha revolucionado a nossa concepção de alguns grupos (e.g., Aguinaldo *et al.*, 1997), e em esponjas as abordagens moleculares têm trazido novas perspectivas a cerca de sua evolução e biologia (e.g., Müller *et al.*, 2001; Nichols, 2005; Lavrov *et al.*, 2008; ), a morfologia continua sendo imprescindível. Diversos trabalhos têm mostrado que resultados moleculares e morfológicos podem ser congruentes (Chombard & Boury-Esnault, 1999; mas ver Kober & Nichols, 2007), ou que, por meio de uma perspectiva molecular, os dados morfológicos tomam uma nova interpretação (e.g., Chombard *et al.*, 1998, Alvarez *et al.*, 2000; Erpenbeck *et al.*, 2006b; Erwin & Thacker, 2007; Cárdenas *et al.*, 2008)

Recentemente, Erpenbeck *et al.* (2008) lançaram um servidor online para bases de dados filogenéticas geradas por dados moleculares (The Sponge Genetree Server, <http://www.spongegenetrees.org>). Embora ainda em fase de inicial, contando com os esforços individuais de diversos pesquisadores, o projeto prevê estender seu banco de dados a todas as classes de esponjas.

## Referências

- Adams, C.I., McInerney, J.O., Kelly, M., 1999. Indications of relationships between poriferan classes using full-length 18S rRNA gene sequences. *Mem Queensl Mus* 44: 33-43.
- Addis, J.S., Peterson, K.J., 2005. Phylogenetic relationships of freshwater sponges (Porifera, Spongillina) inferred from analyses of 18S rDNA, COI mtDNA, and ITS2 rDNA sequences. *Zool Scr* 34: 549-557.
- Aguinaldo, A.M.A., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A., Lake, J.A., 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387(6632): 489-493.
- Alvarez, B., Crisp, M.D., Driver, F., Hooper, J.N.A., Van Soest, R.W.M., 2000. Phylogenetic relationships of the family Axinellidae (Porifera: Demospongiae) using morphological and molecular data. *Zool Scr* 29: 169-198.
- Alvarez, B., Krishnan, M., Gibb, K., 2007. Analysis of intragenomic variation of the rDNA internal transcribed spacers (ITS) in Halichondrida (Porifera: Demospongiae). *J Mar Biol Ass UK* 87: 1599-1605.



- Arnheim, N., 1983. Concerted evolution of multi-gene families. In: Nei, M., Koehn, R.K. (eds). *Evolution of genes and proteins*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp 38-61.
- Avise, J.C., 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Sinauer Associates, MA. 684 pp.
- Barucca, M, Azzini, F, Bavestrello, G, Biscotti, MA, Calcinai, B, Canapa, A, Cerrano, C, Olmo, E., 2007. The systematic position of some boring sponges (Demospongiae, Hadromerida) studied by molecular analysis. *Mar Biol* 151: 529-535.
- Beagley, C.T., Macfarlane, J.L., Pont-Kingdon, G.A., Okimoto, R., Okada, N., Wolstenholme, D.R., 1995. Mitochondrial genomes of Anthozoa (Cnidaria). *Prog Cell Res* 5: 149-153.
- Belinky, F., Rot, C., Ilan, M., Huchon, D., 2008 The complete mitochondrial genome of the demosponge *Negombata magnifica* (Poecilosclerida). *Mol Phylogenet Evol* 47, 1238-1243.
- Bentlage, B., Wörheide, G., 2007. Low genetic structuring among *Pericharax heteroraphis* (Porifera: Calcarea) populations from the Great Barrier Reef (Australia), revealed by analysis of rDNA and nuclear intron sequences. *Coral Reefs* 26(4): 807-816.
- Bergquist, P.R., 1979. *Sponges*. UC Press, Berkeley. 268 pp.
- Blanquer, A., Uriz, M.-J., Caujape-Castells, J., 2009. Small-scale spatial genetic structure in *Scopalina lophyropoda*, an encrusting sponge with philopatric larval dispersal and frequent fission and fusion events. *Mar Ecol Prog Ser* 380: 95-102.
- Blanquer, A., Uriz, M.-J., 2007. Cryptic speciation in marine sponges evidenced by mitochondrial and nuclear genes: A phylogenetic approach. *Mol Phylogenet Evol* 45(1): 392-397.
- Blanquer, A., Uriz, M.-J., Pascual M (2005) Polymorphic microsatellite loci isolated from the marine sponge *Scopalina lophyropoda* (Demospongiae: Halichondrida). *Mol Ecol Notes* 5: 466-468.
- Boore, J.L., 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27: 1767-80.
- Boore, J.L., Brown, W.M., 1998. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Curr Opin Genet Dev* 8: 668-674.
- Borchiellini, C., Alivon, E., Vacelet, J., 2004a. The systematic (28S) position of *Alectona* (Porifera, Demospongiae): a tetractinellid sponge. *Boll Mus Ist Biol Univ Genova*, 68: 209-217.
- Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Le Parco, Y., 1998. Phylogenetic analysis of the Hsp70 sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Mol Biol Evol* 15: 647-655.
- Borchiellini, C., Chombard, C., Lafay, B., Boury-Esnault, N., 2000. Molecular systematics of sponges (Porifera). *Hydrobiologia* 420: 15-27.
- Borchiellini, C., Chombard, C., Manuel, M., Alivon, E., Vacelet, J., Boury-Esnault, N., 2004b. Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Mol Phylogenet Evol* 32: 823-837.
- Borchiellini, C., Manuel, M., Alivon, E., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Le Parco, Y., 2001. Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *J Evol Biol* 14: 171-179.
- Boury-Esnault, N., 2006. Systematics and evolution of Demospongiae. *Can J Zool* 84: 205-224.
- Boury-Esnault, N., Solé-Cava, A.M., 2004. Recent contributions of genetics to the study of sponge systematics and biology. *Boll Mus Ist Biol Univ Genova* 68: 3-18.
- Brower, A.V.Z., DeSalle, R., Vogler, A., 1996. Gene Trees, Species Trees, and Systematics: A Cladistic Perspective. *Ann Rev Ecol Syst* 27: 423-450.

- Calderon I., Ortega N., Duran S., Becerro M., Pascual M., Turon X., 2007. Finding the relevant scale: clonality and genetic structure in a marine invertebrate (*Crambe crambe*, Porifera). *Mol Ecol* 16(9): 1799-1810.
- Cárdenas, P., Rapp, H.T., Schander, C., Tender, O.S., 2010. Molecular taxonomy and phylogeny of the Geodiidae (Porifera, Demospongiae, Astrophorida) - combining phylogenetic and Linnaean classification. *Zool Scr* 39: 89-106.
- Cavalier-Smith, T., Allsopp, M.T.E.P., Chao, E.E., Boury-Esnault, N., Vacelet, J. 1996. Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Can J Zool* 74: 2031-2045.
- Chombard, C., Boury-Esnault, N., 1999. Good Congruence between morphology and molecular (28S) phylogeny of Hadromerida, or how to bother sponge taxonomists. *Mem Queensl Mus* 44: 100.
- Chombard, C., Boury-Esnault, N., Tillier, A., Vacelet, J., 1997. Polyphyly of "Sclerosponges" (Porifera, Demospongiae) supported by 28S ribosomal sequences. *Biol Bull* 193: 359-367.
- Chombard, C., Boury-Esnault, N., Tillier, S., 1998. Reassessment of homology of morphological characters in tetractinellid sponges based on molecular (28S) data. *Syst Biol* 47(3): 351-366.
- Coleman, A.W., 2003. ITS-2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *T Genet* 19: 370-375.
- Collins, A.G., 1998. Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of Bilateria: An analysis of 18S rRNA molecular evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15458-15463.
- Dailianis, T., Tsigenopoulos, C.S., 2010. Characterization of polymorphic microsatellite markers for the endangered Mediterranean bath sponge *Spongia officinalis* L. *Cons Genet* 11(3): 1155-1158.
- Dohrmann, M., Collins, A., Wörheide, G., 2009. New insights into the phylogeny of glass sponges (Porifera, Hexactinellida): monophyly of Lyssacinosa and Euplectellinae, and the phylogenetic position of Euretidae. *Mol Phylogent Evol* 52: 257-262.
- Dohrmann, M., Janussen, D., Reitner, J., Collins, A., Wörheide, G., 2008. Phylogeny and evolution of glass sponges (Porifera: Hexactinellida). *Syst Biol* 57(3): 388-405.
- Dohrmann, M., Voigt, O., Erpenbeck, D., Wörheide, G., 2006. Non-monophyly of most supraspecific taxa of calcareous sponges (Porifera, Calcarea) revealed by increased taxon sampling and partitioned Bayesian analysis of ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol* 40: 830-843.
- Dowton, M., Cameron, S.L., Dowavic, J.I., Austin, A.D., Whiting, M.F., 2009. Characterization of 67 mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral. *Mol. Biol. Evol.* 26(7): 1607-1617.
- Duran, S., Giribet, G., Turon, X., 2004c. Phylogeographical history of the sponge *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida): range expansion and recent invasion of the Macaronesian islands from the Mediterranean Sea. *Mol Ecol* 13: 109-122.
- Duran, S., Pascual, M., Estoup, A., Turon, X., 2002. Polymorphic microsatellite loci in the sponge *Crambe crambe* (Porifera : Poecilosclerida) and their variation in two distant populations. *Mol Ecol* 2(4): 478-480.
- Duran, S., Pascual, M., Estoup, A., Turon, X., 2004b. Strong population structure in the marine sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) as revealed by microsatellite markers. *Mol Ecol* 13(3): 511-522.

