

NATHALIA MEJÍA SÁNCHEZ

**Estudo Filogeográfico de *Chiropsalmus cf. quadrumanus*
(Cnidaria: Cubozoa) na Costa Brasileira**

**Phylogeographic study of *Chiropsalmus cf. quadrumanus*
(Cnidaria: Cubozoa) in the Brazilian Coast**

São Paulo

2011

NATHALIA MEJÍA SÁNCHEZ

**Estudo Filogeográfico de *Chiropsalmus cf. quadrumanus* (Cnidaria:
Cubozoa) na Costa Brasileira**

**Phylogeographic study of *Chiropsalmus cf. quadrumanus* (Cnidaria:
Cubozoa) in the Brazilian Coast**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Zoologia.

Orientador: Antonio Carlos Marques

São Paulo

2011

Mejía - Sánchez, Nathalia

Estudo Filogeográfico de *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* (Cnidaria: Cubozoa) na Costa Brasileira.

64 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

1. *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* 2. Cubozoa 3. Filogeografia 4. Especiação críptica. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Antonio Carlos Marques

A mi familia, por apoyarme y comprenderme con cariño.

A Juli, por su amor incondicional y estar siempre presente.

“Los buenos días te dan felicidad, los malos días te dan experiencia y ambos son esenciales para la vida... La felicidad te mantiene dulce, los intentos te mantienen fuerte. Las penas te mantienen humano, las caídas te mantienen humilde. Y el éxito... el éxito te mantiene brillante...”

Anónimo

(fragmentos de una mensagem enviada por meus pais, 17 de Setembro de 2010)

Agradecimentos

Ao professor Antonio Carlos Marques (Tim) pela oportunidade, confiança para realizar meu projeto e pelas inúmeras revisões e correções sempre adequadas para a produção deste trabalho. *Obrigada por me ensinar com paciência infinita que as famílias NÃO vão em itálico.*

A CAPES pela bolsa de mestrado que possibilitou a realização do meu projeto e a minha passagem por São Paulo.

Ao Instituto de Biociências, e seus funcionários pela ajuda e solução de dúvidas sempre que precisei.

A todas as pessoas do laboratório de “Bio-Mol” que estiveram presentes em cada uma das etapas do projeto, nas dificuldades e acontecimentos para me dar uma palavra de apoio. Em especial à Maíra pela paciência e carinho para me explicar mais de 100 vezes como se programavam os aparelhos e qual era o lugar dos reagentes. Sabrina, simplesmente sem você, sem sua ajuda e paciência sem fim este trabalho não teria dado certo, obrigada por ser minha tutora e amiga.

A meus amigos do LEM, Amanda, Thaís, Marina, Mariana, Camila, Elaine, Max, Juliana e Lucilia por estar sempre presentes para me escutar as loucas histórias do dia a dia, me dar apoio moral e profissional para realizar o projeto e me corrigir todo dia meus erros de português, muito obrigada. Amandita, nunca vou esquecer seu minereis que me fez dar tantas e tantas risadas. Thá o que teria feito sim você para responder todas minhas dúvidas?, você sabe de tudo mesmo. Maxi, fue siempre una delicia escucharte hablar de música, tecnología, cine, política y filogenia con la misma seguridad de siempre, gracias por los innumerables papers útiles y oportunos que me ayudaron a entender la complejidad de mi proyecto. Ju e Lu o que farei daqui para frente sem vocês duas? Ainda não sei mas, obrigada pelas loucuras, risadas sem fim, deliciosas aventuras dentro e fora do lab, me escutar e aconselhar sempre, obrigada por confiar em mim e me fazer uma pessoa feliz, cheia de lembranças e conhecimentos novos e mais uma vez obrigada, por me ensinar que a vida sem chocolate não tem graça nenhuma, adoro vocês.

A Marie, Márcia, Denise, Bianca, Priscila, Rita e Bruno por fazer da minha passagem por São Paulo divertida, emocionante e cheia coisas novas. Talita e eu agradecemos vocês por compartilhar com a gente o amor ilimitado pelos animais e todas as aventuras caninas que nos fizeram tão felizes.

A minha família, papi, mami, Nico, Fito, Lili, tía Isabelita, Fernandito, Leslie y Fernando les agradezco enormemente el apoyo, confianza, amor, comprensión y preocupación. Han sido y serán siempre esenciales para mi vida, los llevaré en mis pensamientos donde quiera que esté.

A Julián Esteban (Julito), pelo seu amor incondicional, paciência e companhia nos finais de semana e madrugadas de trabalho, me permitir crescer do seu lado, me preencher com sua felicidade e positivismo sempre que precisei e simplesmente por me fazer a pessoa que sou hoje, sem você do meu lado a minha experiência no Brasil não teria sido possível.

Índice

Capítulo 1.	01
Resumo	01
Abstract	02
Resumen	03
Introdução	04
O plâncton gelatinoso e o filo Cnidaria	04
A classe Cubozoa	07
<i>Chiropsalmus</i> (Chiropsalmidae) e <i>Chiropsalmus</i> <i>quadrumanus</i>	11
Biogeografia e filogeografia marinha do Atlântico sul- americano	12
O Atlântico sul-americano atual	16
Referências Bibliográficas	20
 Capítulo 2.	 31
Cryptic speciation of <i>Chiropsalmus</i> cf. <i>quadrumanus</i> (Cubozoa: Chiropsalmidae) lineages from Brazil	31
Abstract	31
Resumo	31
Resumen	32
Introduction	32

Material and Methods	33
• <i>Samples and DNA extraction</i>	33
• <i>PCR amplification and sequencing of mitochondrial COI, 16S and nuclear ITS molecular markers</i>	34
• <i>Molecular divergence and demographic history</i>	35
• <i>Morphometrical analyses</i>	36
Results	36
Discussion	42
Acknowledgements	45
References	46
Capítulo 3.	51
Considerações finais	51
Referências Bibliográficas	53
Resumo	54
Abstract	55

Capítulo 1

Resumo

O plâncton gelatinoso tem importância econômica e ecológica, sendo parte das cadeias alimentares marinhas nas quais serve de alimento exclusivo ou fonte ocasional de nutrientes, compete com outros organismos por alimento e assume posições mais altas em algumas cadeias. Dentre o plâncton gelatinoso, destacam-se os cnidários os quais dividem-se em dois grandes grupos, Anthozoa com apenas fase de pólipó em seu ciclo de vida e o DNA mitocondrial circular e Medusozoa com as fases de pólipó e/ou medusa no ciclo de vida e o DNA mitocondrial linear. Nos Medusozoa encontram-se as classes Hydrozoa, Cubozoa, Scyphozoa e Staurozoa. Os Cubozoa caracterizam-se por apresentar a umbrela com formato cúbico, um velário em sua borda, e pela presença de pedálios em cada canto da umbrela. As cubomedusas apresentam principalmente três tipos de nematocistos, isorrizas, eurtelos e mastigóforos, os dois últimos podendo ser micro- ou macrobásicos, a depender da espécie. Os cubozoários são animais de águas tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Atualmente, a classe Cubozoa engloba duas ordens, sete famílias, doze gêneros e aproximadamente cinquenta espécies com padrões geográficos oceânicos definidos excetuando duas famílias que estão presentes em vários oceanos. A espécie focada neste estudo é *Chiropsalmus cf. quadrumanus*, distribuída ao longo do litoral da costa atlântica americana entre 35°N e 27°S, uma área com barreiras putativas que poderiam impedir sua distribuição contínua, tornando-se em um modelo interessante para estudos de estrutura populacional e filogeografia. Algumas barreiras putativas junto a fatores abióticos e bióticos, regulam as distribuições populacionais do zooplâncton e provavelmente, influenciam a evolução de linhagens de organismos marinhos na região do Atlântico sul-americano.

Palavras chave: Cnidaria, Cubozoa, *Chiropsalmus cf. quadrumanus*, biogeografia, filogeografia.

Abstract

Gelatinous plankton has economic and ecological importance, been part of marine food chains, serving as exclusive food or occasional font of nutrients. Gelatinous plankton competes with other organisms for food and assumes high positions in some food chains. As a part of gelatinous plankton, cnidarians divides in two main groups, Anthozoa with polyp stage in the entire life cycle and circular mitochondrial DNA and, Medusozoa with polyp and medusa stages in the life cycle and linear mitochondrial DNA. Into Medusozoa are placed the Hydrozoa, Cubozoa, Scyphozoa and Staurozoa classes. Cubozoa are characterized to present cubic umbrella, a velarium in its edge and pedalia in each corner of the umbrella. Cubomedusae have mainly three types of nematocysts, isorhizas, euryteles and mastigophores, the last ones can be micro- or macrobasic depending on the species. Cubozoans inhabit tropical and subtropical waters around the world. Actually, the class Cubozoa includes two orders, seven families, twelve genera and approximately fifty species with defined ocean geographic patterns, except for two families that are present in various oceans. *Chiropsalmus cf. quadrumanus* is the model species for this study, it distributes along the Atlantic coast of America between 35°N and 27°S, this area has putative barriers that could prevent the continuous distribution of *C. cf. quadrumanus*, turning the species an interesting model to study population structure and phylogeography. Some putative barriers as well as biotic and abiotic factors, regulates the population distribution of zooplankton and probably, influence the lineages evolution of marine organisms in the South American Atlantic region.

Key words: Cnidaria, Cubozoa, *Chiropsalmus cf. quadrumanus*, biogeography, phylogeography.

Resumen

El plancton gelatinoso tiene importancia económica y ecológica, siendo parte de las cadenas alimentares marinas en las que sirve de alimento exclusivo o fuente ocasional de nutrientes, compite con otros organismos por el alimento y asume posiciones más altas en algunas cadenas. Dentro del plancton gelatinoso, se destacan los Nidarios, que se dividen en dos grupos, Antozoa con únicamente fase de pólipo en su ciclo de vida y DNA mitocondrial circular y Medusozoa con fase de pólipo y medusa en su ciclo de vida y DNA mitocondrial lineal. En los Medusozoa se encuentran las clases Hydrozoa, Cubozoa, Scyphozoa y Staurozoa. Los Cubozoa se caracterizan por presentar la campana en formato cúbico, velario en el borde de la misma y la presencia de pedálios en cada esquina de la campana. Las cubomedusas presentan principalmente tres tipos de nematocistos, isorrizas, euritelos y mastigóforos, los dos últimos pueden ser micro- ó macrobásico, según la especie. Los cubozoarios son animales de aguas tropicales y subtropicales alrededor del mundo. Actualmente, la clase Cubozoa engloba dos órdenes, siete familias, doce géneros y aproximadamente cincuenta especies con padrones geográficos oceánicos definidos, a excepción de dos familias que están presentes en varios océanos. La especie utilizada para este estudio es *Chiropsalmus cf. quadrumanus*, distribuida a lo largo del litoral de la costa atlántica americana entre 35°N y 27°S, un área con barreras putativas que podrían impedir su distribución continua, lo que la torna en un modelo interesante para estudios de estructura poblacional y filogeografía. Algunas barreras putativas así como factores abióticos y bióticos, regulan las distribuciones poblacionales del zooplancton e probablemente, influyen la evolución de linajes de organismos marinos en la región del Atlántico Suramericano.

Palabras clave: Cnidaria, Cubozoa, *Chiropsalmus cf. quadrumanus*, biogeografía, filogeografía.

Introdução

Este estudo enfoca uma abordagem filogeográfica, com consequências taxonômicas, de um complexo de espécies do gênero *Chiropsalmus* (Chiropsalmidae) no Atlântico sul-americano. Neste capítulo será exposta uma introdução básica para o estudo, tais como aspectos gerais da taxonomia, relevância e conhecimento bio- e filogeográfico para o Atlântico sul-americano.

O plâncton gelatinoso e o filo Cnidaria

O plâncton é um compartimento subjetivo da biota marinha, constituído por organismos que são arrastados passivamente pelos movimentos das correntes (Hensen, 1887). Os organismos do plâncton influenciam direta ou indiretamente o bentos e o pelagial, desempenhando um papel fundamental no funcionamento dos ecossistemas marinhos (Tronolone, 2007). Dentre seus componentes, há uma parte denominada plâncton gelatinoso, que inclui os Cnidaria, Ctenophora, Mollusca, Chaetognatha, Thaliacea e Appendicularia (Wrobel & Mills, 1998). O plâncton gelatinoso tem importância econômica e ecológica, sendo parte das cadeias alimentares marinhas (Purcell *et al.*, 2001), nas quais serve de alimento exclusivo ou fonte ocasional de nutrientes para diversas espécies de peixes (Mianzan *et al.*, 2001a), compete com outros organismos por alimento (Russell, 1970; Alvarino, 1975) e assume posições mais altas em algumas cadeias (Brewer, 1989; Buskey, 2003; Arai, 2005; Hsieh *et al.*, 2001).