- Duran, S., Pascual, M., Turon, X., 2004a. Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *Mar Biol* 144: 31-35.
- Duran, S., Rützler, K., 2006. Ecological speciation in a Caribbean marine sponge. *Mol Phylogenet Evol* 40: 292-297.
- Elder, J.F. Jr., Turner, B.J., 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol* 70: 297-320.
- Erpenbeck, D., Hooper, J.N.A. & Wörheide, G., 2005c. COI phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life'—are we sequencing a suboptimal partition? *Molecular Ecology Notes*, 6, 550–553.
- Erpenbeck, D., Breeuwer, J., Parra-Velandia, F., Van Soest, R.W.M., 2006b. Speculation with spiculation? Three independent gene fragments and biochemical characters versus morphology in demosponge higher classification. *Mol Phyl Evol* 38: 293-305.
- Erpenbeck, D., Breeuwer, J.A.J., Van der Velde, H.C., Van Soest, R.W.M., 2002. Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. *Mar Biol* 141: 377-386.
- Erpenbeck, D., Breeuwer, J.A.J., Van Soest, R.W.M., 2005a. Identification, characterization and phylogenetic signal of an elongation factor-1 alpha fragment in demosponges (Metazoa, Porifera, Demospongiae). *Zool Scr* 34(4): 437-445.
- Erpenbeck, D., Breeuwer, J.A.J., Van Soest, R.W.M., 2005b. Implications from a 28S rRNA gene fragment for the phylogenetic relationships of halichondrid sponges (Porifera: Demospongiae). *J Zool Syst Evol Res* 43: 93-99.
- Erpenbeck, D., Cleary, D.F.R., Voigt, O., Nichols, S.A., Degnan, B.M., Hooper, J.N.A., Wörheide, G., 2007g. Analysis of evolutionary, biogeographical and taxonomic patterns of nucleotide composition in demosponge rRNA (28S). *J Mar Biol Soc UK* 87(6): 1607-1614.
- Erpenbeck, D., Duran, S., Rützler, K., Paul, V., Hooper, J.N.A., Wörheide, G., 2007e. 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. *J Mar Biol Soc UK* 87(6): 1563-1570.
- Erpenbeck, D., Hooper, J.N.A., List-Armitage, S.E., Degnan, B.M., Wörheide, G., Van Soest, R.W.M., 2007b. Affinities of the family Sollasellidae (Porifera, Demospongiae) II Molecular evidence. *Contr Zool* 76: 95-102.
- Erpenbeck, D., Hooper, J.N.A., Wörheide, G., 2006a. CO1 phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life' — are we sequencing a suboptimal partition? *Mol Ecol Notes* 6: 550-553.
- Erpenbeck, D., Knowlton, A.L., Talbot, S.L., Highsmith, R.C., Van Soest, R.W.M., 2004a. A molecular comparison of Alaskan and North East Atlantic *Halichondria panicea* (Pallas 1766) (Porifera: Demospongiae) populations. *Boll Mus Ist Biol Univ Genova* 68: 319-325.
- Erpenbeck, D., List-Armitage, S.E., Alvarez, B., Degnan, B.M., Hooper, J.N.A., Wörheide, G., 2007f. The systematics of Raspailiidae (Demospongiae, Poecilosclerida, Microcionina) reanalysed with a ribosomal marker. *J Mar Biol Soc UK* 87(6): 1571-1576.
- Erpenbeck, D., McCormack, G.P., Breeuwer, J.A.J., Van Soest, R.W.M., 2004b. Order level differences in the structure of partial LSU across demosponges (Porifera): New insights into an old taxon. *Mol Phylogenet Evol* 32(1), 388 -395.

- Erpenbeck, D., Nichols, S.A., Voigt, O., Dohrmann, M., Degnan, B.M., Hooper, J.N.A., Wörheide, G., 2007c. Phylogenetic Analyses Under Secondary Structure-Specific Substitution Models Outperform Traditional Approaches: Case Studies with Diploblast LSU. *J Mol Evol* 64(5): 543-557.
- Erpenbeck, D., Voigt, O., Adamski, M., Adamska, M., Hooper, J.N.A., Wörheide, G., Degnan, B.M. 2007d. Mitochondrial diversity of early-branching Metazoa is revealed by the complete mt genome of a haplosclerid demosponge. *Mol Biol Evol* 24: 19-22.
- Erpenbeck, D., Voigt, O., Gültas, M., Wörheide, G., 2008. The Sponge Genetree Server – providing a phylogenetic backbone for poriferan evolutionary studies. *Zootaxa* 1939: 58-60.
- Erpenbeck, D., Voigt, O., Wörheide, G., Lavrov, D.V., 2009. The mitochondrial genomes of sponges provide evidence for multiple invasions by repetitive hairpin-forming elements (RHE). *BMC Genomics* 10: 591.
- Erpenbeck, D., Wörheide, G., 2007. On the molecular phylogeny of sponges (Porifera). *Zootaxa* 1668: 107–126.
- Erwin, P.M., Thacker, R.W., 2007. Phylogenetic analyses of marine sponges within the order Verongida: a comparison of morphological and molecular data. *Invert Biol* 126: 220-234.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3(5): 294-299.
- Gazave, E., Carteron, S., Chenuil, A., Richelle-Maurer, E., Boury-Esnault, N., Borchiellini, C., 2010a. Polyphyly of the genus *Axinella* and of the family Axinellidae (Porifera: Demospongiae) *Mol Phylogenet Evol* 57: 35-47.
- Gazave, E., Lapébie, P., Renard, E., Vacelet, J., Rocher, C., Ereskovsky, A.V., Lavrov, D.V., Borchiellini, C., 2010b. Molecular Phylogeny Restores the Supra-Generic Subdivision of Homoscleromorph Sponges (Porifera, Homoscleromorpha). *PLoS One* 5(12): e14290.
- Gerasimova, E., Erpenbeck, D., Plotkin, A., 2008. *Vosmaeria* Fristedt, 1885 (Porifera, Demospongiae, Halichondriidae): revision of species, phylogenetic reconstruction and evidence for split. *Zootaxa* 1694: 1-37.
- Gissi, C., Iannelli, F., Pesole, G., 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* 101: 301-320.
- Haen, K.M., Lang, B.F., Pomponi, S.A., Lavrov, D.V., 2007. Glass sponges and bilaterian animals share derived mitochondrial genomic features: A common ancestry or parallel evolution? *Mol Biol Evol* 24: 1518-1527.
- Hancock, J.M., Tautz, D., Dover, G.A., 1988. Evolution of the Secondary Structures and Compensatory Mutations of the Ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 5(4): 393-414.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270: 313–321.
- Heim, I., Nickel, M., Brümmer, F., 2007a. Molecular markers for species discrimination in poriferans: a case study on species of the genus *Aplysina* In: Custódio, M.R., Lôbo-Hajdu, G., Hajdu, E., Muricy, G. (eds). *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Série Livros 28. Museu Nacional, Rio de Janeiro. p 361-371.

- Heim, I., Nickel, M., Brümmer, F., 2007c. Phylogeny of the genus *Tethya* (Tethyidae: Hadromerida: Porifera): molecular and morphological aspects. *J Mar Biol Ass UK*, 87: 1615-1627.
- Heim, I., Nickel, M., Picton, B., Brümmer, F., 2007b. Description and molecular phylogeny of *Tethya hibernica* sp nov (Porifera, Demospongiae) from Northern Ireland with remarks on the European species of the genus *Tethya*. *Zootaxa*, 1595: 1-15.
- Hillis, D.M., Davis, S.K., 1988. Ribosomal DNA: Intraspecific polymorphism, concerted evolution and phylogeny reconstruction. *Syst Zool* 32: 63-66.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411-453.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (eds), 1996. *Molecular Systematics*, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 655 pp.
- Hoshino, S., Fujita, T., 2006. Isolation of polymorphic microsatellite markers from *Hymeniacidon sinapium* (Porifera : Demospongiae : Halichondrida). *Mol Ecol Notes* 6(3): 829-831.
- Hoshino, S., Saito, D.S., Fujita, T., 2008. Contrasting genetic structure of two Pacific *Hymeniacidon* species. *Hydrobiologia* 603: 313-326.
- Huang, D., Meier, R., Todd, P.A., Chou, L.M., 2008. Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *J Mol Evol*, 66(2): 167-74.
- Hudson, R.R., 1991. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surv Evol Biol* 7: 1-44.
- Itskovich, V., Belikov, S., Efremova, S., Masuda, Y., Perez, T., Alivon, E., Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., 2007. Phylogenetic relationships between freshwater and marine Haplosclerida (Porifera, Demospongiae) based on the full length 18S rRNA and partial COXI gene sequences. In: Custódio, M.R., Lôbo-Hajdu, G., Hajdu, E., Muricy, G. (eds). *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Série Livros 28. Museu Nacional, Rio de Janeiro. p 383-391.
- Itskovich, V.B., Belikov, S.I., Efremova, S.M., Masuda, Y., 1999. Phylogenetic relationships between Lubomirskiidae, Spongillidae and some marine sponges according partial sequences of 18S rDNA. *Mem Queensl Mus* 44: 275-280.
- Itskovich, V.B., Belikov, S.I., Efremova, S.M., Masuda, Y., Krasko, A., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., 2006. Monophyletic origin of freshwater sponges in ancient lakes based on partial structures of COXI gene. *Hydrobiologia* 568: 155-159.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *T Ecol Evol* 11: 424-429.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- Kelly-Borges, M., Bergquist, P.R., Bergquist, P.L., 1991. Phylogenetic relationships within the order Hadromerida (Porifera, Demospongiae, Tetractinomorpha) as indicated by ribosomal-RNA sequence comparisons. *Biochem Syst Ecol* 19: 117-125.
- Kelly-Borges, M., Pomponi, S.A., 1994. Phylogeny and classification of lithistid sponges (Porifera: Demospongiae): a preliminary assessment using ribosomal DNA sequence comparisons. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 87-103.
- Kim, J.H., Kim, W., Cunningham, C.W., 1999. A new perspective on lower metazoan relationships from 18S rDNA sequences. *Mol Biol Evol* 16: 423-427.

- Knowlton, A.L., Pierson, B.J., Talbot, S.L., Highsmith, R.C., 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci in the intertidal sponge *Halichondria panacea*. *Mol Ecol Notes* 3: 560-562.
- Knowlton, N., 1993. Sibling species in the sea. *Ann Rev Ecol Syst* 24: 189-216.
- Kober, K.M., Nichols, S.A., 2007. On the phylogenetic relationships of hadromerid and poecilosclerid sponges. *J Mar Biol Assoc* 87(6): 1585- 1598.
- Lafay, B., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Christen, R., 1992. An analysis of partial 28S ribosomal RNA sequences suggests early radiation of sponges. *BioSystems* 28: 139-151.
- Lavrov, D.V., 2010. Rapid proliferation of repetitive palindromic elements in mtDNA of the endemic Baikalian sponge *Lubomirskia baicalensis*. *Mol Biol Evol* 27(4):757-760.
- Lavrov, D.V., Forget, L., Kelly, M., Lang, B.F., 2005. Mitochondrial genomes of two demosponges provide insights into an early stage of animal evolution. *Mol Biol Evol* 22: 1231-1239.
- Lavrov, D.V., Kelly, M., Wang, X., 2008. Reconstructing Ordinal Relationships in the Demospongiae Using Mitochondrial Genomic Data. *Mol Phylogenet Evol*, 49: 111-124.
- Lavrov, D.V., Lang, B.F., 2005a. Poriferan mtDNA and animal phylogeny based on mitochondrial gene arrangements. *Syst Biol* 54: 651-659.
- Lavrov, D.V., Lang, B.F., 2005b. Transfer RNA gene recruitment in mitochondrial DNA. *Trends Genet* 21: 129-33.
- Liao, D., 1999. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Am J Hum Genet* 64: 24-30.
- Lôbo-Hajdu, G., Guimarães, A.C.R., Salgado, A., Lamarão, F.R.M., Vieiralves, T., Mansure, J.J., Albano, R.M., 2004. Intragenomic, intra and interspecific variation in the rDNA ITS of Porifera revealed by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Boll Mus Inst Biol Univ Genova*, 68: 413-423.
- Lopez, J.V., Peterson, C.L., Willoughby, R., Wright, A.E., Enright, E., Zoladz, S., Reed, J.K., Pomponi, S.A., 2002. Characterization of genetic markers for *in vitro* cell line identification of the marine sponge *Axinella corrugate*. *J Hered*: 93: 27-36.
- López-Legentil, S., Erwin, P.M., Henkel, T.P., Loh, T.-L., Pawlik, J.R., 2010. Phenotypic plasticity in the Caribbean sponge *Callyspongia vaginalis* (Porifera: Haplosclerida). *Sci. Mar.* 74(3): 445-453.
- López-Legentil, S., Pawlik, J.R., 2009. Genetic structure of the Caribbean giant barrel sponge *Xestospongia muta* using the I3-M11 partition of COI. *Coral Reefs*, 28: 157-165.
- Lukic-Bilela, L., Brandt, D., Pojskic, N., Wiens, M., Gamulin, V., Muller, W.E., 2008. Mitochondrial genome of *Suberites domuncula*: palindromes and inverted repeats are abundant in non-coding regions. *Gene* 412: 1-11.
- Manuel, M., Borchiellini, C., Alivon, E., Le Parco, Y., Vacelet, J., Boury-Esnault, N., 2003. Phylogeny and evolution of calcareous sponges: Monophyly of Calcinea and Calcaronea, high level of morphological homoplasy, and the primitive nature of axial symmetry. *Syst Biol* 52: 311-333.
- McCormarck, G.P., Erpenbeck, D., Van Soest, R.W.M., 2002. Major discrepancy between phylogenetic hypotheses based on molecular and morphological criteria within the order Haplosclerida (Phylum Porifera: Class Demospongiae). *J Zool Syst Evol Res* 40: 237-240.

- McCormack, G.P., Kelly, M., 2002. New indications of the phylogenetic affinity of *Spongosorites suberitoides* Diaz *et al.*, 1993 (Porifera, Demospongiae) as revealed by 28S ribosomal DNA. *J Nat Hist* 36: 1009-1021.
- McInerney, J.O., Adams, C.I., Kelly, M., 1999. Phylogenetic resolution potential of 18S and 28S rRNA genes within the lithistid Astrophorida. *Mem Queensl Mus* 44: 343-351.
- Medina, M., Collins, A.G., Silberman, J.D., Sogin, M.L., 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9707-9712.
- Meixner, M.J., Lüter, C., Eckert, C., Itskovich, V., Janussen, D., Von Rintelen, T., Bohne, A.V., Meixner, J.M., Hess, W.R., 2007. Phylogenetic analysis of freshwater sponges provide evidence for endemism and radiation in ancient lakes. *Mol Phylogenet Evol* 45: 875-886.
- Müller, W.E.G., Schröder, H.C., Skorokhod, A., Bünz, C., Müller, I.M., Grebenjuk, V.A., 2001. Contribution of sponge genes to unravel the genome of the hypothetical ancestor of Metazoa (Urmetazoa). *Gene* 276: 161-173.
- Nichols, R., 2001. Gene trees and species trees are not the same. *T Ecol Evol* 16(7): 358-364.
- Nichols, S.A., 2005. 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. *Mol Phylogenet Evol* 34 (1): 81-96.
- Nichols, S.A., Barnes, P.A.G., 2005. A molecular phylogeny and historical biogeography of the marine sponge genus *Placospongia* (Phylum Porifera) indicate low dispersal capabilities and widespread crypsis. *J Exp Mar Biol* 323: 1-15.
- Nichols, S.A., Wörheide, G., 2005. Sponges: New views on old animals. *Integr Comp Biol* 45(2): 333-334.
- Noyer, C., Agell, G., Pascual, M., Becerro, M.A., 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci from the endangered Mediterranean sponge *Spongia agaricina* (Demospongiae: Dictyoceratida). *Cons Genet* 10(6): 1895-1898.
- Park, M.H., Sim, C.J., Baek, J., Min, G.S., 2007. Identification of genes suitable for DNA barcoding of morphologically indistinguishable Korean Halichondriidae sponges. *Mol Cells* 23: 220-227.
- Pöppe, J., Sutcliffe, P., Hooper, J.N.A., Wörheide, G., Erpenbeck, D., 2010. COI barcoding reveals new clades and radiation patterns of Indo-Pacific sponges of the family Irciniidae (Demospongiae: Dictyoceratida). *PLoS ONE* 5(4): e9950.
- Queller, D.C., Strassman, J.E., Hughes, C.R., 1993. Microsatellites and Kinship. *T Ecol Evol* 8: 285-288.
- Raleigh, J., Redmond, N.E., Delahan, E., Torpey, S., Van Soest, R.W.M., Kelly, M., McCormack, G.P., 2007. Mitochondrial Cytochrome oxidase 1 phylogeny supports alternative taxonomic scheme for the marine Haplosclerida. *J Mar Biol Ass UK* 87: 1577-1584.
- Redmond, N.E., Van Soest, R.W.M., Kelly, N., Raleigh, J., Travers, S.A.A., McCormack, G.P., 2007. Reassessment of the classification of the Order Haplosclerida (Class Demospongiae, Phylum Porifera) using 18S rRNA gene sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 43: 344-352.
- Redmond, N.E., McCormack, G.P., 2008. Large expansion segments in 18S rDNA support a new sponge clade (Class Demospongiae, Order Haplosclerida). *Mol Phylogenet Evol* 47: 1090-1099.

- Richelle-Maurer, E., Boury-Esnault, N., Itskovich, V., Manuel, M., Pomponi, S., Vyver, G., Borchiellini, C., 2006. Conservation and phylogeny of a novel family of non-Hox genes of the Antpclass in Demospongiae (Porifera). *J Mol Evol* 63: 222-230.
- Rot, C., Goldfarb, I., Ilan, M., Huchon, D., 2006. Putative cross-kingdom horizontal gene transfer in sponge (Porifera) mitochondria (COI). *BMC Evol Biol* 6: 71.
- Schmitt, S., Hentschel, U., Zea, S., Dandekar, T., Wolf, M., 2005. ITS-2 and 18S rRNA gene phylogeny of Aplysinidae (Verongida, Demospongiae). *J Mol Evol* 60: 327-336.
- Schröder, H.C., Efremova, S.M., Itskovich, V.B., Belikov, S., Masuda, Y., Krasko, A., Müller, I.M., Müller, W.E.G., 2003. Molecular phylogeny of the freshwater sponges in Lake Baikal. *J Zool Syst Evol Res* 41: 80-86.
- Shao, Z., Graf, S., Chaga, O.Y., Lavrov, D.V., 2006. Mitochondrial genome of the moon jelly *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa): a linear DNA molecule encoding a putative DNA-dependent DNA polymerase. *Gene* 381: 92-101.
- Solé-Cava, A.M., Boury-Esnault, N., 1999. Patterns of intra and interspecific genetic divergence in marine sponges. *Mem Queensl Mus* 44: 591-602.
- Solé-Cava, A.M., Wörheide, G., 2007. The perils and merits (or The Good, the Bad and the Ugly) of DNA barcoding of sponges - a controversial discussion. In: Custódio, M.R., Lôbo-Hajdu, G., Hajdu, E., Muricy, G. (eds). *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability. Série Livros 28. Museu Nacional, Rio de Janeiro.* pp. 603-612.
- Usher, K.M., Sutton, D.C., Toze, S., Kuo, J., Fromont, J., 2004. Biogeography and phylogeny of *Chondrilla* species (Demospongiae) in Australia. *Mar Ecol Prog Ser* 270: 117-127.
- Vacelet, J., Borchiellini, C., Perez, T., Bultel-Poncé, V., Brouard, J.-P., Guyot, M., 2000. Morphological, chemical, and biochemical characterization of a new species of sponges without skeleton (Porifera, Demospongiae) from the Mediterranean Sea. *Zoosystema*, 22: 313-326.
- Van Oppen, M., Wörheide, G., Takabayashi, M., 2000. Nuclear markers in evolutionary and population genetic studies of scleractinian corals and sponges. *Proc Int Coral Reef Symp* 1: 131-138.
- Van Soest, R.W.M., Boury-Esnault, N., Hooper, J.N.A., Rützler, K., de Voogd, N.J., Alvarez de Glasby, B., Hajdu, E., Pisera, A.B., Manconi, R., Schoenberg, C., Janussen, D., Tabachnick, K.R., Klautau, M., Picton, B., Kelly, M., 2011. World Porifera database. Available online at <http://www.marinespecies.org/porifera>. Consulted on 2011-01-10.
- Voigt, O., Erpenbeck, D., Wörheide, G., 2008. Molecular evolution of rDNA in early diverging Metazoa: First comparative analysis and phylogenetic application of complete SSU (18S) rRNA secondary structure in Porifera. *BMC Evol Biol* 8: 69.
- Wang, L.S., Jansen, R.K.B., Moret, M., Raubeson, L.A., Warnow, T., 2002. Fast phylogenetic methods for the analysis of genome rearrangement data: an empirical study. *Proc. 7th Pacific Symp Biocomput.* 524–535.
- Wang, X.J., Lavrov, D.V., 2007. Mitochondrial genome of the homoscleromorph *Oscarella carmela* (Porifera, Demospongiae) reveals unexpected complexity in the common ancestor of sponges and other animals. *Mol Biol Evol* 24: 363-373.
- Wang, X.J., Lavrov, D.V., 2008. Seventeen new complete mtDNA sequences reveal extensive mitochondrial genome evolution within the Demospongiae. *PLoS ONE* 3(7): e2723.