O filo Cnidaria, com sua grande complexidade de ciclos de vida, é um dos grupos mais representativos no ambiente planctônico. Com representantes popularmente conhecidos como águas-vivas, anêmonas-do-mar e corais, os cnidários tem como sinapomorfia a presença de cnidas (Marques & Collins, 2004), organelas de células urticantes (cnidócitos) distribuídas na epiderme e, ocasionalmente, na gastroderme dos animais. Algumas cnidas, tais como os nematocistos, injetam toxinas na presa ou predador (Carrette & Seymour, 2004), podendo ser letais até mesmo para os seres humanos (Lane & Dodge, 1958; Baxter & Marr, 1969).

O estudo dos nematocistos é importante sob diversos aspectos, desde para a taxonomia (Gravier-Bonnet, 1987; Williamson *et al.*, 1996), inferências sobre a ecologia alimentar (Endean & Rifkin, 1975), ou até para estimativa do tamanho dos indivíduos (Carrette *et al.*, 2002). Atualmente são reconhecidos mais de 30 tipos morfológicos diferentes de

nematocistos, embora ainda haja discordâncias nomenclaturais em suas classificações (e.g., Southcott, 1967; Rifkin & Edean, 1983; Carrette *et al.*, 2002). O estudo do cnidoma (classificação, tamanho e distribuição dos nematocistos no indivíduo) assumiu um papel importante na taxonomia dos cnidários, embora variações sejam importantes de serem consideradas, como diferenças ontogenéticas e geográficas entre os indivíduos de uma mesma espécie (Fautin, 2009).

Os cnidários dividem-se em dois grandes grupos, Anthozoa e Medusozoa (ver Collins *et al.*, 2006; Collins, 2009). Os Anthozoa possuem apenas a fase de pólipó em seu ciclo de vida e tem o DNA mitocondrial circular, contrastando com os Medusozoa, que possuem as fases de pólipó e/ou medusa no ciclo de vida e o DNA mitocondrial linear, sinapomorfias do grupo (Bridge *et al.*, 1992; Marques & Collins, 2004). Nos Medusozoa encontram-se as classes Hydrozoa, Cubozoa, Scyphozoa e Staurozoa (Marques & Collins, 2004). Cubozoa e Staurozoa já foram incluídos dentre os Scyphozoa (Kramp, 1961; 1965), mas caracteres e inferências filogenéticas mais amplas justificam as hipóteses de Cubozoa (Werner, 1973; Werner *et al.*, 1976; Calder & Peters, 1975; Collins, 2002; Marques & Collins, 2004) e Staurozoa (Marques & Collins, 2004; van Iten *et al.*, 2006) como classes monofiléticas e distintas dos Scyphozoa, caracterizados pela presença de estrobilização e éfira em seu ciclo de vida. Uma síntese filogenética dos Medusozoa foi proposta por Collins (2009; ver. Figura 1).

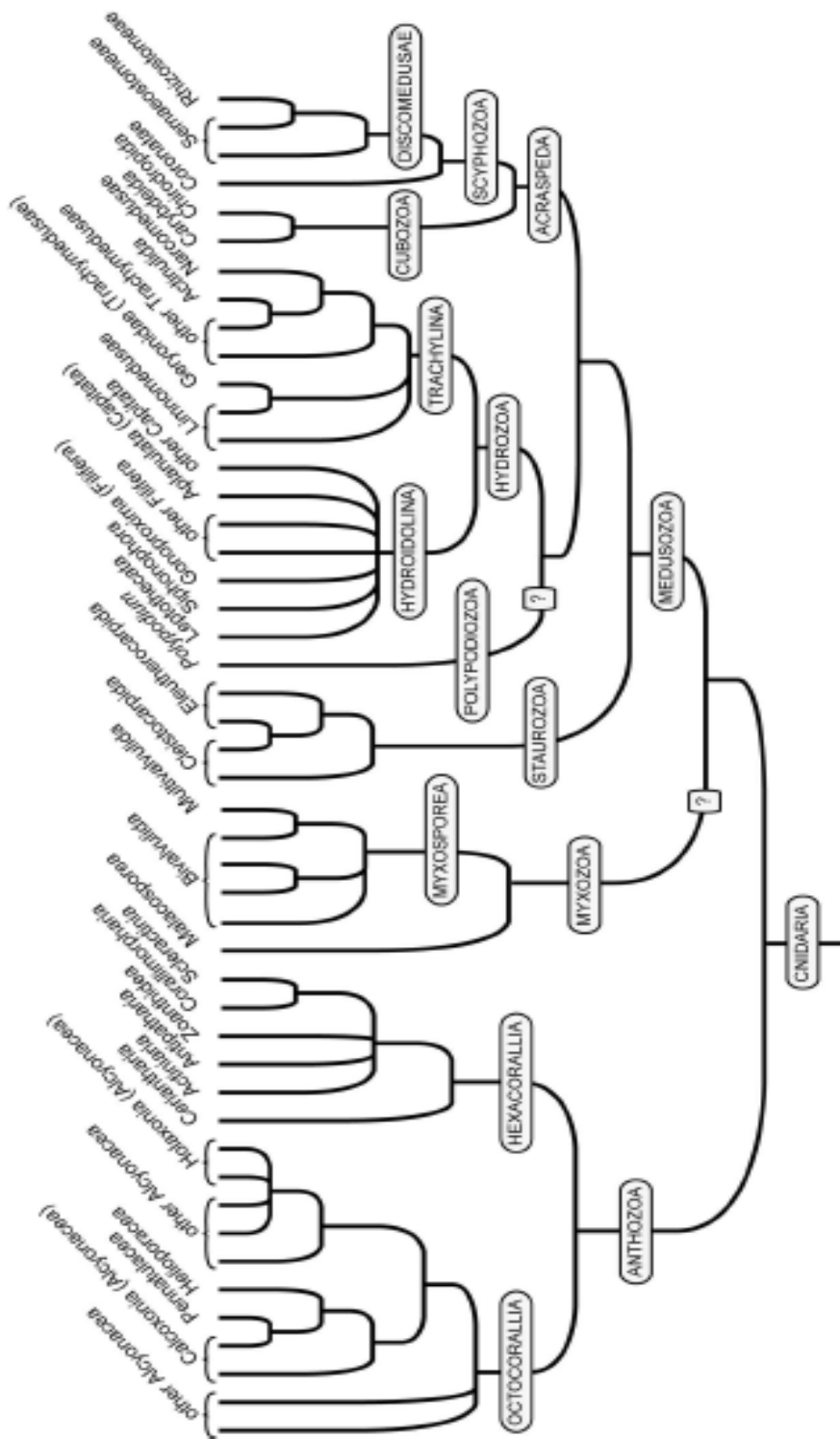


Figura 1. Hipótese de relacionamento filogenético do filo Cnidaria (tomado de Collins, 2009).

A classe Cubozoa

Os cubozoários existem pelo menos desde o Cambriano Médio, há cerca de 505 milhões de anos (Cartwright *et al.*, 2007). O grupo é composto por cerca de 50 espécies descritas até o momento (Bentlage *et al.*, 2009). As cubomedusas caracterizam-se por possuir a umbrela com formato cúbico, um velário em sua borda, e pela presença de pedálios (extensões musculares que tem origem nos cantos da umbrela, onde os tentáculos são inseridos) (ver referências em Mianzan & Cornelius, 1999; Gershwin & Alderslade, 2005; Morandini *et al.*, 2005). Na face umbrelar, entre os tentáculos, encontram-se os ropálios, estruturas sensoriais que apresentam estatocisto e seis estruturas com função fotossensível, quatro delas simples e duas compostas de córnea, lentes e retina (Yamasu & Yoshida, 1976; Hutchins *et al.*, 2003). Há dúvidas sobre a capacidade destes olhos, se seriam capazes de diferenciar um certo tipo de formas e cores como azul, verde e vermelho (Martin, 2002; Nilsson *et al.*, 2005) ou não (Garm *et al.*, 2007), mas foi demonstrado que servem para a orientação espacial da medusa (Garm *et al.*, 2011). As Cubomedusas possuem um sistema nervoso complexo se comparado aos das outras classes de cnidários, formado por uma rede umbrelar difusa de neurônios que está interligada a um anel nervoso subumbrelar. O anel nervoso principal apresenta processos que se estendem aos nichos ropaliares, e há hipóteses que nesta região ocorreria o processamento da informação captada pelos órgãos sensoriais (Hutchins *et al.*, 2003).

O cnidoma da maioria das espécies de Cubozoa é desconhecido. Há informações para pouco mais de 20 espécies de Cubozoa, baseados em materiais-tipo e em indivíduos maduros (Berger, 1900; Cleland & Southcott, 1965; Calder & Peters, 1975; Rifkin & Endean, 1983; Kinsey, 1986; Moore, 1988; Marques *et al.*, 1997; Carrette *et al.*, 2002; Oba *et al.*, 2004; Gershwin, 2006a; Collins *et al.*, 2011; entre outros). Em síntese, encontram-se três tipos principais de nematocistos: isorrizas, euritelos e mastigóforos, os dois últimos podendo ser micro- ou macrobásicos, a depender da espécie.

Os cubozoários são animais de águas tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Habitam manguezais, florestas de algas, recifes de coral e áreas adjacentes a fundos arenosos (Coates, 2003; Nogueira Jr., 2006). Passam a maior parte do tempo próximas ao fundo, embora algumas espécies migrem para a superfície à procura de alimento durante à noite (Coates, 2003; Nogueira Jr., 2006). No Atlântico sul-ocidental, o registro mais austral é para a



latitude 38°S (Pastorino, 2001), embora a ocorrência seja atípica e, provavelmente, ocasional. Para o Brasil, há quatro espécies registradas de Cubozoa, três da família Carybdeidae (*Carybdea alata*; *Tamoya haplonema* e *Tripedalia cystophora*) e uma da família Chiropsalmidae (*Chiropsalmus quadrumanus*) (Migotto *et al.*, 2002 e referências neste; Morandini, 2003). Não há registros formais de cubomedusas para outros países do Atlântico sul-americano, embora *Chiropsalmus quadrumanus* tenha sido registrada para Venezuela e Guiana Francesa (Raffaele, 2005). De fato, para toda a região, há relatos informais de banhistas e pescadores sobre envenenamentos relacionados a estes animais “cúbicos” (Haddad Jr. *et al.*, 2002; Nogueira Jr., 2004; Neves *et al.*, 2007). Além dos poucos estudos taxonômicos, pouco se sabe sobre a biologia e ecologia do grupo para o Atlântico sul-ocidental.

Os representantes da classe Cubozoa são importantes nas cadeias tróficas por serem predadores ativos e vorazes, mas também alimento para diferentes organismos, tais como a tartaruga de couro (*Dermochelys coriacea*) e peixes de grande porte como o peixe-lua (*Mola mola*) (Kinsey, 1986; 1988). A eficiência na alimentação está relacionada à sua natação, igualmente eficiente e rápida (3-6 m.min⁻¹), com sentido de direção e de giro no seu próprio eixo (Buskey, 2003; Shorten *et al.*, 2005), e resposta de atração pela luminosidade (Hartwick, 1991; Hamner *et al.*, 1995; Matsumoto, 1995) e referências aéreas (Garm *et al.*, 2011), o que as torna planctontes peculiares. A dieta, variável segundo a espécie, inclui quetognatos, isópodos, anfípodos, poliquetos, copépodos (Buskey, 2003), estádios larvais e adultos de caranguejos e camarões, e larvas e peixes adultos (Hutchins *et al.*, 2003). O processo de alimentação (por exemplo, em *Carukia barnesi*) começa com a captura da presa pelos tentáculos, que contraem-se e levam o alimento aos pedálios e posteriormente à boca; a presa então é transportada ao longo do manúbrio até chegar aos sacos gástricos, onde se inicia a digestão (Underhood & Seymour, 2007). Os padrões de alimentação são também variáveis em relação à fase do ciclo de vida ou estado de maturação sexual (Stewart, 1996; Underwood & Seymour, 2007).

A biologia da reprodução em Cubozoa é pouco conhecida para a maioria das espécies. O ciclo de vida começa com a fecundação dos ovos e formação da larva ciliada plânula, que se assenta no substrato e desenvolve o pólipo primário. Este cubopólipo pode reproduzir-se assexuadamente por fissão lateral e regeneração do segmento oral ou aboral em até 72 horas (Fisher & Hofmann, 2004). O cubopólipo desenvolvido metamorfoseia-se em uma medusa

juvenil. Algumas espécies, como por exemplo do gênero *Chiropsalmus*, podem crescer até 7 milímetros por semana e atingir a maturidade sexual em apenas 70 dias após a metamorfose (Gordon *et al.*, 2004). A fertilização é externa ou há transmissão indireta de espermátóforo com corte em alguns táxons (Werner *et al.*, 1971; Hartwick, 1991; Hutchins *et al.*, 2003; Straehler-Pohl & Jarms, 2005; Lewis & Long, 2005). A descrição da corte foi feita para *Tripedalia cystophora* (Werner *et al.*, 1971), *Carybdea sivickisi* (Lewis & Long, 2005), *Carybdea marsupialis* (Straehler-Pohl & Jarms, 2005) entre outras, em que os rituais de acasalamento são elaborados, e as fêmeas podem guardar os espermátóforos dos machos por algum tempo.

A classe Cubozoa inclui alguns dos animais mais venenosos que se conhece (Brinkman & Burnell, 2009), causando mais mortes por ano em países como Austrália e Japão que qualquer outro animal marinho. Há relatos de envenenamento por espécies dos gêneros *Chironex*, *Chiropsalmus*, *Carukia*, *Carybdea*, *Malo* e *Tamoya* (Barnes, 1964; Cleland & Southcott, 1965; Baxter & Barr, 1969; Williamson *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 2003; Currie, 2003; Nagai, 2003; Gershwin, 2005a, 2007; Underwood & Seymour, 2007; Bentlage *et al.*, 2009), cada um com veneno característico e efeitos diversos nas vítimas, assim como diferentes taxas de mortalidade (Nagai, 2003). No Brasil foram reportados pelo menos 100 casos de envenenamento causados pelas cubomedusas *Tamoya haplonema* e *Chiropsalmus quadrumanus* (Morandini & Marques, 1997; Haddad Jr. *et al.*, 2002; Haddad Jr., 2003; Neves *et al.*, 2007).

A cubomedusa mais letal para o ser humano é *Chironex fleckeri* (Southcott, 1956), causadora da morte de mais de 70 pessoas na Austrália nos últimos 50 anos, inclusive de duas crianças de 5 e 7 anos que morreram por complicações respiratórias e cardíacas em menos de 15 minutos, bem como por outras 15 mortes no Japão e na Tailândia (Fenner & Williamson, 1996; Suntrarachun *et al.*, 2001). O veneno da *C. fleckeri* apresenta alta atividade hemolítica e dermonecrótica, deixando sequelas permanentes nos sobreviventes ao envenenamento (Southcott & Kingston, 1959; Baxter & Marr, 1969).

Outras espécies são igualmente responsáveis por envenenamentos humanos, como *Chironex yamaguchii* (Lewis & Bentlage, 2009; anteriormente denominada *Chiropsalmus quadrigatus*), que foi a causadora de várias vítimas no Japão e Filipinas, mortas por insuficiência cardíaca e respiratória com edema acentuado (Fenner & Williamson, 1996; Nagai, 2003). As espécies *Carukia barnesi*, *Carukia shinju*, *Malo maxima* e *Malo kingui* são causadoras

da síndrome de Irukandji na Austrália (Gershwin, 2005a; 2007), Japão e Estados Unidos (relatos no documentário *MonsterQuest - Killer Jellyfish* da History Channel), que é caracterizada por dor intensa nas pernas, braços, costas, rins e cabeça e sensação de queimadura na pele de todo o corpo (Barnes, 1964; Fenner, 2006). *Carybdea brevipedalia* (*Carybdea rastonii*) e *Alatina* sp. (*Carybdea alata*; Gershwin, 2005b) são causadoras de vários acidentes no Japão e Hawaii, com envenenamento caracterizado por dor e inflamação cutânea exacerbada, mas que não chega a ser letal (Nagai, 2003). *Tamoya haplonema*, responsável pela síndrome de "Morbakka" em ao menos uma pessoa no Brasil, com sensação de queimadura no local, seguida por dor e inflamação intensas (Morandini & Marques, 1997). As demais espécies de Cubozoa apresentam toxinas eficientes para imobilizar e matar suas presas, mas não foram reportados casos de envenenamentos aos seres humanos.

Taxonomicamente, a classe Cubozoa apresenta um grande desenvolvimento nos últimos tempos. Há pouco ela incluía a ordem Cubomedusa, as famílias Chirodropidae e Carybdeidae, e apenas 19 espécies conhecidas (Daly *et al.*, 2007). Recentemente foram descritas as famílias Alatinidae, Carukiidae, Chiropsalmidae, Tamoyidae e Tripedaliidae, os gêneros *Chirodectes*, *Chiropsella*, *Copula*, *Gerongia*, *Malo* e *Morbakka* e as espécies *Carukia shinju*, *Malo maxima*, *Malo kingi*, *Gerongia rifkinae*, *Tamoya ohboya*, *Chironex yamaguchii*, *Chiropsoides quadrigatus*, *Chiropsella bronzie* e *Chiropsalmus alipes* (Gershwin & Alderslade, 2005; Gershwin, 2005a, 2005b, 2006b, 2007; Lewis & Bentlage, 2009; Bentlage, 2009; Collins *et al.*, 2011), mudando o panorama da classe.

A primeira filogenia abrangente para o grupo, baseada nos genes nucleares LSU e SSU e no mitocondrial 16S, resultou em duas ordens, Carybdeida e Chirodropida, a primeira com as famílias Carybdeidae (gênero *Carybdea*), Tripedaliidae (gêneros *Copula* e *Tripedalia*), Tamoyidae (gênero *Tamoya*), Carukiidae (gêneros *Malo*, *Morbakka*, *Geronia*, e *Carukia*) e Alatinidae (gênero *Alatina*); a segunda com as famílias Chirodropidae (gêneros *Chironex* e *Chirodropus*) e Chiropsalmidae (gênero *Chiropsalmus*), sendo que o gênero *Chirodropus* (Haeckel, 1880) não foi incluído na análise. As duas ordens juntas englobariam um total de aproximadamente 50 espécies de Cubozoa descritas (Bentlage *et al.*, 2009). Há uma disparidade entre a taxonomia proposta por Bentlage *et al.* (2009) e o que era previamente conhecido. Mesmo assim, as famílias Tamoyidae, Carybdeidae e Chiropsalmidae permanecem não-monofiléticas. Em relação aos padrões geográficos oceânicos dos Chirodropida, os

Chiropsalmidae estão restritos ao Atlântico e os Chirodropidae ao Indo-Pacífico (Bentlage *et al.*, 2009). Os Carybdeidae e Tamoyidae encontram-se no Atlântico; Carukiidae no Indo-Pacífico, desde Austrália até o Japão (Cleland & Southcott, 1965); as famílias Alatinidae e Tripedaliidae possuem representantes distribuídos nos três oceanos (Bentlage *et al.*, 2009). O estudo da distribuição geográfica das cubomedusas em escalas intermediárias ou regionais é pouco desenvolvido e são necessários aprofundamentos nesta área, ajudando a elucidar padrões biogeográficos, o ambiente oceânico ou costeiro das espécies e os complexos de espécies crípticas ainda por descobrir.

Chiropsalmus* (Chiropsalmidae) e *Chiropsalmus quadrumanus

O gênero *Chiropsalmus* apresenta um histórico taxonômico complicado, com várias descrições duvidosas e rearranjos de espécies e gêneros. É clara a necessidade de estudos morfológicos e moleculares detalhados para auxiliar a taxonomia do grupo.

A espécie focada neste estudo é *Chiropsalmus quadrumanus*, descrita como *Tamoya quadrumana* pelo naturalista alemão Fritz Müller (1859), baseado em espécimes provenientes da região de Santa Catarina, e posteriormente transferida para o gênero *Chiropsalmus* (Agassiz, 1862). Estudos abordam a morfologia e taxonomia da espécie para o Brasil (Marques *et al.*, 1997; Morandini *et al.*, 2005). *Chiropsalmus quadrumanus* está distribuída ao longo do litoral da costa atlântica americana, entre 35°N e 27°S (Müller, 1859; Mayer, 1910; Kramp, 1961; Mianzan & Cornelius, 1999). No Brasil, *C. quadrumanus* encontra-se desde o Pará até Santa Catarina (Müller, 1859; Vannucci, 1954, 1957; Morandini & Marques, 1997; Marques *et al.*, 1997; Migotto *et al.*, 2002; Nogueira Jr, 2004; Araújo *et al.*, 2005; Morandini *et al.*, 2005, 2006). Ignoramos se há espécimes coletados para o estado do Amapá, embora a espécie seja também registrada para aquela área (Mianzan & Cornelius, 1999). A espécie é relativamente comum no litoral brasileiro, geralmente observada nas redes de arrasto de camarão (cf. Morandini *et al.*, 2005).

É evidente que há um conhecimento incipiente sobre os Cubozoa, desde aspectos biológicos, econômicos, médicos, bio- e filogeográficos, etc. Devido à sua distribuição, relativamente restrita na costa americana (ao menos se comparada a outras espécies de Medusozoa), uma área com barreiras putativas que poderiam impedir sua distribuição

continua, *Chiropsalmus quadrumanus* torna-se um modelo interessante para estudos de estrutura de populações e filogeografia.

Biogeografia e filogeografia marinha do Atlântico sul-americano

A costa Atlântica do continente sul-americano foi formada pelo rompimento do paleocontinente Gondwana, e pode ser longitudinalmente subdividida em várias bacias (e sub-bacias) constituídas por substratos diferentes, os quais retratam os estágios evolutivos de uma deriva continental (Schobbenhaus & Brito Neves, 2003). A formação do Oceano Atlântico como um todo ocorre durante o Cretáceo, quando ocorre a separação definitiva da Gondwana, sendo o mais recente oceano a ser formado (Schobbenhaus & Brito Neves, 2003).

Alguns cenários explicativos para a origem da biota do Atlântico sul-ocidental já foram propostos. Agrupamentos de dinoflagelados marinhos do Cretáceo Médio apresentam duas hipóteses não-excludentes de diversificação da fauna atlântica sul-ocidental, justificando a separação entre uma Província Equatorial (N e NE do Brasil) e uma Província Subtropical (S e SE do Brasil): a primeira, relacionada aos organismos das bacias do Norte e Nordeste do Brasil, indica um padrão de diversificação equatorial sustentado pelo domínio do mar de Tethys dividindo Gondwana e Laurásia; a segunda, relacionada aos organismos das bacias do Sul e Sudeste do Brasil, indica uma diferenciação faunística no sentido Sul-Norte mostrando características semelhantes à província Austral, i.e., extremo sul dos oceanos Atlântico e Índico (Arai *et al.*, 2000). Portanto, uma identidade biogeográfica latitudinal poderia ter aparecido já próxima do surgimento do Oceano Atlântico.

A diferenciação biogeográfica longitudinal atlântica também já pode ser observada no Cretáceo Superior. Estudos dos padrões de distribuição de cinco famílias de foraminíferos bentônicos demonstram a formação de áreas de endemismo que estariam na mesma latitude, uma no Atlântico Ocidental (NE Brasil, Caribe e Golfo do México) e outra no Atlântico Oriental (Camarões, Congo, Gabão, Costa de Marfim e Marrocos), áreas eventualmente originadas como resposta às diferentes condições paleoclimáticas e organizações tróficas (Koutsoukos & de Klash, 2000).

Alguns processos tectônicos que afetaram a biota do Atlântico sul-ocidental foram as repetidas glaciações que influenciaram nas características físicas e climáticas, incluindo variações no nível do mar (Hastenrath, 1991) e capas de gelo no sul da Patagônia que adentravam o mar (Clapperton, 1991; Mörner, 1991a) – por outro lado, períodos interglaciais levaram a variações no nível do mar, em especial na parte central do litoral brasileiro e na Terra do Fogo (Martin *et al.*, 1991; Mörner 1991b).

Como sabido, quando barreiras separam populações em áreas geográficas restritas, estas podem diferenciarem-se a ponto de especiarem-se de maneira alopátrida. Alternativamente, populações que ocupam a mesma área geográfica, e sobre as quais não se impõem barreiras físicas, podem sofrer especiação simpátrida ou parapátrida, sendo as duas últimas eventos fundamentais na compreensão da evolução e biodiversidade marinha (Briggs, 2006).

Províncias biogeográficas marinhas têm sido definidas pela combinação de estruturas de endemismo, similaridades faunística e florística, e processos geológicos ou geográficos que sejam marcos prováveis para sua delimitação (Rosen, 1988), podendo ou não haver uma relação com barreiras atuais ou passadas que tenham tido um papel no isolamento das linhagens. Geograficamente, as províncias marinhas têm sido delimitadas ao longo da margem continental por pontos geográficos estritos, que marcam tanto a convergência ou divergência de correntes oceânicas, fatores importantes na biogeografia marinha, como também diferenças na estrutura faunística/florística (Brown & Gibson, 1983).

O Atlântico Sul conta com a proposta de diversas províncias biogeográficas, baseadas em diferentes táxons e ou abordagens. Um estudo sobre Crustacea Euphausiidae resultou na proposta de seis províncias biogeográficas na região, a saber, águas Antártica, Subantártica, Temperada, Subtropical, Tropical e a corrente de Agulhas (restrita à África), demonstrando a importância da temperatura na diversificação deste táxon (Gibbons, 1997).