- Watkins, R.F., Beckenbach, A.T., 1999. Partial sequence of a sponge mitochondrial genome reveals sequence similarity to Cnidaria in cytochrome oxidase subunit II and the large ribosomal RNA subunit. *J Mol Evol* 48(5): 542-554.
- West, L., Powers, D., 1993. Molecular phylogenetic position of hexactinellid sponges in relation to the Protista and Demospongiae. *Mol Mar Biol Biotechnol* 2(2): 71-75.
- Woese, C., Kandler, O., Wheelis M., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (12): 4576-9.
- Wörheide, G., 2006. Low variation in partial cytochrome oxidase subunit I (COI) mitochondrial sequences in the coralline demosponge *Astrosclera willeyana* across the Indo-Pacific. *Mar Biol* 148: 907-912.
- Wörheide, G., Degnan, B.M., Hooper, J.N.A., Reitner, J., 2002a. Phylogeography and taxonomy of the Indo-Pacific reef cave dwelling coralline demosponge *Astrosclera willeyana* - new data from nuclear internal transcribed spacer sequences (ITS) In: Moosa, K. (ed.). *Proc 9th Int Coral Reef Symp* 1: 339-346.
- Wörheide, G., Epp, L., Macis, L., 2008. Deep genetic divergences among Indo-Pacific populations of the coral reef sponge *Leucetta chagosensis* (Leucettidae): founder effects, vicariance, or both? *BMC Evol Biol* 8: 24.
- Wörheide, G., Erpenbeck, D., Menke, C., 2007. The Sponge Barcoding Project (COI): aiding in the identification and description of poriferan taxa In: Custódio, M.R., Lôbo-Hajdu, G., Hajdu, E., Muricy, G. (eds) *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Série Livros 28 Museu Nacional. Rio de Janeiro p 123-128.
- Wörheide, G., Hooper, J.N.A., Degnan, D.M., 2002b. Phylogeography of western Pacific *Leucetta 'chagosensis'* (Porifera: Calcarea) from ribosomal DNA sequences (ITS): Implications for population history and conservation of the Great Barrier Reef World Heritage Area (Australia). *Mol Ecol* 11: 1753-1768.
- Wörheide, G., Nichols, S., Goldberg, J., 2004. Intragenomic variation of the rDNA internal transcribed spacers (ITS) in sponges (Phylum Porifera): Implications for phylogenetic studies. *Mol Phylogenet Evol* 33(3): 816-830.
- Wörheide, G., Solé-Cava, A.M., Fromont, J. 2004a. Population genetics and Phylogeography of sponges - a workshop synthesis. *Boll Mus Ist Biol Univ Genova* 68: 683-688.
- Wulff, J.L., 2006. Sponge Systematics by Starfish: Predators Distinguish Cryptic Sympatric Species of Caribbean Fire Sponges, *Tedania ignis* and *Tedania klausii* n. sp. (Demospongiae, Poecilosclerida). *Biol Bull* 211: 83-94.
- Xavier, J.R., Rachello-Dolmen, P.G., Parra-Velandia, F., Schönberg, C.H.L., Breeuwer, J.A.J., Van Soest, R.W.M., 2010. Molecular evidence of cryptic speciation in the "cosmopolitan" excavating sponge *Cliona celata* (Porifera, Clionaidae). *Mol Phylogenet Evol* 56: 13-20.
- Zrzavý, J., Mihulka, S., Kepka, P., Bezdek, A., Tietz, D., 1998. Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence. *Cladistics* 14: 249-285.

Ano	Referência	Periódico	IF (2010)			Número de marcadores			Marcadores					
			Média	±	Total	1	2	3+	cox1		ITS	18S	28S	Outros
<b>1991</b>			<b>1.11</b>	-	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
1	Kelly-Borges <i>et al.</i> (1991)	Biochem Syst Ecol	1.11		x	x						x		
<b>1992</b>			<b>1.48</b>	-	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
2	Lafay <i>et al.</i> (1992)	BioSystems	1.48		x	x							x	
<b>1993</b>			<b>2.96</b>	-	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
3	West & Powers (1993)	Mol Mar Biol Biotechnol	2.96		x	x						x		
<b>1994</b>			<b>2.96</b>	-	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
4	Kelly-Borges & Pomponi (1994)	Mol Mar Biol Biotechnol	2.96		x	x						x		
<b>1995</b>			-	-	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>1996</b>			<b>1.20</b>	-	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
5	Cavalier-Smith <i>et al.</i> (1996)	Can J Zool	1.20		x	x						x		
<b>1997</b>			<b>2.48</b>	-	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
6	Chombard <i>et al.</i> (1997)	Biol Bull	2.48		x	x							x	
<b>1998</b>			<b>7.89</b>	<b>2.10</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
7	Borchiellini <i>et al.</i> (1998)	Mol Biol Evol	5.51		x	x								HSP70
8	Chombard <i>et al.</i> (1998)	Syst Biol	9.53		x	x							x	
9	Collins (1998)	P Natl Acad Sci USA	9.77		x	x						x		
10	Zrzavy et al 1999	Cladistics	6.74		x	x						x		
<b>1999</b>			<b>4.30</b>	<b>1.73</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
11	Adams <i>et al.</i> (1999)	Mem Queensl Mus			x	x						x		
12	Chombard & Boury-Esnault (1999)	Mem Queensl Mus				x							x	
13	Itskovich <i>et al.</i> (1999)	Mem Queensl Mus			x	x						x		
14	Kim <i>et al.</i> (1999)	Mol Biol Evol	5.51		x	x						x		
15	McInerney <i>et al.</i> (1999)	Mem Queensl Mus			x		x					x	x	
16	Schütze et al. (1999)	P Roy Soc B	5.06		x			x						HSP70, cPKCs, GCTUBb, CAMGC
17	Watkins & Beckenbach (1999)	J Mol Evol	2.31		x									
<b>2000</b>			<b>2.19</b>	<b>1.17</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
18	Alvarez <i>et al.</i> (2000)	Zool Scr	3.09		x	x							x	
19	Borchiellini <i>et al.</i> (2000)	Hydrobiologia	1.96				x					x	x	
20	Peterson & Addis (2000)	Zool Scr	3.09		x	x						x		
21	Vacelet <i>et al.</i> (2000)	Zoosystema	0.63		x	x							x	
22	Worheide et al. (2000)	P 9th Int Coral Reef Sym			x	x					x			
<b>2001</b>			<b>6.04</b>	<b>5.28</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

23	Borchiellini <i>et al.</i> (2001)	J Evol Biol	2.31	x	x					x			
24	Medina et al 2001	P Natl Acad Sci USA	9.77	x		x				x	x		
25	Peterson & Eernisse (2001)												
<b>2002</b>			<b>3.22</b>	<b>2.56</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
26	Duran <i>et al.</i> (2002)	Mol Ecol	6.46	x									
27	Erpenbeck <i>et al.</i> (2002)	Mar Biol	2.01	x	x				x				
28	Lopez <i>et al.</i> (2002)	J Hered	2.25	x	x					x			
29	McCormack & Kelly (2002)	J Nat Hist	0.78	x	x							x	
30	McCormack <i>et al.</i> (2002)	J Zool Syst Evol Res	1.38	x	x								x
31	Wörheide <i>et al.</i> (2002)	Mol Ecol	6.46	x	x					x			
<b>2003</b>			<b>4.85</b>	<b>3.85</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
32	Knowlton <i>et al.</i> (2003)	Mol Ecol Notes	6.46	x									
33	Manuel <i>et al.</i> (2003)	Syst Biol	9.53	x	x						x		
34	Schröder <i>et al.</i> (2003)	J Zool Syst Evol Res	1.38	x		x			x				GCTUBb
35	Thacker & Starnes (2003)	Mar Biol	2.01	x	x						x		
<b>2004</b>			<b>4.15</b>	<b>1.74</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>6</b>
36	Borchiellini <i>et al.</i> (2004a)	Boll Mus Ist Biol Univ Genova		x	x								x
37	Borchiellini <i>et al.</i> (2004b)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x						x	x
38	Duran <i>et al.</i> (2004a)	Mar Biol	2.01	x	x				x				
39	Duran <i>et al.</i> (2004b)	Mol Ecol	6.46	x									
40	Duran <i>et al.</i> (2004c)	Mol Ecol	6.46	x	x						x		
41	Erpenbeck <i>et al.</i> (2004a)	Boll Mus Ist Biol Univ Genova		x	x				x	x			
42	Erpenbeck <i>et al.</i> (2004b)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x	x								x
43	Hoshino <i>et al.</i> (2004)	Boll Mus Ist Biol Univ Genova		x		x					x		x
44	Lobo-Hajdu <i>et al.</i> (2004)	Boll Mus Ist Biol Univ Genova		x							x		
45	Manuel <i>et al.</i> (2004)	Boll Mus Ist Biol Univ Genova		x		x						x	x
46	Peterson <i>et al.</i> (2004)												
47	Usher <i>et al.</i> (2004)	Mar Ecol Prog Ser	2.48	x		x					x		x
48	Wörheide <i>et al.</i> (2004a)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x	x						x		
<b>2005</b>			<b>4.13</b>	<b>2.61</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
49	Addis & Peterson (2005)	Zool Scr	3.09	x				x	x		x	x	
50	Blanquer <i>et al.</i> (2005)	Mol Ecol Notes	6.46	x									
51	Erpenbeck <i>et al.</i> (2005a)	Zool Scr	3.09	x	x								EF1a
52	Erpenbeck <i>et al.</i> (2005b)	J Zool Syst Evol Res	1.38	x	x								x
53	Lavrov & Lang (2005a)	Syst Biol	9.53	x									
54	Lavrov <i>et al.</i> (2005)	Mol Biol Evol	5.51	x									
55	Nichols & Barnes (2005)	J Exp Mar Biol Ecol	1.91	x	x						x		
56	Nichols (2005)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x			x				x

57	Peterson & Butterfield (2005)													
58	Peterson et al. (2005)													
59	Schmitt <i>et al.</i> (2005)	J Mol Evol	2.31	x		x				x	x			
<b>2006</b>			<b>3.53</b>	<b>1.46</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
60	Dohrmann <i>et al.</i> (2006)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x						x	x	
61	Duran & Rützler (2006)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x			x					
62	Erpenbeck <i>et al.</i> (2006b)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x				x		x			x	
63	Hoshino & Fujita (2006)	Mol Ecol Notes	6.46	x										
64	Itskovich <i>et al.</i> (2006)	Hydrobiologia	1.96	x		x			x					
65	Rot <i>et al.</i> (2006)	BMC Evol Biol	3.70	x		x			x	x				
66	Wörheide (2006)	Mar Biol	2.01	x		x			x					
67	Wulff (2006)	Biol Bull	2.48	x		x			x					
<b>2007</b>			<b>2.47</b>	<b>1.88</b>	<b>26</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>4</b>
68	Alvarez <i>et al.</i> (2007)	J Mar Biol Ass UK	0.93	x		x					x			
69	Barucca <i>et al.</i> (2007)	Mar Biol	2.01	x		x							x	
70	Bentlage & Wörheide (2007)	Coral Reefs	3.78	x				x			x			ATPB
71	Blanquer & Uriz (2007)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x				x				x	x	
72	Calderon <i>et al.</i> (2007)	Mol Ecol	6.46	x										
73	Cardenas et al. (2007)	J Mar Biol Ass UK	0.93	x				x			x			
74	Erpenbeck <i>et al.</i> (2007b)	Contrib Zool	1.12	x		x							x	
75	Erpenbeck <i>et al.</i> (2007c)	J Mol Evol	2.31	x		x							x	
76	Erpenbeck <i>et al.</i> (2007d)	Mol Biol Evol	5.51	x										
77	Erpenbeck <i>et al.</i> (2007e)	J Mar Biol Ass UK	0.93	x		x			x					
78	Erpenbeck <i>et al.</i> (2007f)	J Mar Biol Ass UK	0.93	x		x							x	
79	Erpenbeck <i>et al.</i> (2007g)	J Mar Biol Ass UK	0.93	x		x							x	
80	Erwin & Thacker (2007)	Invertebr Biol	1.54	x		x					x			
81	Haen <i>et al.</i> (2007)	Mol Biol Evol	5.51	x										
82	Heim <i>et al.</i> (2007a)	Mus. Nac. Rio de Janeiro		x				x			x			12S and 16S
83	Heim <i>et al.</i> (2007b)	Zootaxa	0.85	x		x			x					
84	Heim <i>et al.</i> (2007c)	J Mar Biol Ass UK	0.93	x		x			x					
85	Itskovich <i>et al.</i> (2007)	Mus. Nac. Rio de Janeiro		x				x				x		
86	Kober & Nichols (2007)	J Mar Biol Ass UK	0.93	x				x				x	x	
87	Lopp et al. (2007)	Fund Appl Limnol	1.11	x		x							x	
88	Meixner <i>et al.</i> (2007)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x				x				x		
89	Park <i>et al.</i> (2007)	Mol Cells	2.05	x				x			x			cox3
90	Raleigh <i>et al.</i> (2007)	J Mar Biol Ass UK	0.93	x		x				x				
91	Redmond et al 2007	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x						x		

92	Sperling et al. (2007)	Geol Soc Spec Pub		x		x							ALD, ATPB, CAT, EF1a, MAT, PFK, TPI	
93	Wang & Lavrov (2007)	Mol Biol Evol	5.51	x										
<b>2008</b>			<b>3.64</b>	<b>2.13</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
94	Belinky et al. (2008)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x										
95	Dohrmann et al. (2008)	Syst Biol	9.53	x		x					x	x	16S	
96	Gerasimova et al. (2008)	Zootaxa	0.85	x	x							x		
97	Hoshino et al. (2008)	Hydrobiologia	1.96	x	x					x				
98	Huang et al. (2008)	J Mol Evol	2.31	x	x			x						
99	Itskovich et al. (2008)	J Mol Evol	3.31	x	x					x				
100	Lavrov et al. (2008)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x										
101	Lukic-Bilela et al. (2008)	Gene	2.27	x										
102	Redmond & McCormack, 2008	Mol Phylogenet Evol	3.89	x	x						x			
103	Voigt et al. (2008)	BMC Evol Biol	3.70	x	x						x			
104	Wang & Lavrov (2008)	PLoS ONE	4.41	x										
105	Wörheide et al. (2008)	BMC Evol Biol	3.70	x				x				x	ATPB	
<b>2009</b>			<b>3.80</b>	<b>3.04</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
106	Blanquer et al. (2009)	Mar Ecol Prog Ser	2.48	x										
107	Dohrmann et al. (2009)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x					x	x	16S	
108	Erpenbeck et al. (2009)	BMC Genomics	4.21	x										
109	López-Legentil & Pawlik (2009)	Coral Reefs	3.78	x	x			x	x					
110	Noyer et al. (2009)	Conserv Genet	1.26	x										
111	Philippe et al. (2009)	Curr Biol	10.03	x										
112	Redmond & McCormack, 2009	J Mar Biol Ass UK	0.93	x	x						x			
113	Sperling et al. (2009)	Mol Biol Evol	3.70	x				x					ALD, ATPB, CAT, EF1a, MAT, PFK, TPI	
<b>2010</b>			<b>3.06</b>	<b>1.62</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
114	Cárdenas et al. (2010)	Zool Scr	3.09	x		x			x				x	
115	Dailianis & Tsigenopoulos (2010)	Conserv Genet	1.26	x										
116	Gazave et al. (2010a)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x					x	x		
117	Gazave et al. (2010b)	PLoS One	4.41	x				x			x	x		
118	Harcet et al. (2010)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x				3	x		x	x		
119	Heim & Nichols (2010)	Zootaxa	0.85	x	x				x					
120	Lavrov (2010)	Mol Biol Evol	5.51	x	x									
121	López-Legentil et al. (2010)	Sci Mar	1.08	x				x	x		x	x	16S	
122	Maikova et al. (2010)	Russ J Genet	0.43	x		x					x		MIR	

123	Pöppe <i>et al.</i> (2010)	PLoS ONE	4.41	x	x		x							
124	Sperling <i>et al.</i> (2010)	Geobiology	3.21	x		x							ALD, ATPB, CAT, EF1a, MAT, PFK, TPI	
125	Reveillaud <i>et al.</i> (2010)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x	x				x		ATPB	
126	Xavier <i>et al.</i> (2010)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x		x			x		atp8	
<b>2011</b>			<b>2.93</b>	<b>1.62</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>2</b>
127	Cárdenas <i>et al.</i> (2011)	PLoS ONE	4.41	x		x	x				x			
128	Eid <i>et al.</i> (2011)	J Pharmaceut Biomed Anal	2.73	x	x		x							
129	Ereskovsky <i>et al.</i> (2011)	Zootaxa	0.85	x										
130	Erpenbeck <i>et al.</i> (2011)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x	x			x				
131	Mitchell <i>et al.</i> (2011)?	Zootaxa	0.85	x	x		x							
132	Morrow <i>et al.</i> (2011)	Mol Phylogenet Evol	3.89	x		x	x				x			
133	Redmond <i>et al.</i> (2011)	PLoS ONE	4.41	x			x				x		nad1	
134	Reveillaud <i>et al.</i> (2011)	PLoS ONE	4.41	x			x		x		x			
135	Rua <i>et al.</i> (2011)	J Mar Biol Ass UK	0.93	x			x						atp6, cox2, MIR	



2002	0	0	1	2	3	0	0	1	0	2	2	3	0	0	0	0	
26			x		x						x						<i>Crambe crambe</i>
27				x						Simbiont/Host Coevolution		x					Halichondrida
28					x					<i>In vitro</i> diversity							<i>Axinella corrugata</i>
29								x				x					<i>Spongosorites suberitoides</i>
30				x								x					Haplosclerida
31					x						x						<i>Leucetta 'chagosensis'</i>
2003	0	0	1	2	0	0	1	0	0	2	0	3	1	0	0	0	
32			x							Methodology only		x					<i>Halichondria panicea</i>
33				x									x				Calcarea
34				x								x					Spongillina
35								x		Simbiont/Host Coevolution		x					<i>Dysidea</i>
2004	0	0	1	3	5	0	0	2	0	3	5	2	1	2	0	0	
36								x				x					<i>Alectona</i>
37				x										x			Demospongiae
38					x						x						<i>Crambe crambe</i>
39			x		x						x						<i>Crambe crambe</i>
40					x						x						<i>Crambe crambe</i>
41					x						x						<i>Halichondria panicea</i>
42				x						Secondary structure				x			Porifera
43								x				x					<i>Halichondria japonica</i>
44										SSCP							
45				x									x				Calcarea
46																	
47					x						x						<i>Chondrilla</i>
48										Intragenomic variation							various
2005	2	0	1	7	2	0	0	0	1	1	2	4	0	3	0	0	
49				x								x					Spongillina
50			x		x						x						<i>Scopalina lophyropoda</i>
51				x										x			Demospongiae
52				x										x			Halichondrida
53	x			x								x					Porifera
54	x			x					x			x					<i>Geodia</i> and <i>Tethya</i>
55					x					Intragenomic variation	x						<i>Placospongia</i>
56				x										x			Demospongiae