A temperatura, inegavelmente relacionada à latitude, é uma variável importante também na explicação de padrões anti-tropicais de distribuição. Análises moleculares de três espécies de mexilhões do gênero *Mytilus* dos oceanos Pacífico e Atlântico foram utilizadas para testar hipóteses de distribuição anti-tropical, sendo proposto que mexilhões do hemisfério norte teriam migrado para o sul pela rota Atlântica no Pleistoceno, seguindo-se alguns outros eventos semelhantes mais recentes (Hilbish *et al.*, 2000).

Alguns ambientes, tais como os coralíneos, são questões peculiares para a compreensão da distribuição geográfica da biota. Os padrões de distribuição geográfica de 35 espécies de peixes coralíneos da província Brasileira demonstram que o Rio Amazonas é uma barreira efetiva entre as populações caribenhas e as do restante da costa sul-americana levantando-se a hipótese de que a dispersão transoceânica para estes peixes ocorreu provavelmente por três vias diferentes: (1) do Caribe ao Atlântico Norte e Atlântico Oriental, (2) do norte do Brasil ao norte da Guiné - Bissau e (3) da África ao sul do Brasil (Joyeux *et al.*, 2001). Os autores concluem que o sucesso na colonização das novas localidades dependeu mais da capacidade das espécies de se manterem no ambiente determinado que em suas habilidades dispersivas.

A filogenia e paleobiogeografia do gênero cosmopolita *Hexabathynella* (Crustacea Syncarida) sugere que as últimas espécies a se diversificar foram as da América do Sul, e que o padrão de distribuição do gênero pode ter acontecido por vicariância devido à tectônica de placas e a evolução do mar de Tethys durante o Mesozóico e Cenozóico (Camacho, 2003).

Há evidências de relação entre o Atlântico Ocidental e o Pacífico Oriental. Estudos moleculares com os marcadores calmodulina (nuclear) e 16S (mitocondrial) e paleontológicos demonstram que o gênero tropical de Gastropoda *Conus* possui duas linhagens que divergiram há pelo menos 33 milhões de anos (Terciário), uma do Indo-Pacífico e a outra do Atlântico Ocidental e o Pacífico Oriental, presumindo-se, entretanto, que houve diferentes eventos de migração entre as duas grandes regiões, eventualmente utilizando o Mar de Tethys como rota de migração (Duda & Kohn, 2005).

Análises de parcimônia de endemismo (PAE) foram poucas vezes utilizadas para descrever os padrões de distribuição em organismos marinhos do Atlântico sul-americano. Um estudo utilizou espécies da família Terebellidae (Annelida Polychaeta) em uma escala global, encontrando altos níveis de endemismo na maioria das áreas estudadas, embora muitas das espécies extintas no hemisfério sul (táxons encontrados na costa brasileira, argentina e antártica) tenham origem Laurásica ou provenham de uma linhagem ancestral de algumas áreas do Norte (Garraffoni *et al.*, 2006). Estudo de PAE para o gênero *Oswaldella* (Hydrozoa Kirchenpaueriidae) na Antártica propuseram quatro áreas de endemismo que refletem os processos que tem influenciado a biota antártica, como a formação de correntes profundas de águas frias, a abertura do Estreito da Tasmânia e a formação do Golfo Australo-Antártico (Marques & Peña-Cantero, 2010).

Outro estudo para a região subantártica e antártica, mais especificamente para o Mar de Scotia (ao sul da Tierra del Fuego), foi baseado em táxons de invertebrados marinhos de profundidade, e concluiu que (1) a dispersão dos táxons estudados para as águas profundas ocorreu desde a plataforma Antártica e não a partir do subcontinente sul-americano, (2) alguns táxons diversificaram-se recentemente, com representantes que habitam a plataforma Antártica e outros em águas de profundidade; e (3) a distribuição geográfica de cada táxon varia de acordo com a ecologia de dispersão larval e a profundidade que habita (Brandt *et al.*, 2007).

O estudo de genética populacional para citocromo oxidase I (COI) de seis espécies de cladóceros em uma escala global, revelaram variação intraespecífica em 4 de 5 espécies da família Podonidae e nenhuma variação genética significativa para uma espécie de Sididae, indicando que a dispersão da primeira família ocorreu do Plioceno Superior ao Pleistoceno Médio, enquanto a segunda ocorreu mais recentemente (Durbin *et al.*, 2008)

Análises de DNAm 16S e COI para o krill nerítico (gênero *Nyctiphanes*), distribuído nos oceanos Pacífico e Atlântico, demonstraram sua origem no Pacífico durante o Mioceno, com diversificação atlântica após o fechamento do Mar de Tethys, sugerindo uma via de dispersão Sul-Norte desde o Indo-Pacífico, passando pela África do Sul e chegando às costas atlânticas – o padrão de distribuição antitropical apresentado sugere que o processo de dispersão possui um papel fundamental na evolução do grupo (D’Amato *et al.*, 2008).

Uma análise biogeográfica abrangente incluiu espécies de Mollusca (bivalves e gastrópodes) e Bryozoa (queilostomados e ciclostomados) do hemisfério sul, e evidenciou relações próximas entre as faunas bentônicas antártica e sul-americana, com pouca evidência da possível relação destas com a Nova Zelândia e Tasmânia, evidenciou também a influência da Corrente Circumpolar Antártica na distribuição do bentos da região e caracterizou o Atlântico Sul como uma unidade funcional única (e não como duas províncias biogeográficas, Oriental e Ocidental) – ressalva-se, entretanto, que a definição e regiões biogeográficas dependem do táxon animal utilizado, embora algumas regras gerais sejam viáveis (Griffiths *et al.*, 2009).

Pelo exposto, pode-se concluir que:

- o Mioceno e Pleistoceno foram cenários importantes no início da diversificação da fauna sul-americana atual;
- o Mar de Tethys foi importante na dispersão de vários táxons marinhos diversificados no Mesozóico;
- a separação da Gondwana deu origem a uma grande diversificação de espécies atualmente encontradas na América do Sul;
- comparada com outros continentes, a fauna marinha do Atlântico sul-americano tem uma história evolutiva recente;
- os registros fósseis e dados filo e biogeográficos de grupos atuais demonstram padrões de dispersão e diversificação tropicais e anti-tropicais;
- o grupo de estudo é determinante no resultado das províncias biogeográficas, assim como sua biologia e história geológica/oceanográfica da área de endemismo;
- não se pode ignorar o impacto antropogênico na caracterização de padrões de distribuição geográfica.

O Atlântico sul-americano atual

Atualmente, a circulação superficial do Atlântico Sul consiste em um grande vórtice, formado pelas correntes sul-equatorial (ao norte), do Brasil (ao oeste), parte da circumpolar Antártica (ao sul) e a de Benguela (ao leste) (Boltovskoy E., 1981). Na porção norte do Atlântico sul-ocidental, a corrente sul-equatorial se divide em dois ramos ao encontrar o continente sul-americano: a corrente das Guianas no sentido noroeste, com temperatura entre 24° e 30°C e salinidade superior a 36‰, e a corrente do Brasil no sentido sul-sudoeste, com temperaturas tropicais na sua origem (ca. 30°C), até formar uma corrente subtropical com temperaturas de 18 a 24°C e salinidade entre 34,5 e 36‰ (Boltovskoy E., 1981). Na “seção nerítica brasileira” (franjas neríticas nas costas do Brasil e Uruguai), as águas costeiras

ocupam uma franja de pequena largura, coincidente com a plataforma, que não possui um bordo oriental bem definido, nem uma salinidade muito diferente da encontrada em mar aberto, ou seja, pouco menos de 36‰. A temperatura média superficial desta água nerítica oscila em médias de 12°C na parte sul no inverno e 27°C na parte norte no verão, exibindo uma alta diversidade de espécies planctônicas, porém em baixas concentrações (Boltovskoy E., 1981).

Meridionalmente, a corrente das Malvinas avança até cerca dos 40°S, onde se encontra, com a corrente, agora subtropical, do Brasil. Em seu encontro, as duas correntes tomam o sentido leste como parte do vórtice subtropical (Boltovskoy E., 1981). A corrente das Malvinas vem carregada de nutrientes gerando um importante centro de produção nas águas da plataforma continental (Ramírez, 2002) onde habitam diversas espécies criófilas na denominada “província Magalhânica”. Na Península de Valdez já se pode perceber a influência das águas quentes provenientes da corrente do Brasil, que aporta espécies termófilas (cf. Boltovskoy E., 1981; Severov, 1990). No entanto, a variação sazonal de temperatura dessa região foi relacionada por outros autores às condições próprias do regime de ventos, profundidade e circulação das massas de água, e não à influência destas águas subtropicais vindas do norte (Lucas *et al.*, 2005).

Na região do Atlântico Sul-Occidental identificam-se algumas barreiras putativas para o plâncton e/ou bentos e e/ou nécton sul-americano, tais como: (a) a divisão da corrente sul-equatorial em dois ramos com sentidos divergentes; (b) a quebra de salinidade determinada pelas bocas de grandes rios, como o Rio Amazonas e o Rio da Prata, as quais podem afetar espécies suscetíveis a mudanças na salinidade da água; (c) a quebra de continuidade geográfica pela presença de cadeias submarinas, como a cadeia Vitória-Trindade, ocorrendo ao longo da crosta oceânica situada na latitude correspondente ao Estado do Espírito Santo, por exemplo. Entretanto, a porção oceânica do Atlântico Sul foi considerada mais regular e contínua que a do Atlântico Norte devido a uma menor proporção de acidentes geográficos emergentes, fato que teria contribuído para que o Atlântico austral apresente seus limites faunísticos mais homogêneos em relação à longitude e mais conspícuos em relação à latitude que o Atlântico Boreal (Boltovskoy D., 1981).

O Rio Amazonas é responsável pela maior descarga de água continental recebida pelo Atlântico, atingindo $300.000 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$, baixando sua salinidade até 500 km de sua foz na direção

noroeste (Ramírez, 2002). Na plataforma continental desta região forma-se, paulatinamente, um grande delta submarino, com sedimentos de areia e conchas na área externa e lodo na área interna (Capurro, 1981). Por um lado, a descarga empobrece o plâncton oceânico em sua foz, mas isso é gradativamente modificado pela interação com a corrente das Guianas. Por outro lado, o aporte de nutrientes do rio contribui para um desenvolvimento excepcional de planctontes (Boltovskoy D., 1981). Como ressaltado acima, a barreira do Rio Amazonas exerce um poder de isolamento para peixes coralíneos (Joyeux *et al.*, 2001), embora pouco ainda se saiba sobre seu efeito em outros grupos.

O Rio da Prata é a segunda maior descarga de água doce que Oceano Atlântico Sul-Occidental recebe, com aproximadamente $22.000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (Urien, 1972; Framiñan & Brown, 1996). As descargas têm um padrão sazonal ao longo do ano, com volume máximo no inverno e mínimo no verão (Lucas *et al.*, 2005; Piola *et al.*, 2005). O estuário formado pela descarga do Rio da Prata chega a ter uma área de 35.000 Km^2 (Mianzan *et al.*, 2001a). O padrão de distribuição destas águas estuarinas varia com a direção e velocidade dos ventos, assim como a sazonalidade, onde se percebe menor salinidade na costa Argentina nos meses de verão e maior salinidade no outono e inverno na costa do Uruguai (Guerrero *et al.*, 1997). A barreira da foz do Rio da Prata foi recentemente investigada e aparentemente não é efetiva no isolamento de populações de Medusozoa (Ale, 2008).

A zona de fratura de Vitória-Trinidade se encontra localizada na latitude $18^{\circ}40'S$ na Cordilheira Mesoatlântica, em frente ao Estado do Espírito Santo (Thomaz-Filho *et al.*, 2005). Esta zona de fratura se define como uma depressão de aproximadamente 6 km na direção leste-oeste. Sua extensão para oeste corresponde à Cadeia Vitória-Trinidade, representada por montanhas submersas que limitam desníveis crustais de mais de 400 m e províncias sedimentares de características e espessuras distintas (Alves *et al.*, 2008). Esta formação pode ser uma barreira física para alguns táxons marinhos, inclusive planctônicos.

Na atualidade, estima-se que 70% das espécies conhecidas hoje do zooplâncton marinho ocorram no Atlântico sul (Boltovskoy *et al.*, 2003). Como foi dito anteriormente, fatores abióticos como correntes marinhas, marés, descargas de águas continentais, salinidade, temperatura, tipo de substrato, profundidade, etc., além de uma série de fatores bióticos, regulam as distribuições populacionais do zooplâncton (cf. Webb *et al.*, 2002).

Diante deste cenário de variáveis diretas ou indiretas que influenciam a evolução de linhagens de organismos marinhos na região, uma dúvida que se acerca é a possibilidade de subestimarmos a biodiversidade do plâncton Sul-Americano quando menosprezamos os efeitos de suas barreiras. Esta hipótese é agravada pela utilização de descrições taxonômicas incompletas, por grande parte das identificações serem originalmente baseadas em literatura relacionada a outras regiões do globo (em especial Atlântico Norte e Mediterrâneo), e por eventuais posições conservadoras por parte de taxonomistas da área. Como resultado esperado, há a possibilidade de haver diferentes linhagens evolutivas sendo tratadas sob o mesmo nome taxonômico, ou seja, de estarmos diante de espécies crípticas. Questões como esta serão abordadas no segundo capítulo deste trabalho, tomando como modelo a cubomedusa *Chiropsalmus quadrumanus* (Chiropsalmidae) e como cenário físico a costa brasileira.

Referências

- Agassiz, L. 1862. Contributions to the natural history of the United States of America. IV Second monograph, in five parts, Acalephs in general, Ctenophorae, Discophorae, Hydroidae, homologues of the Radiata. Brown & Co., Boston, 380p.
- Ale, E. 2008. Estudo filogeográfico de duas espécies de medusozoários (Cnidaria), *Liriope tetraphylla* (Trachymedusae, Geryoniidae) e *Olindias sambaquiensis* (Limnomedusae, Olindiasidae), em uma região do Oceano Atlântico Sul-Occidental. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 73p.
- Alvariño, A. 1975. Depredadores planctônicos y la pezca. In: Memorias del II Simposio Latinoamericano sobre Oceanografía Biológica. Cumaná, 197p.
- Alves, E.C., Maia, M. Sichel, S.E., Campos, C.M.P. 2008. Zona de fratura Vitória-Trindade no Oceano Atlântico sudeste e suas implicações tectônicas. Revista Brasileira de Geofísica, 24: 1-14.
- Arai, M.N. 2005. Predation on pelagic coelenterates: a review. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 85, 523-536.
- Arai, M., Neto, J.B., Lana, C.C., Pedrão, E. 2000. Cretaceous dinoflagellate provincialism in Brazilian marginal basins. Cretaceous Research, 21: 351-366.
- Araújo, C., Morandini, A.C., Silveira, F.L., Couto, E.C.G. 2005. Distribuição espaço-temporal e dinâmica populacional de *Chiropsalmus quadrumanus* (F. Müller, 1859) (Cnidaria: Cubozoa) na costa de Ilhéus (Bahia, Brasil), 2003-2004. Proceedings XI COLACMAR, Viña del Mar, 254-254.
- Bailey, P.M., Little, M., Jelinek, G.A., Wilce, J.A. 2003. Jellyfish envenoming syndromes: unknown toxic mechanisms and unproven therapies. Medical Journal of Australia, 178: 34-37.
- Barnes, J.H. 1964. Cause and effect in Irukandji Stings. The Medical Journal of Australia, 1: 897-904.
- Baxter, E.H., Marr, A.G., 1969. Sea wasp (*Chironex fleckeri*) venom: lethal, haemolytic and dermonecrotic properties. Toxicon, 7: 195-210.
- Bentlage, B., Cartwright, P., Yanagihara, A.A., Lewis, C., Richards, G.S., Collins, A.G. 2009. Evolution of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa), a group of highly toxic invertebrates. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 1707: 1-10.

- Berger, E.W. 1900. Physiology and histology of the Cubomedusae, including Dr. F.S. Conant's notes on the physiology. *Memoirs from the Biological Laboratory of the Johns Hopkins University*, 4: 1-84.
- Boltovskoy, D. 1981. Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, 936p.
- Boltovskoy, E. 1981. Masas de agua en el Atlántico Sudoccidental. Pp. 227-237. In: Boltovskoy, D. (Ed.), Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, 936p.
- Boltovskoy, D., Correa, N., Boltovskoy, A. 2003. Marine zooplankton diversity: a view from the South Atlantic. *Oceanologica Acta*, 25: 271-278.
- Brandt, A., Gooday, A.J., Brandão, S.N., Brix, S., Brökeland, W., Cedhagen, T., Cornelius, N., Danis, B., De Mesel, I., Diaz, R.J., Gillan, D.C., Choudhury, M., Howe, J.A., Janussen, D., Kaiser, S., Linse, K., Malyutina, M., Pawlowski, J., Ebbe, B., Raupach, M., Vanreusel, A. 2007. First insights into the biodiversity and biogeography of the Southern Ocean deep sea. *Nature*, 447: 307-311.
- Brewer, R.H. 1989. The annual pattern of feeding, growth, and sex reproduction in *Cyanea* (Cnidaria: Scyphozoa) in the Niantic River Estuary, Connecticut. *The Biological Bulletin*, 176: 272-281.
- Bridge, D., Cunningham, C.W., Schierwater, B., DeSalle, R., Buss, L.W. 1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence for mitochondrial genome structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 8750-8753.
- Briggs, J.C. 2006. Proximate sources of marine biodiversity. *Journal of Biogeography*, 33: 1-10.
- Brinkman, D.L. Burnell, J.N. 2009. Biochemical and molecular characterisation of cubozoan protein toxins. *Toxicon*, 54: 1162-1173.
- Brown, J. H., Gibson, A. C. 1983. *Biogeography*. The C.V. Mosby Co., St. Louis, 643p.
- Buskey, E.J. 2003. Behavioral adaptations on the cubozoan medusa *Tripedalia cystophora* for feeding on copepod (*Dioithona oculata*) swarms. *Marine Biology*, 142: 225-232.

- Calder, D.R., Peters, E.C. 1975. Nematocysts of *Chiropsalmus quadrumanus* with comments on the systematic status of the Cubomedusae. Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen, 27: 364-369.
- Camacho, A.I. 2003. Historical biogeography of *Hexabathynella*, a cosmopolitan genus of groundwater Syncarida (Crustacea, Bathynellacea, Parabathynellidae). Biological Journal of the Linnean Society, 78: 457-466.
- Capurro, L.R.A. 1981. Características físicas del Atlántico Sudoccidental. Pp. 129-225. In: Boltovskoy, D. (Ed.), Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino, 936p.
- Carrette, T., Alderslade, P., Seymour, J. 2002. Nematocyst ratio and prey in two Australian cubomedusans, *Chironex fleckeri* and *Chiropsalmus* sp. Toxicon 40: 1547-1551.
- Carrette, T., Seymour, J. 2004. A rapid and repeatable method for venom extraction from cubozoan nematocysts. Toxicon 44: 135-139.
- Cartwright, P., Halgedahl, S.L., Hendricks, J.R., Jarrard, R.D., Marques, A.C., Collins, A.G., Liberman, B.S. 2007. Exceptionally preserved jellyfishes from the Middle Cambrian. PLoS ONE, 10: e1121.
- Clapperton, C.M. 1991. Influence of tectonics on the extent of quaternary glaciations in the Andes. Boletim do Instituto de Geologia da USP, 8: 89-108.
- Cleland, J.B., Southcott, R.V. 1965. Injuries to Man from marine invertebrates in the Australian Region. Commonwealth of Australia, Canberra, 282p.
- Coates, M.M. 2003. Visual ecology and functional morphology of Cubozoa (Cnidaria). Integral Compendium Biology, 43: 542-548.
- Collins, A.G. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. Journal of Evolutionary Biology, 15: 418-432.
- Collins, A.G. 2009. Recent insights into cnidarian phylogeny. Smithsonian Contributions to the Marine Science, 38: 139-149.
- Collins, A.G., Schuchert, P., Marques, A.C., Jankowski, T., Median, M., Schierwater, B. 2006. Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. Systematic Biology, 55: 97-115.

- Collins, A.G., Bentlage, B., Gillan, W., Lynn, T.H., Morandini, A.C., Marques, A.C. 2011. Naming the Bonaire banded box jelly, *Tamoya ohboya*, n. sp. (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeida: Tamoyidae). *Zootaxa*, 53-68.
- Currie, B.J. 2003. Marine antivenoms. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 41 (3): 301-308.
- D'Amato, M.E., Gordon, W.H., de Oliveira, T., Teske, P.R., Gibbons, M.J. 2008. Molecular dating and biogeography of the neritic krill *Nyctiphanes*. *Marine Biology*, 155: 243-247.
- Duda Jr., T.F., Kohn, A.J. 2005. Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 257-272.
- Durbin, A., Hebert, P.D.N., Cristescu, M.E.A. 2008. Comparative phylogeography of marine cladocerans. *Marine Biology*, 155: 1-10.
- Endean, R., Rifkin, J., 1975. Isolation of different types of nematocysts from the cubomedusan *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, 13: 375-376.
- Fautin, D.G. 2009. Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon*, 54: 1054-1064.
- Fenner, P.J. 2006. Jellyfish responsible for Irukandji syndrome. *Quarterly Journal of Medicine*, 99: 802-803.
- Fenner, P.J., Williamson, J.A. 1996. Worldwide deaths and severe envenomation from jellyfish stings. *The Medical Journal of Australia*, 165: 658-661.
- Fisher, A.B., Hofmann, D.K. 2004. Budding, bud morphogenesis, and regeneration in *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cnidaria: Cubozoa). *Hydrobiologia*, 530/531: 331-337.
- Framiñan, M.B., Brown, O.B. 1996. Study of the Rio de la Plata turbidity front, Part I: spatial and temporal distribution. *Continental Shelf Research*, 16(10): 1259-1282.
- Garm, A., Coates, M.M., Gad, R., Seymour, J., Nilsson, D.E. 2007. The lens eyes of the box jellyfish *Tripedalia cystophora* and *Chiropsalmus* sp. are slow and color-blind. *Journal of Comparative Physiology, A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 193: 547-557.
- Garm, A., Oskarsson, M., Nilsson, D.E. 2011. Box jellyfish use terrestrial visual cues for navigation. *Current Biology*, 21: 1-6.
- Garraffoni, A.R.S., Nihei, S.S., Lana, P.C. 2006. Distribution patterns of *Terebellidae* (Annelida: Polychaeta): an application of Parsimony Analysis of Endemicity (PAE). *Scientia Marina*, 70: 269-276.

- Gershwin, L. 2005a. Two new species of jellyfish (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeida) from tropical Western Australia, presumed to cause Irukandji Syndrome. *Zootaxa*, 1084: 1-30.
- Gershwin, L. 2005b. *Carybdea alata* auct. and *Manokia stiasnyi*, reclassification to a new family with description of a new genus and two new species. *Memoirs of the Queensland Museum*, 51(2): 501-523.
- Gershwin, L., Alderslade, P. 2005. A new genus and species of box jellyfish (Cubozoa: Carybdeidae) from tropical Australian waters. *The Beagle, Records of the museums and Art Galleries of the Northern Territory*, 21: 27-36.
- Gershwin, L., 2006a. Nematocysts of the Cubozoa. *Zootaxa*, 1232: 1-57.
- Gershwin, L., 2006b. Comments on *Chiropsalmus* (Cnidaria: Cubozoa: Chiropodida): a preliminary revision of the Chiropsalmidae, with descriptions of two new genera and two new species. *Zootaxa*, 42: 1-42.
- Gershwin, L. 2007. *Malo kingi*: A new species of Irukandji jellyfish (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeida), possibly lethal to humans, from Queensland, Australia. *Zootaxa*, 1659: 55-68.
- Gibbons, M.J. 1997. Pelagic biogeography of the South Atlantic Ocean. *Marine Biology*, 129: 757-768.
- Gordon, M., Hatcher, C., Seymour, J. 2004. Growth and age determination of the tropical Australian cubozoan *Chiropsalmus* sp. *Hydrobiologia*, 530/531: 339-345.
- Gravier-Bonnet, N. 1987. Nematocysts as taxonomic discriminators in thecate hydroids. Pp. 43-55. In: Bouillon, J.; Boero, F.; Cicogna, F., Cornelius, P.F.S. (eds.). *Modern trends in the systematics, ecology and evolution of hydroids and hydromedusae*. Oxford University Press, Oxford, 328p.
- Griffiths, H.J., Barnes, D.K.A., Linse, K. 2009. Towards a generalized biogeography of the Southern Ocean benthos. *Journal of Biogeography*, 36: 162-177.
- Guerrero, R.A., Acha, E.M., Framinan, M.B., Lasta, C.A. 1997. Physical oceanography of the Rio de la Plata estuary, Argentina. *Continental Shelf Research*, 17: 727-742.
- Haddad Jr., V., Silveira, F.L., Cardoso, J.L.C., Morandini, A.C. 2002. A report of 49 cases of cnidarian envenoming from southeastern Brazilian coastal waters. *Toxicon*, 40: 1445-1450.
- Haddad Jr., V. 2003. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 591-597.