87																	x	Spongillina
88																	x	Spongillina
89																	x	DNA Barcode
90																	x	Halichondriidae
91																	x	Haplosclerida
92																	x	Haplosclerida
93																	x	Porifera
	x																x	<i>Oscarella carmela</i>
<b>2008</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>		
94	x			x					x			x						Negombata magnifica
95				x										x				Hexactinellida
96					x		x	x				x						<i>Vosmaeria</i>
97					x						x							<i>Hymeniacidon</i>
98							x					x						Porifera*
99				x								x						Spongillina
100	x			x											x			Demospongiae
101	x			x					x			x						Suberites domuncula
102				x													x	Porifera
103				x													x	Porifera
104	x			x					x								x	Demospongiae
105					x							x						<i>Leucetta chagosensis</i>
<b>2009</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>		
106																	x	<i>Scopalina lophyropoda</i>
107				x										x				Hexactinellida
108	x																	Intergenic region diversity
109					x						x							<i>Xestospongia muta</i>
110																		<i>Spongia agaricina</i>
111					x												x	Porifera
112					x							x						Halichondrida
113					x												x	Porifera
<b>2010</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		
114				x								x						Geodiidae
115																	x	<i>Spongia officinalis</i>
116																	x	Axinellidae
117	x				x												x	Homoscleromospa
118									x			x						<i>Eunapius</i>
119									x			x						<i>Tethya</i>

120	x								x	Intergenic region diversity						
121				x		x						x				<i>Callyspongia vaginalis</i>
122													x			<i>Spongilina</i>
123														x		Irciniidae
124		x													x	Porifera
125				x	x	x										<i>Hexadella</i>
126					x	x										<i>Cliona celata</i>
<b>2011</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
127				x								x				Astrophorida
128													x			<i>Negombata</i>
129	x													x		<i>Halisarca</i>
130				x											x	Spongillina
131									x							Sigmaxinella
132				x										x		Demospongiae
133				x											x	Haplosclerida
134				x											x	<i>Plocamionida</i>
135																Methodology only

Ano	Metodologia de análise	Morfologia
<b>1991</b>		
1	Phylogenetic: MP	
<b>1992</b>		
2	Phylogenetic: ML, MP and NJ	
<b>1993</b>		
3		
<b>1994</b>		
4	Phylogenetic: MP and NJ	
<b>1995</b>		
<b>1996</b>		
5	Phylogenetic: ML, MP and NJ	
<b>1997</b>		
6	Phylogenetic: MP and NJ	
<b>1998</b>		
7	Phylogenetic: MP and NJ	Spicule morphology (SEM); Infomal character evolution  Character matrix = Independent and combined (total evidence) phylogeny
8	Phylogenetic: MP and NJ	
9	Phylogenetic: ML, MP and ME	
10	Phylogenetic: MP	
<b>1999</b>		
11	Phylogenetic: ML, MP and DM; Others: TT	Character matrix = Independent phylogeny
12		
13	Phylogenetic: MP and NJ	
14	Phylogenetic: ML and ME	
15	Phylogenetic: ML, MP and DM.	
16	Phylogenetic: NJ; Others: cDNA	
17	Phylogenetic: MP and NJ; Genome: LPCR	
<b>2000</b>		
18	Phylogenetic: ML and MP;	Character matrix = Independent phylogeny and character evolution
19		
20	Phylogenetic: ML, MP and NJ	Species description
21	Phylogenetic: MP and NJ	Species description
22	Phylogenetic: MP and ME	
<b>2001</b>		
23	Phylogenetic: MP and NJ	
24	Phylogenetic: ML and MP	
25		

<b>2002</b>		
26	Population: F	
27	Phylogenetic: ML, MP and ME	
28	Phylogenetic: ML, MP and NJ	
29	Phylogenetic:MP	
30	Phylogenetic: ML and MP	
31	Phylogenetic: ML and MP; Population: HN	
<b>2003</b>		
32	none	
33	Phylogenetic: ML and MP	Character matrix = Combined (total evidence) phylogeny; Formal character evolution
34	Phylogenetic: NJ	
35	Phylogenetic: ML, MP and NJ	
<b>2004</b>		
36	Phylogenetic: MP and NJ	Excavating pattern variability (SEM) Character matrix = Formal character evolution
37	Phylogenetic: ML, MP and NJ	
38	Population: AMOVA and F	
39	Population: F	
40	Phylogenetic: ML; Population: HN and AMOVA	
41	Phylogenetic: ML, MP and NJ	
42	Phylogenetic: ML and BI; Others: SS	
43	Phylogenetic: ML and NJ	Spicule, skeletal (optical) and larval (TEM) morphology
44	none	
45	Phylogenetic: ML, MP and NJ	Formal character evolution
46		
47	Phylogenetic: ML and BI	Spicule morphology (optical and SEM)
48	Phylogenetic: MP and NJ	
<b>2005</b>		
49	Phylogenetic: ML, MP, ME	Spicule morphology; Character matrix
50	Population: F	
51	Phylogenetic: ML and BI	
52	Phylogenetic: BI	
53	Phylogenetic: GO; Genome: LAPCR and SS	
54	Phylogenetic: ML and BI; Genome: LAPCR and SS; Others: SA	
55	Phylogenetic: MP; Others: AA	
56	Phylogenetic: MP and BI	
57		
58		
59	Phylogenetic: ML, MP, ME and BI	

2006		
60	Phylogenetic: ML and BI	
61	Populational: AMOVA, F, HN	
62	Phylogenetic: ML and BI	
63	none	
64	Phylogenetic: MP and NJ	
65	Phylogenetic: ML and BI; Others: SS	
66	Phylogenetic: NJ	
67	Distance: p	Spicule and skeletal (optical) morphology
2007		
68	Distance: p, NJ	
69	Phylogenetic: ML, MP, NJ	
70	Phylogenetic: MP; Populational: HN, F; Others: SS	
71	Phylogenetic: BI; Distance.	
72	Populational: KC, Nb,	
73	Phylogenetic: MP	Spicule morphology (optical)
74	Phylogenetic: ML, ME and BI	
75	Phylogenetic: BI	
76	Phylogenetic: ML and BI	
77	Phylogenetic: ML and BI	
78	Phylogenetic: ML and BI	
79	Distance: ANOVA; Others: SS	
80	Phylogenetic: ML, MP and NJ	Character matrix; Formal character evolution; Spongin fiber morphology (optical)
81	Phylogenetic: ML and BI; Genome: LAPCR and SS; Others: SA	
82	Phylogenetic: NJ and BI	
83	Phylogenetic: BI	Species description; Identification key
84	Phylogenetic: ML, ME and BI	Character matrix; Independent phylogeny
85	Phylogenetic: ML and NJ	
86	Phylogenetic: MP and BI	
87	none	Spicule morphology (optical and SEM)
88	Phylogenetic: ML, MP, NJ, ME and BI	
89	Phylogenetic: ML, MP, NJ and BI	
90	Phylogenetic: ML and NJ	
91	Phylogenetic: ML and MP	
92	Phylogenetic: BI	none
93	Phylogenetic: ML, NJ and BI; Genome: LAPCR and SS; Others: SA	
2008		
94	Phylogenetic: ML and NJ; Genome: LPCR, PWS	

95	Phylogenetic: BI.	Character matrix; Independent phylogeny, Formal character evolution
96	Phylogenetic: ML, ME and BI; Others: TT	Species description
97		
98	Distance: p, K2P, ANOVA, KW, MW.	
99	Phylogenetic: ML, MP, NJ and BI; Others: SA.	
100	Phylogenetic: ML, BI and GO; Genome: LAPCR and SS; Others: TT.	
101	Phylogenetic: ML and NJ; Genome: LPCR, PWS	
102	Phylogenetic: ML; Others: SA	
103	Phylogenetic: BI; Others: SA	
104	Genome: LAPCR and SS; Others: SA	
105	Phylogenetics: BI; Population: HN, AMOVA, Mt, Co.	
<b>2009</b>		
106		
107	Phylogenetic: BI	
108		
109		
110		
111	Phylogenetic: BI; Genome: EST	Character matrix; Formal character evolution
112	Phylogenetic: ML; Distance: p	
113	Phylogeny: BI; Others: TT	none
<b>2010</b>		
114	Phylogenetic: ML, MP, NJ and BI	Character matrix; Formal character evolution
115		
116	Phylogenetic: ML, MP and BI	Informal character evolution
117	Phylogenetic: ML, MP and BI	
118		
119	Phylogenetic: BI	Species description
120		
121	Phylogenetic: ML, MP, NJ and BI	Spicule and spongin fiber morphology (optical)
122	Phylogenetic: ML, MP and NJ	
123		
124	Phylogenetic: BI; Others: MC	none
125	Phylogenetic: ML and BI; Distance	
126	Phylogenetic: ML and BI	
<b>2011</b>		
127	Phylogenetic: ML and BI	Character matrix; Formal character evolution
128	Phylogenetic: NJ	Skeletal morphology (optical)
129	Phylogenetic: ML and NJ; Genome: LAPCR and 454	Species description

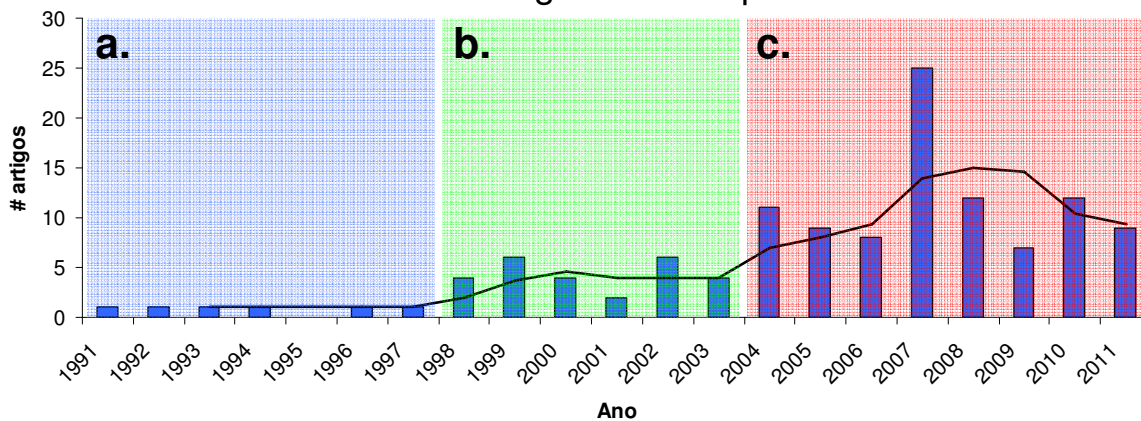
130	Phylogenetic: ML and BI	
131	Phylogenetic: ML and BI	Species description
132	Phylogenetic: ML and BI	
133	Phylogenetic: ML and BI	
134	Phylogenetic: ML and BI; Distance	Spicule morphology (optical)
135	Distance: p	