- Haeckel, E. 1880. System der Acraspeden. Zweite Hälfte des System der Medusen. G. Fischer, 361-672.
- Hamner, W.M., Jones, M.S., Hamner, P.P. 1995. Swimming, feeding, circulation and vision in the Australian box jellyfish, *Chironex fleckeri* (Cnidaria, Cubozoa). *Marine and Freshwater Research*, 46: 985-990.
- Hartwick, R.F. 1991. Observations on the anatomy, behaviour, reproduction and life cycle of the cubozoan *Carybdea sivickisi*. *Hydrobiologia*, 216/217: 171-179.
- Hastenrath, S. 1991. A review of glacier variations in the tropics: The past 500,000 years. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 71-73.
- Hensen, V.1887. Ueber die Bestimmung des Planktons oder des im Meere treibende Materials an Pflanzen und Thieren. *Berichte der Kommission Wissenschaftlichen Untersuchung der Deutschen Meere*, 5: 1-109.
- Hilbish, T.J., Mullinax, A., Dolven, S.I., Meyer, A.R., Koehn, K., Rawson, P.D. 2000. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. *Marine Biology*, 136: 69-77.
- Hsieh, Y.H.P., Leong, F.M., Rudloe, J. 2001. Jellyfish as food. *Hydrobiologia*, 451: 11-17.
- Hutchins, M., Thoney, D.A., Schlager, N. (Eds.). 2003. *Grzimek's Animal life Encyclopedia*. 2nd edition. Gale group, Farmington Hills, 1: 506p.
- Joyeux, J.C., Floeter, S.R., Ferreira, C.E.L., Gasparini, J.L. 2001. Biogeography of tropical reef fishes: the South Atlantic puzzle. *Journal of Biogeography*, 28: 831-841.
- Kinsey, B.E. 1986. *Barnes on Box Jellyfish*. Sir George Fisher Centre for Tropical Marine Studies, James Cook University, Townsville, 76p.
- Kinsey, B.E. 1988. *More Barnes on box jellyfish*. Sir George Fisher Centre for Tropical Marine Studies, James Cook University, Townsville, 109p.
- Koutsoukos, E.A.M., de Klasz, I. 2000. Late Cretaceous foraminiferal biogeography (families Bolivinidae, Buliminellidae, Gavelinellidae, Siphogenerinoididae, Turrilnidae) in northeastern Brazilian shelf and central West African basins. *Cretaceous Research*, 21: 381-405.
- Kramp, P.L. 1961. Synopsis of the medusae of the world. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 40: 1-469.
- Kramp, P.L. 1965. Some medusae (mainly Scyphomedusae) from Australian coastal waters. *Transactions of the Royal Society of South Australia*, 89: 257-278.

- Lane, C.E., Dodge, E., 1958. The toxicity of *Physalia* nematocysts. *Biological Bulletin*, 115: 219-226.
- Lewis, C. Bentlage, B. 2009. Clarifying the identity of the Japanese Habu-kurage, *Chironex yamaguchii*, sp. nov. (Cnidaria: Cubozoa: Chirodropida). *Zootaxa*, 2030, 59-65.
- Lewis, C., Long, T.A.F. 2005. Courtship and reproduction in *Carybdea sivickisi* (Cnidaria: Cubozoa). *Marine Biology*, 147: 477-483.
- Lucas, A.J., Guerrero, R.A., Mianzan, H.W., Acha, E.M., Lasta, C.A. 2005. Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine continental shelf (34-43°S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65: 405-420.
- Marques, A.C., Morandini, A.C., Pinto, M.M. 1997. Cnidome of *Chiropsalmus quadrumanus* (Cnidaria, Cubozoa) from Brazil. *Proceedings VII COLACMAR, Santos*, 1: 136-138.
- Marques, A.C., Collins, A.G. 2004. Cladistics analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology*, 123: 23-42.
- Marques, A.C., Peña-Cantero, A.L. 2010. Areas of endemism in the Antarctic - a case study of the benthic hydrozoan genus *Oswaldella* (Cnidaria, Kirchenpaueriidae). *Journal of Biogeography*, 37(4): 617-623.
- Martin, L., Flexor, J.M., Suguio, K. 1991. Possible changes in the Holocene wind pattern recorded on southeastern Brazilian coast. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 117-131.
- Martin, V. J. 2002. Photoreceptors of Cnidarians. *Canadian Journal of Zoology*, 80: 1703-1722.
- Matsumoto, G.I. 1995. Observations on the anatomy and behaviour of the cubozoan *Carybdea rastonii* Haacke. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 26: 139-148.
- Mayer, A.G. 1910. The Scyphomedusae. Pp. 499-735. In: *The medusae of the world*. Carnegie Institution, Washington D.C., 735p.
- Mianzan, H.W., Cornelius, P.F.S. 1999. Cubomedusae y Scyphomedusae. Pp. 513-559. In: Boltovskoy, D. (Ed.). *South Atlantic Zooplankton*. Backhuys Publishers, Leiden, vol. 1, 868p.
- Mianzan, H.W., Pájaro, M., Alvarez Colombo, G., Madirolas, A. 2001a. Feeding on survival-food: gelatinous plankton as a source of food for anchovies. *Hydrobiologia*, 451: 45-53.
- Mianzan, H.W., Lasta, C.A., Acha, E.M., Guerrero, R.A., Macchi, G.J., Bremec, C. 2001b. The Rio de la Plata Estuary, Argentina-Uruguay. Pp. 186-204. In: Seeliger, U., de Lacerda, L.D.,

- Kjerfve, B. (Eds.), *Ecological Studies: Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. Springer-Verlag, Berlin, 438p.
- Migotto, A.E., Marques, A.C. Morandini, A.C., Silveira, F.L. 2002. Checklist of the Cnidaria Medusozoa of Brazil. *Biota Neotropica*, 2: 1-31.
- Migotto, A.E., Marques, A.C. 2006. Invertebrados marinhos. Pp. 149-202. In: Lewinsohn T. (Ed.), *Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 288p.
- Moore, S.J. 1988. A new species of cubomedusan (Cubozoa: Cnidaria) from northern Australia. *The Beagle, Records of the Northern Territory Museum of Arts and Sciences*, 5: 1-4.
- Morandini, A.C., Marques, A.C. 1997. "Morbakka" syndrome: first report of envenomation by Cubozoa (Cnidaria) in Brazil. *Proceedings VII COLACMAR, Santos*, 1: 188-189.
- Morandini, A.C. 2003. Deep-sea medusae (Cnidaria: Cubozoa, Hydrozoa and Scyphozoa) from the coast of Bahia (western South Atlantic, Brazil). *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut, Hamburg*, 100: 13-25.
- Morandini, A.C., Ascher, D., Stampar, S.N., Ferreira, J.F.V. 2005. Cubozoa e Scyphozoa (Cnidaria: Medusozoa) de águas costeiras do Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, 95: 281-294.
- Morandini, A.C., Soares, M.O., Matthews-Cascon, H., Marques, A.C. 2006. A survey of the Scyphozoa and Cubozoa (Cnidaria, Medusozoa) from the Ceará coast (NE Brazil). *Biota Neotropica*, 6: 1-8.
- Mörner, N.A. 1991a. The Patagonian glaciations and the onset of general quaternary-type glaciations on the globe. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 109-115.
- Mörner, N.A. 1991b. Holocene sea level changes in the Tierra del Fuego region. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 133-151.
- Müller, F. 1859. Zwei neue Quallen von Santa Catharina. *Tamoya haplonema* und *quadrumana*. *Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Halle*, 5: 1-12.
- Nagai, H. 2003. Recent progress in jellyfish toxin study. *Journal of Health Science*, 49: 337-340.
- Neves, R.F., Amaral, F.D., Steiner, A.Q. 2007. Levantamento de registros dos acidentes com cnidários em algumas praias do litoral de Pernambuco (Brasil). *Ciência & Saúde Coletiva*, 12: 231-237.
- Nogueira Jr., M. 2004. Aspectos de biologia e ecologia das cubomedusas (Cnidaria) do litoral paranaense. Monografia de Bacharelado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 32p.

- Nogueira Jr., M. 2006. Macrozooplâncton gelatinoso do litoral do Paraná: composição, abundância e aspectos ecológicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 164p.
- Oba, A., Hidaka, M., Iwanaga, S. 2004. Nematocyst composition of the cubomedusan *Chiropsalmus quadrigatus* changes with growth. *Hydrobiologia*, 530/531: 173-177.
- Piola, A.R., Matano, R.P., Palma, E.D., Möller Jr, O.O., Campos, J.D. 2005. The influence of the Plata River discharge on the western South Atlantic shelf. *Geophysical Research Letters*, 32: 1-4.
- Pastorino, G. 2001. New record of the Cubomedusa *Tamoya haplonema* Müller, 1859 (Cnidaria: Scyphozoa) in the South Atlantic. *Bulletin of Marine Science*, 68 (2): 357-360.
- Purcell, J.E. Graham, W.M., Dumont, H.J. 2001. Jellyfish blooms: ecological and societal importance. *Hydrobiologia*, 451: 1-333.
- Raffaele, R. 2005. Killers in paradise. *Smithsonian magazine*. Disponível em <http://www.smithsonianmag.com/specialsections/ecocenter/oceans/killers.html> [acesso em 02/04/2011].
- Ramírez, F.C. 2002. Plancton sin formol. Publicación Especial del INIDEP, Mar del Plata, 215p.
- Rifkin, J., Endean, R. 1983. The structure and function of the nematocysts of *Chironex fleckeri* Southcott, 1956. *Cell & Tissue Research*, 233: 563-577.
- Rosen, B. R., 1988. Biogeographic patterns: a perceptual overview. Pp. 269-301. In: Myers, A.A. & Giller, P.S. (Eds.), *Analytical Biogeography: an integrated approach to the study of animal and plant distribution*. Chapman and Hall, London, 578p.
- Russell, F.S. 1970. *The Medusae of the British Isles. Part II*. Cambridge Press., London, 284p.
- Schobbenhaus, C., Brito-Neves, B.B. 2003. A Geologia do Brasil no contexto da plataforma sul-americana. Pp. 5-54. In: Bizzi, L.A., Schobbenhaus, C., Vidotti, R. M., Gonçalves, J. H. (Eds.), *Geologia, tectônica e recursos minerais do Brasil*. CPRM, Editora da Universidade de Brasília, Brasília, 692p.
- Severov, D.N. 1990. Particularidades de las condiciones oceanológicas del Atlántico Sud-occidental sobre la base de características temporales medias procedentes de una serie de años. *Frente Marítimo*, 6: 109-119.
- Shorten, M.O., Devenport, J., Seymour, J., Cross, M.C., Carrette, T.J., Woodward, G., Cross, T.F. 2005. Kinematic analysis of swimming in Australian box jellyfish *Chiropsalmus* sp. and *Chironex fleckeri* (Cubozoa, Cnidaria, Chirodropidae). *Journal of Zoology*, 267: 371-380.

- Southcott, R.V. 1956. Studies on Australian Cubomedusae, including a new genus and species apparently harmful to man. Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 7: 254-280.
- Southcott, R.V. 1967. Revision of some Carybdeidae (Scyphozoa: Cubomedusae), including a description of the jellyfish responsible for the Irukandi syndrome. Australian journal of Zoology, 15: 651-671.
- Southcott, R.V., Kingston, C.W. 1959. Lethal jellyfish stings: a study in 'sea wasps'. The Medical Journal of Australia, 1: 443-444.
- Stewart, S.E. 1996. Field behavior of *Tripedalia cystophora* (class Cubozoa). Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 27: 175-188.
- Straehler-Pohl, I., Jarms, G. 2005. Life cycle of *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cubozoa, Carybdeidae) reveals metamorphosis to be a modified strobilation. Marine Biology, 147 (6): 1271-1277.
- Suntrarachun, S., Roselieb, M., Wilde, H., Sitprija, V. 2001. A fatal jellyfish encounter in the Gulf of Siam. Journal of Travel Medicine, 8: 150-151.
- Thomaz-Filho, A., Cesero, P., Mizusaki, A.M.P., Leão, J.G. 2005. Hot spot volcanic tracks and their implications for South American plate motion, Campos Basin (Rio de Janeiro State), Brazil. Journal of South American Earth Sciences, 18: 383-389.
- Tronolone, V.B. 2007. Estudo faunístico e da distribuição das hidromedusas (Cnidaria, Hydrozoa) da região compreendida entre Cabo frio (RJ) e Cabo de Santa Marta Grande (SC), Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 209p.
- Underwood, A.H., Seymour, J.E. 2007. Venom ontogeny, diet and morphology in *Carukia barnesi*, a species of Australian box jellyfish that causes irukandji syndrome. Toxicon, 49: 1073-1082.
- Urien, C.M. 1972. The Rio de la Plata Estuary environments. Geological Society of America, 133: 213-234.
- Vannucci, M. 1954. Hydrozoa e Scyphozoa existentes no Instituto Oceanográfico. Boletim do Instituto Paulista de Oceanografia, 5: 95-150.
- Vannucci, M. 1957. Distribuição de Scyphozoa nas costas do Brasil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 29: 593-598.

- Webb, C.O., Ackerly, D.D., McPeck, M.A., Donoghue, M.J. 2002. Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33: 475-505.
- Werner, B., Cutress, E.C., Studenbaker, J.P. 1971. Life cycle of *Tripedalia cystophora* Conant (Cubomedusae). *Nature*, 232 (5312): 582-583.
- Werner, B. 1973. New investigations on systematics and evolution of the class Scyphozoa and the phylum Cnidaria. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, 20: 35-61.
- Werner, B. 1975. Structure and life history of the polyp of *Tripedalia cystophora* (Cubozoa, class, nov., Carybdeidae) and its importance for the evolution of Cnidaria. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 27: 461 -504.
- Werner, B., Chapman, D.M., Cutress, C.E. 1976. Muscular and nervous systems of the cubopolyp (Cnidaria). *Experientia*, 32: 1047-1049.
- Williamson, J.A., Fenner, P.J., Burnett, J.W., Rifkin, J.F. (Eds.). 1996. *Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook*. University of New South Wales Press Ltd, Sydney, 504p.
- Wrobel, D. & Mills, C.E. 1998. *Pacific coast pelagic invertebrates: a guide to the common gelatinous animals*. Sea Challenger and Monterey Bay Aquarium Publication, California, 112p.
- Yamasu, T., Yoshida, M. 1976. Fine structure of complex ocelli of a cubomedusan, *Tamoya bursaria* Haeckel. *Cell and Tissue Research*, 170: 325-339.

Capítulo 2

Cryptic speciation of *Chiropsalmus cf. quadrumanus* (Cubozoa: Chirodropidae) lineages from Brazil

Abstract

The box jellyfish *Chiropsalmus cf. quadrumanus* (Cubozoa: Chiropsalmidae) inhabits the Atlantic coast of America, between 35°N and 27°S. The goal of this study was to analyze the haplotype structure of four populations of *C. cf. quadrumanus* from the Brazilian coast. We carried out our analyses based on the COI and 16S mitochondrial markers and the nuclear ITS region of 40 individuals from Ceará (03°43'S 038°29'W); Rio de Janeiro (22°37'S 041°54'W); São Paulo (23°26'S 45°04' W) and Paraná (25°41'S 048°25'W). Phylogenetic and haplotype network analyses of the markers revealed a deep genetic divergence between two lineages, Ceará-São Paulo and Rio de Janeiro-Paraná. Our results suggest that the species *Chiropsalmus cf. quadrumanus* is a complex of species resulting of the mixture of over-conservative taxonomy and cryptic speciation.

Key words: Cubozoa, *Chiropsalmus*, COI, 16S, ITS, cryptic speciation.

Resumo

A cubomedusa *Chiropsalmus cf. quadrumanus* (Cubozoa: Chiropsalmidae) habita na costa Atlântica americana entre os 35°N e 27°S. O objetivo deste trabalho foi analisar a estrutura haplotípica de quatro populações da *C. cf. quadrumanus* da costa brasileira. Nossas análises foram baseadas nos marcadores mitocondriais COI e 16S e a região nuclear ITS de 40 indivíduos provenientes de Ceará (03°43'S 038°29'W); Rio de Janeiro (22°37'S 041°54'W); São Paulo (23°26'S 45°04' W) e Paraná (25°41'S 048°25'W). Análises filogenéticas e de redes de haplótipos de cada marcador revelaram uma profunda divergência gênica entre duas

linhagens, Ceará - São Paulo e Rio de Janeiro - Paraná. Nossos resultados sugerem que a espécie *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* é um complexo de espécies resultado da combinação entre taxonomia conservadora e especiação críptica.

Palavras chave: Cubozoa, *Chiropsalmus*, COI, 16S, ITS, especiação críptica.

Resumen

La cubomedusa *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* (Cubozoa: Chiropsalmidae) habita en la costa Atlántica americana, entre los 35°N e 27°S. El objetivo de este trabajo fue analizar la estructura haplotípica de cuatro poblaciones de la *C.* cf. *quadrumanus* en la costa brasilera. Nuestros análisis se basaron en los marcadores mitocondriales COI y 16S y la región nuclear ITS de 40 individuos provenientes de Ceará (03°43'S 038°29'W); Rio de Janeiro (22°37'S 041°54'W); São Paulo (23°26'S 45°04' W) y Paraná (25°41'S 048°25'W). Análisis filogenéticas y de redes de haplótipos de cada marcador, revelaron una profunda divergencia génica entre dos linajes, Ceará - São Paulo y Rio de Janeiro - Paraná. Nuestros resultados sugieren que la especie *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* es un complejo de especies resultado de una combinación entre taxonomía conservacionista y especiación críptica.

Palabras clave: Cubozoa, *Chiropsalmus*, COI, 16S, ITS, especiación críptica.

Introduction

Recent studies on marine invertebrates have shown that wide distributions, like widespread species in global or oceanic scales, may represent actually cryptic species with deep phylogenetic structures (e.g. Dawson & Jacobs, 2001; Douek *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2004; Kawauchi & Giribet, 2010; Barroso *et al.*, 2010). These cryptic patterns contrast with the classic idea of wide dispersal capability of the marine taxa (cf. Palumbi, 1994).

The box jellyfish *Chiropsalmus quadrumanus* (Müller, 1859) was recently placed into the family Chiropsalmidae (Gershwin, 2006a), most likely a para- or polyphyletic taxon (Bentlage *et al.*, 2009). *Chiropsalmus quadrumanus* inhabits warm waters of the American Atlantic coast, from North Carolina State (35°N) in USA to Santa Catarina State (27°S) in Brazil (Müller, 1859; Mayer, 1910; Kramp, 1961; Mianzan & Cornelius, 1999; Migotto *et al.*, 2002 and references therein). The species is commonly captured in towing nets and sometimes found

stranded on sand beaches. The life cycle of the species is still unknown, although its morphology and cnidome is relatively well-known (cf. Calder & Peters, 1975; Marques *et al.*, 1997; Morandini *et al.*, 2005; Gershwin, 2006b).

In order to test the population structure and haplotype diversity of the wide distributed species *C. cf. quadrumanus* in the southwestern Atlantic, we carried out a phylogeographic analysis using mitochondrial (CO1, 16S) and nuclear (ITS complex) markers for distant populations. Therefore, the goal of this study is to analyze the population structure based on phylogeographic and morphometric data of four different Brazilian populations commonly assigned to *C. quadrumanus*.

Material and methods

Samples and DNA extraction

We have used 40 mature individuals of *Chiropsalmus cf. quadrumanus* for molecular analysis. The material was sampled in coastal waters from September/2008 to October/2009 along the Brazilian coast, in the states of Ceará (CE), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), and Paraná (PR) (Fig. 1), using trawling nets and immediately preserved in 70-95% ethanol.

Subsamples of tentacular tissue were dissected of each specimen and conserved in pure ethanol at -20°C. These subsamples were used for DNA extraction using InstaGene (Bio-Rad) or Wizard genomic DNA purification kit (PROMEGA), in order to get cleaner DNA extractions because of the great amount of constitutive mesoglea present in the jellyfish tissue. DNA and protein concentrations of each sample were quantified by spectrophotometry to continue the process of amplification.



Figure 1. Collecting sites of *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* in Brazil. Fortaleza in Ceará (03°43'S 038°29'W); Macaé in Rio de Janeiro (22°37'S 041°54'W); Ubatuba in São Paulo (23°26'S 45°04' W) and Pontal do Sul in Paraná (25°41'S 048°25'W).

PCR amplification and sequencing of mitochondrial COI, 16S and nuclear ITS molecular markers

PCR amplifications were performed in a 25 μ l reaction volume containing 7.5 μ l of 10x PCR buffer, 3.8 μ l of 2.5mM MgCl₂, 3.8 μ l dNTPs (100 μ M), 3 μ l of each primer (0.4 μ M), 0.4 μ l of 0.6 U of Taq Polymerase and 2 μ l of DNA template. The thermal cycler program was specific for each molecular marker. A 365 bp section of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene was amplified using primers LCO1490F (5'- GGTCACAAATCATAAAGATATTGG; Folmer *et al.*, 1994) and HC02198R (5'- TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA; Folmer *et al.*, 1994) and a program consisted in two loops: one with 10 cycles at 94°C/30 s; 48°C/60 s and a final extension step of 72°C/80 s, followed by 25 cycles at 94°C/30 s; 50°C/40 s and a final extension of 72°C/80 s. Primers employed to amplify a 391 bp section of ribosomal mitochondrial 16S gene were CB1F (5'- TCGACTGTTTACCAAAAACATA; Cunningham & Buss, 1993) and 2ScyR (5'- CTGTTATCCCTACGGTAAC; E. Ale, unpublished primer), using a denaturation step at 95°C/15 min, followed by 35 cycles at 94°C/45 s; 53°C/30 s; 72°C/45 s and a final extension step of 72°C/5 min. A 579 bp portion of the nuclear Internal Transcript

Spacers ITS (ITS1-5.8S-ITS2) were amplified with the primers JFITS1F (5'-GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC; Dawson & Jacobs, 2001) and Cas28SB1dR (5'-TTCTTTTCCTCCSCTTAYTRATATGCTTAA; Ji *et al.*, 2003) and its consisted in a denaturation step at 94°C/5 min, followed by 35 cycles at 94°C/30s; 53°C/40 s; 72°C/1min and a final extension of 72°C/10 min. Positive (sample already tested) and negative (template-free reaction) controls were included in every PCR reaction that were checked for the presence of proper size amplified DNA fragments using a 1.5% agarose gel.

Purification of PCR products was performed with AMPure® (Agencourt®). Big Dye reaction was carry out with the Big Dye® Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems) following manufacturer's instructions and using the same primers for PCR. Sequencings of both strands of DNA were performed on an ABI PRISM® 3100 genetic analyzer (Hitachi). We assembled ten samples per population for the three molecular markers, in a total of 120 samples evaluated.

Molecular divergence and demographic history

Contig sequences were edited in SEQUENCHER™ 4.6 (Gene Codes Corporation) and aligned using BioEdit© with the ClustalW multiple alignment tool (Hall, 1999). Uncorrected pairwise distances between populations were calculated in BioEdit (Hall, 1999). Sequences of *Chironex fleckeri* (Chirodripidae) from the NCBI-Genbank (COI: FJ665181.1; 16S: GQ849103.1; ITS: U65477.1) were used as an outgroup for rooting the topologies.

Phylogenetic analyses were carried out treating gaps as missing entries. Maximum Parsimony (MP) analyses were performed with heuristic search using PAUP 4.1 (Swofford, 2002) for COI, 16S and ITS molecular markers and POY v. 4.1.1 (Varón *et al.*, 2009) to create the concatenated phylogeny including the 3 markers considering gaps as phylogenetically informative transformation events. Maximum Likelihood (ML) was carried out in PALM (Chen *et al.*, 2009). The Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1974) was employed to select the most appropriate model of DNA substitution for each dataset. The model SYM was applied to COI, GTR to 16S, TVM to ITS complex and GTR+G to combined data (COI+16S+ITS). Branch support was calculated using bootstrap (Felsenstein, 1985) with 10,000 replicates for MP and 1,000 for ML. In addition, Bayesian inferences (BI) were carried out with MrBayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), applying the setting for the best model (GTR) according to Modeltest (Posada & Crandall, 1998). BI analyses were run for 100,000 Monte-Carlo Markovian Chain (MCMC) generations, sampling every 100 simulations, burn-in 250, Lset nst = 6 rates =

invgamma. Haplotype networks were estimated using the median join (MJ) algorithm and the statistical parsimony procedure as implemented in Network (Polzin & Daneschmand, 2003). Haplotype diversity values and gene flow between populations through Tajima's, Fu and Li's tests for each population and each marker were calculated using DnaSP 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009).

Morphometrical analyses

Morphometrical analyses were performed with five individuals for each population. Measurements of bell height (BH) and diameter (BD), velarium width (VW), manubrium length (ML), and pedaliu length (PL) were taken, as well as the number of digitate projections in the pedaliu. Nematocysts of tentacular tissue were examined under microscope, documented using Zoom Browser 6.3.1.8. software, identified after Mariscal (1974), Calder (1975), Östman (2000), and Gershwin (2006b), and measured both with ocular micrometer of the compound microscope and the UTHSCSA ImageTool 3.0 software. Statistical analysis was done using GraphPad Prism5 software, and results were expressed as means \pm standard deviations (SD). Nonparametric Tukey's significant difference test was carried out with *P* values < 0.05 corresponding to statistical significance.