---

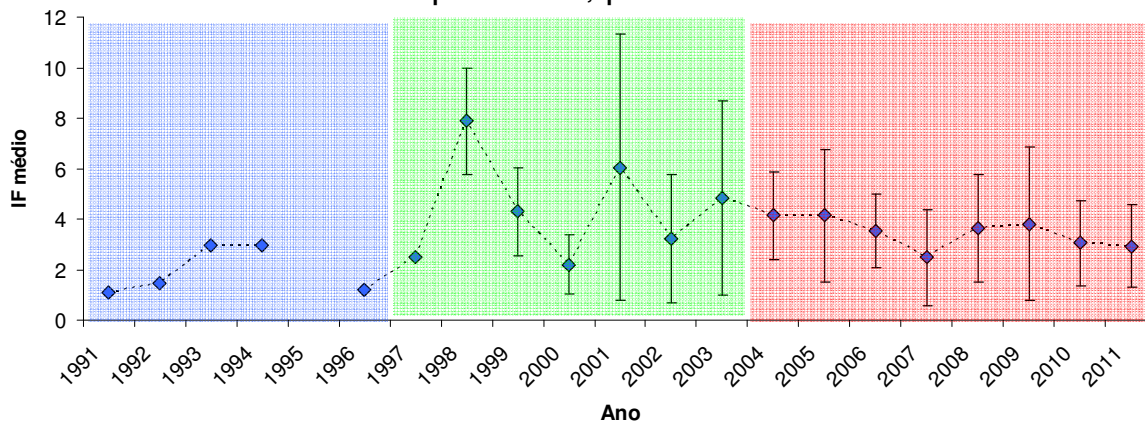


## O crescimento da área de pesquisa em Sistemática e Ecologia Molecular em Porifera

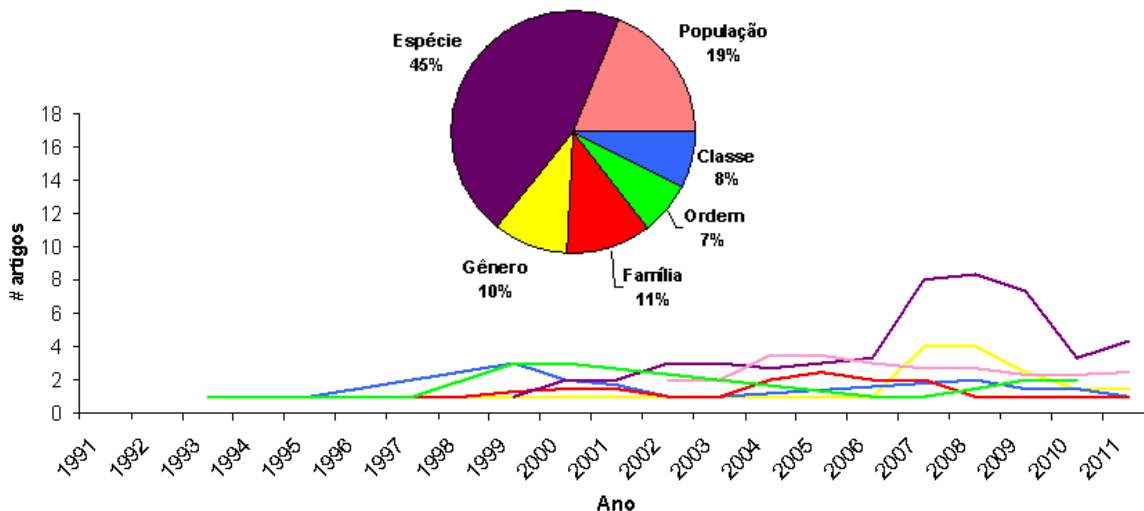
### Número de artigos na área por ano



### Visibilidade da área, estimada pelo Fator de Impacto (IF) dos periódico, por ano

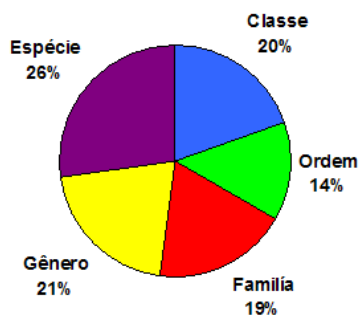


### Representatividade taxonômica das amostras utilizadas nas publicações na área

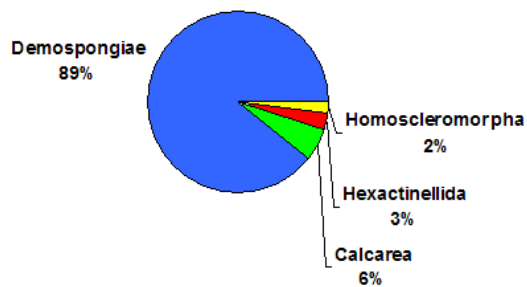


### Abrangência sistemática dos artigos publicados na área

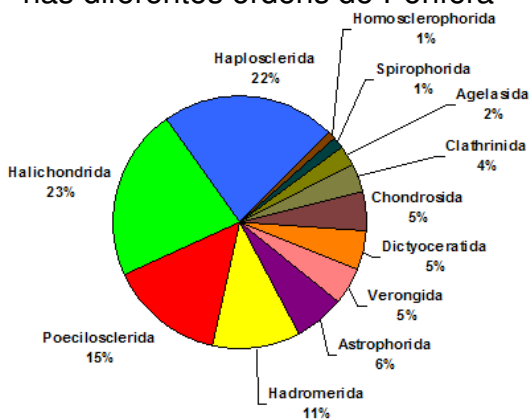
Proporção das publicações com foco em diferentes níveis taxonômicos



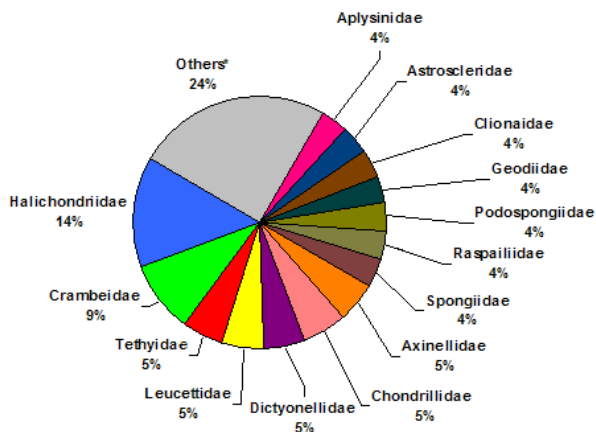
Proporção das publicações com foco nas diferentes classes de Porifera



Proporção das publicações com foco nas diferentes ordens de Porifera



Proporção das publicações com foco nas diferentes famílias de Porifera



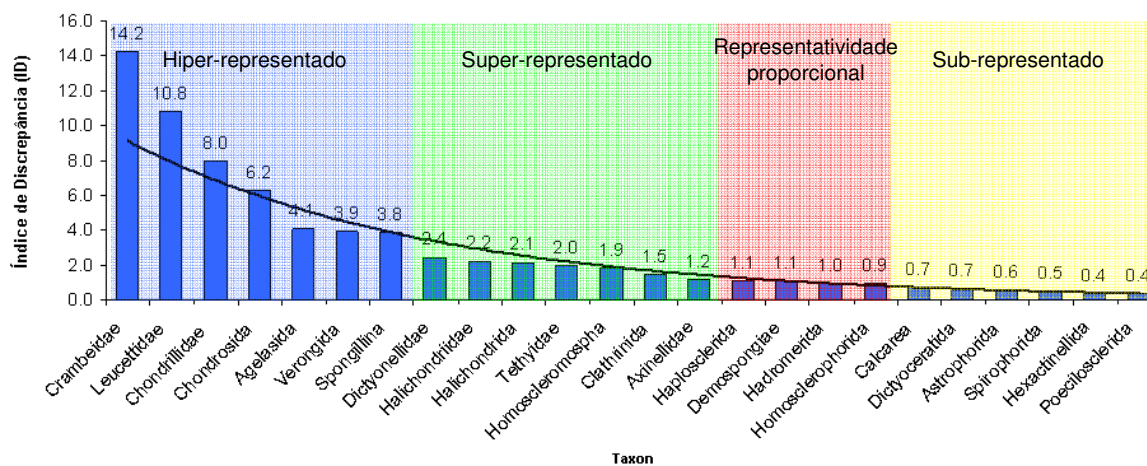
## Índice de discrepância taxonômica (ID)

Representatividade de um táxon em relação às publicações na área. Um táxon é super-representado quando seu ID > 1 e sub-representado quando seu ID < 1

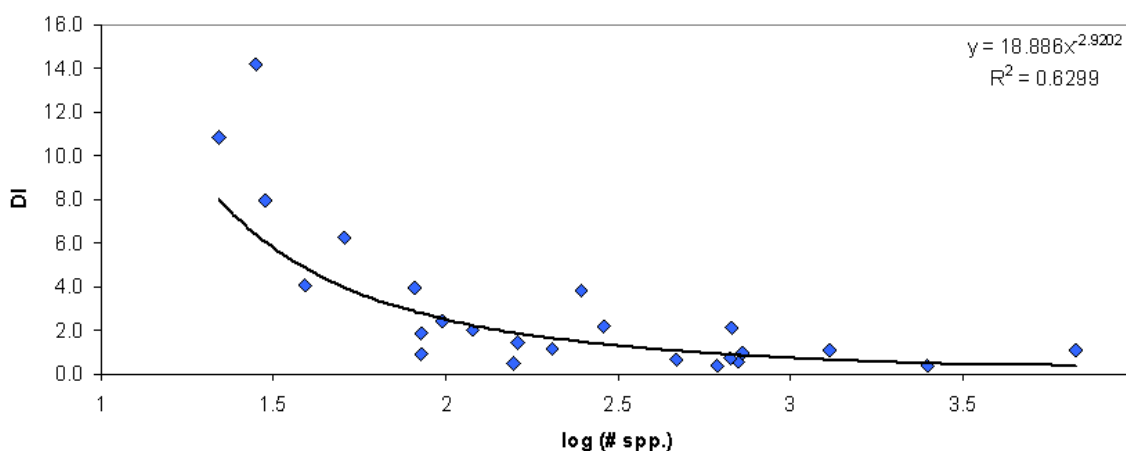
$$ID = \frac{A_t / A_T}{E_t / E_T}$$

$A_t$  = número de artigos com foco em um determinado táxon na área  
 $A_T$  = número total de artigos na área  
 $E_t$  = número de espécie do táxon em questão  
 $E_T$  = o número total de espécies do grupo na área.

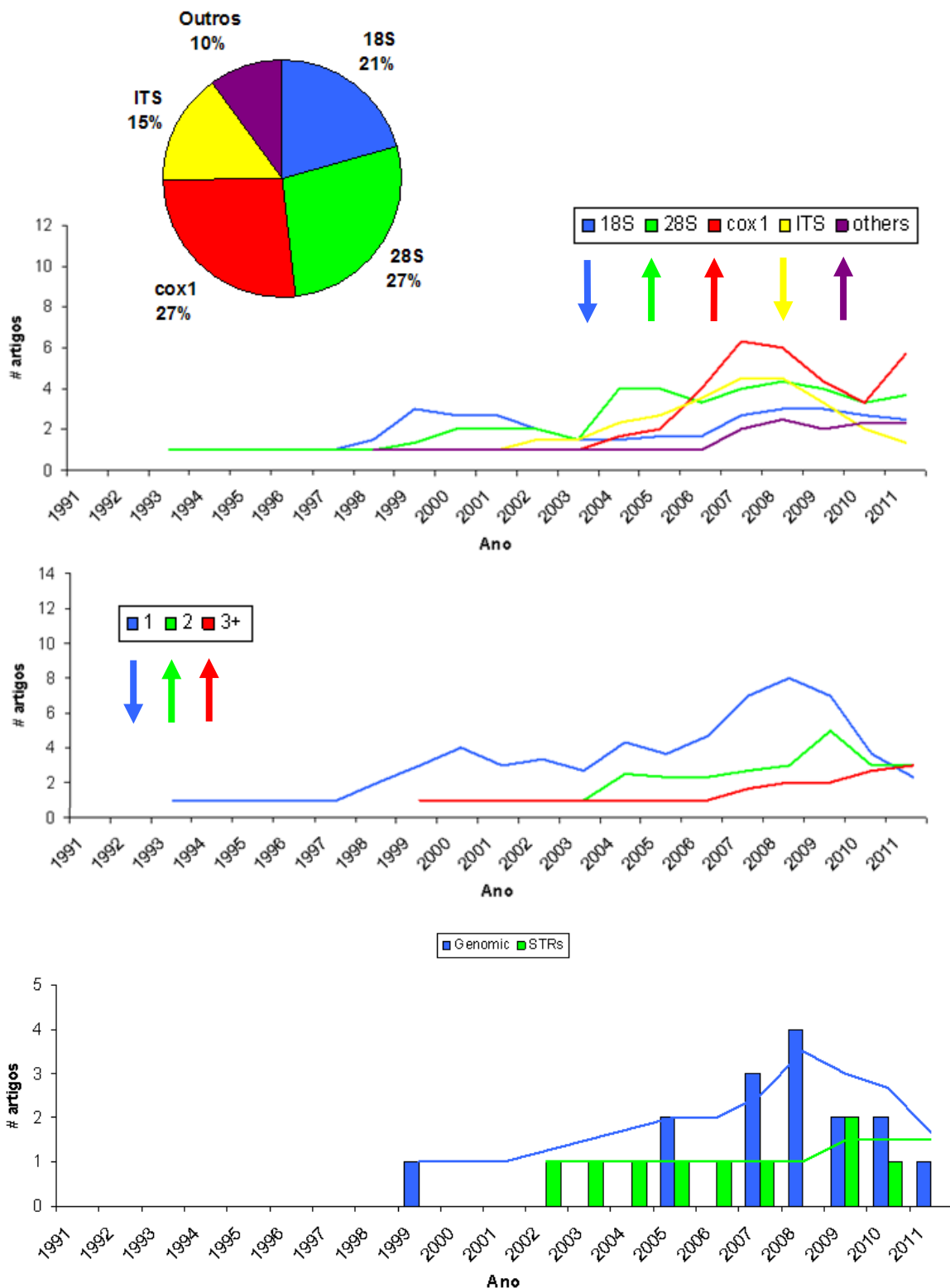
### Discrepância taxonômica em Porifera



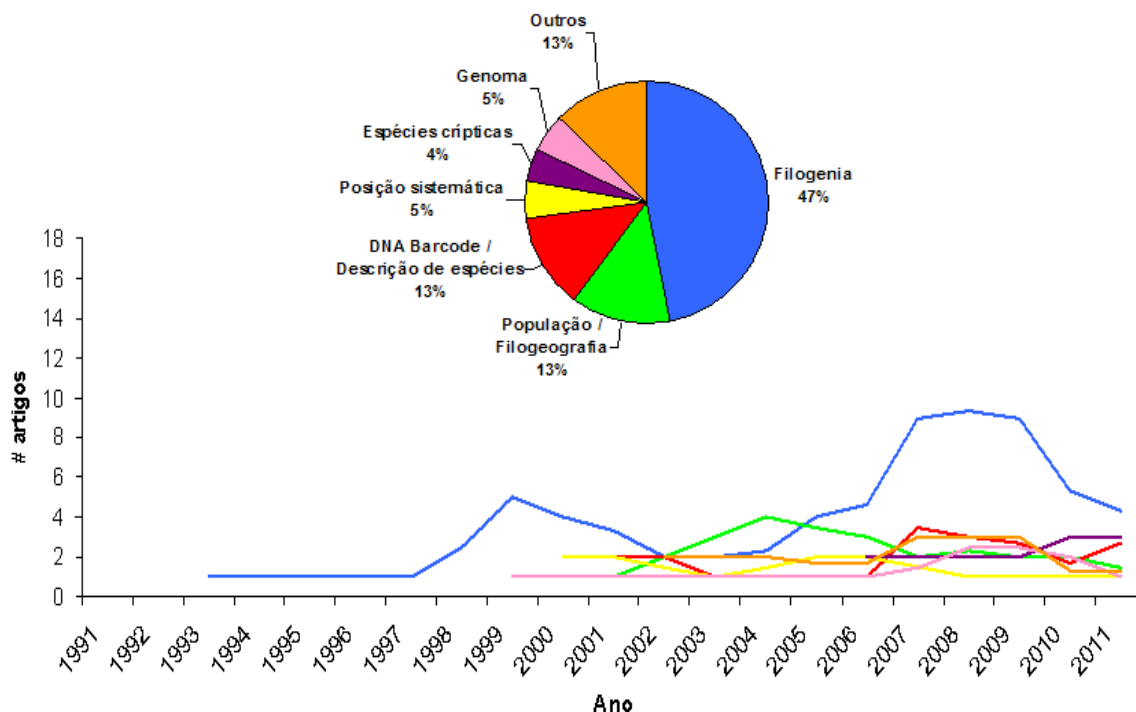
### Discrepância taxonômica em função do logaritmo do número de espécies do táxon



## Marcadores moleculares utilizados quanto ao tipo e número por publicação na área

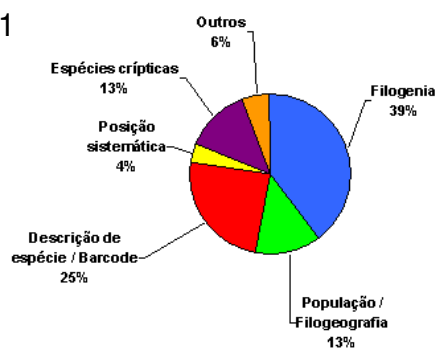


## Abordagens das publicação na área



## Abordagens por marcador

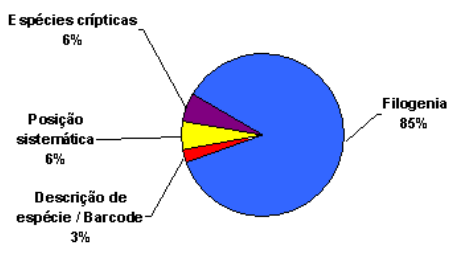
cox1



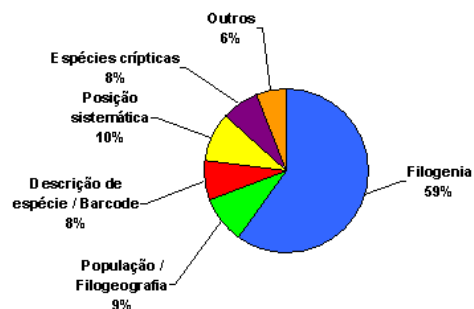
ITS



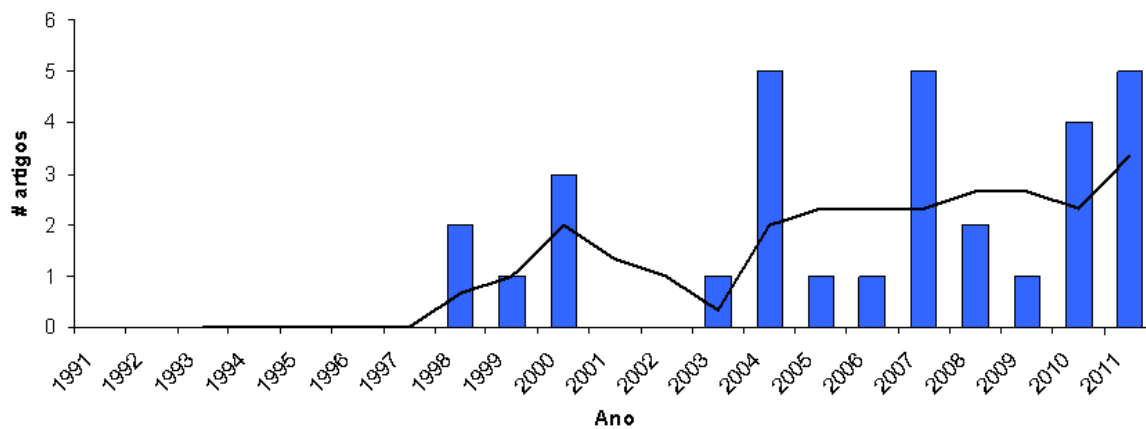
28S



18S



## Utilização de dados morfológicos em publicações na área



## Abordagens aplicadas aos dados morfológicos