Results

Forty different sequences resulted in 9 haplotypes for COI, 7 for 16S, and 4 for ITS (Table 1). DNA distance matrices (COI, 16S and ITS) of these 40 sequences show two different groups (Tables 2-4). The first group encompasses specimens from Ceará State (CE) and São Paulo State (SP) and the second group encompasses specimens from Rio de Janeiro State (RJ) and Paraná (PR) – the divergences inside the groups vary from 0% (i.e., two states sharing haplotypes) to 0.8% for the three markers. However, comparisons between CE-SP and RJ-PR reveal deeper divergences, from 9% (a two pair comparison for both 16S and ITS) to 19% (for COI).

Table 1. Summary statistics of the differentiation of 40 sequenced specimens of *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* per marker.

	Number of haplotypes	Segregating sites	Haplotype diversity (Hd)	Nucleotide diversity (π)
COI	9	64	0.7603	0.08414
16S	7	38	0.6295	0.04444
ITS	4	42	0.6764	0.04295

Table 2. DNA pairwise distance matrix (minimum-maximum) for populations of *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* from four Brazilian states according to **COI**.

	Ceará	Rio de Janeiro	São Paulo	Paraná
Ceará	0-1%	18-19%	0.2-0.8%	18-19%
Rio de Janeiro	18-19%	0-0.5%	18-19%	0-0.8%
São Paulo	0.2-0.8%	18-19%	0%	19%
Paraná	18-19%	0-0.8%	19%	0-0.8%

Table 3. DNA pairwise distance matrix (minimum-maximum) for populations of *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* from four Brazilian states according to **16S**.

	Ceará	Rio de Janeiro	São Paulo	Paraná
Ceará	0-0.8%	10%	0-0.5%	9-10%
Rio de Janeiro	10%	0-0.2%	9-9.5%	0-0.2%
São Paulo	0-0.5%	9-9.5%	0%	9-9.5%
Paraná	9-10%	0-0.2%	9-9.5%	0-0.2%

Table 4. DNA pairwise distance matrix (minimum-maximum) for populations of *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* from four Brazilian states according to ITS.

	Ceará	Rio de Janeiro	São Paulo	Paraná
Ceará	0%	9%	0%	9%
Rio de Janeiro	9%	0-0.4%	9%	0.2-0.4%
São Paulo	0%	9%	0%	9%
Paraná	9%	0.2-0.4%	9%	0%

The MP, ML and BI topologies of COI, 16S, ITS and the concatenated analysis of COI+16S+ITS (Figure 2) show the same topologies [basically ((CE-SP)(RJ-PR))], varying only in the position of some individuals into the same clade. The only less inclusive clade individualized is SP, for which the individuals form a monophyletic lineage. Parsimony haplotype networks also show the dissimilarity between two cryptic lineages as in ((CE-SP)(RJ-PR)) for COI (Figure 3), 16S (Figure 4), and ITS (Figure 5). Estimations of gene flow between populations through Tajima's, Fu and Li's tests for each population and each marker (data not shown) had no significant results, indicating constant population size for all localities.

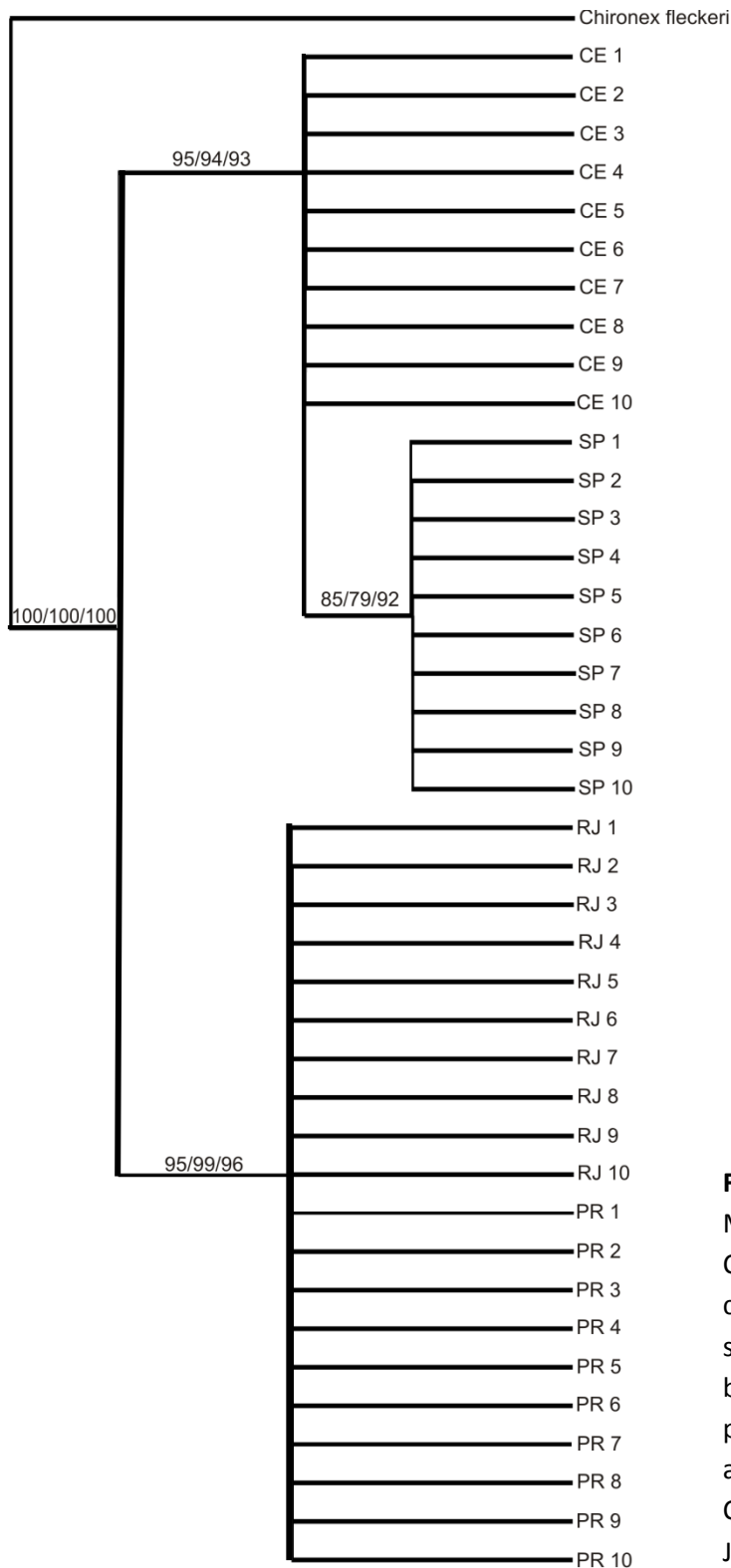


Figure 2. Phylogenetic hypotheses for MP, ML and BI for the mitochondrial COI, 16S, nuclear ITS data, and concatenated sequences, having the same congruent topology. Indices of bootstrap support for MP and ML, and posterior probability for MCMC for BI are shown above each clade. Legend: CE (Ceará), SP (São Paulo), RJ (Rio de Janeiro) and PR (Paraná).

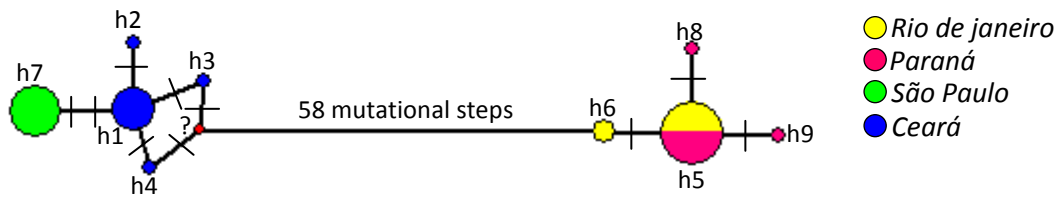


Figure 3. COI haplotype network of 40 samples of *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus*. Bar onto connections represents a single mutational step; size of circles represents frequencies of each haplotype; (?) indicates intermediate haplotypes not observed in this study.

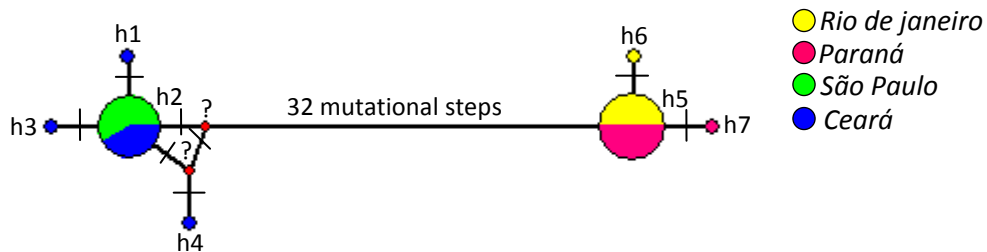


Figure 4. 16S haplotype network of 40 samples of *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus*. Bar onto connections represents a single mutational step; size of circles represents frequencies of each haplotype; (?) indicates intermediate haplotypes not observed in this study.

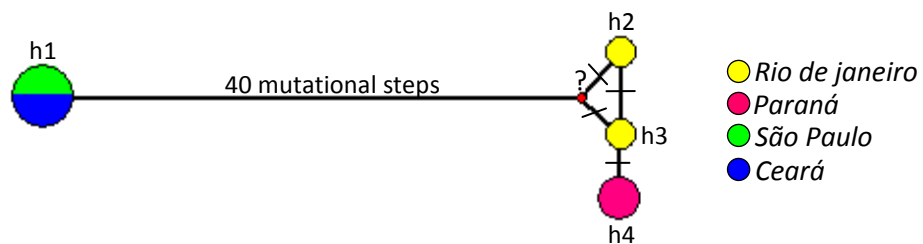


Figure 5. ITS haplotype network of 40 samples of *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus*. Bar onto connections represents a single mutational step; size of circles represents frequencies of each haplotype; (?) indicates intermediate haplotypes not observed in this study.

Morphometric variation among populations was detected for body morphology (Figure 6) but not for cnidome for the three types of nematocysts in all populations (Figure 7). Tukey's test resulted in statistically significant differences for bell height (CE vs. RJ, CE vs. PR, RJ vs. SP, SP vs. PR); pedalius length (CE vs. RJ, CE vs. PR, RJ vs. SP); manubrium length (CE vs. PR, SP vs. PR).

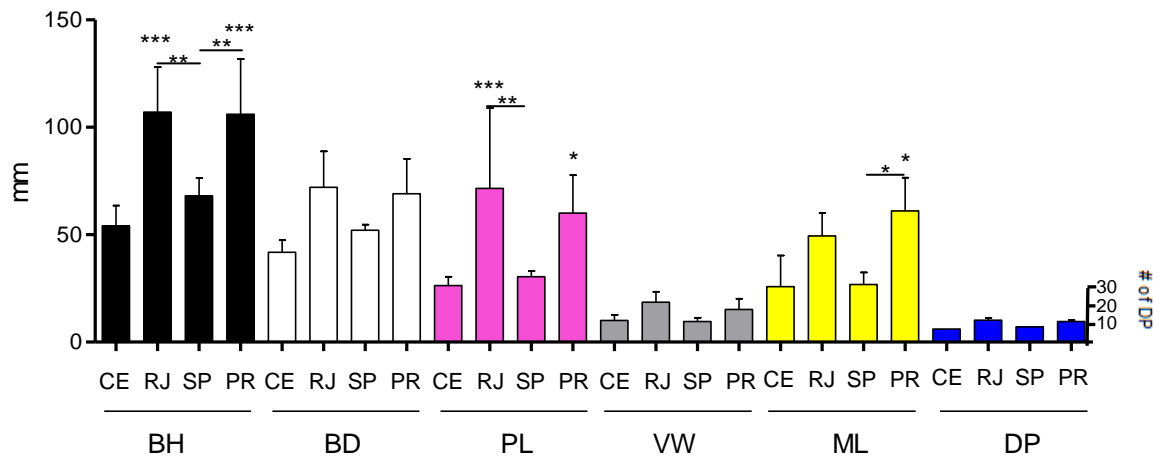


Figure 6. Morphometric comparison of the four populations of *Chiropsalmus cf. quadrumanus*. Measurements refer to bell height (BH; black bars), bell diameter (BD; white bars), pedalius length (PL; pink bars), velarium width (VW; grey bars), manubrium length (ML; yellow bars), and number of digitate projections of the pedalius (DP; blue bars). Legend: CE (Ceará), SP (São Paulo), RJ (Rio de Janeiro), and PR (Paraná). Each bar represents the average of five measurements with associated standard deviation indicated by the lines. ***, ** and * significant difference ($P < 0,0001$; $P < 0,01$; $P < 0,05$, respectively) after Tukey's significant difference test.

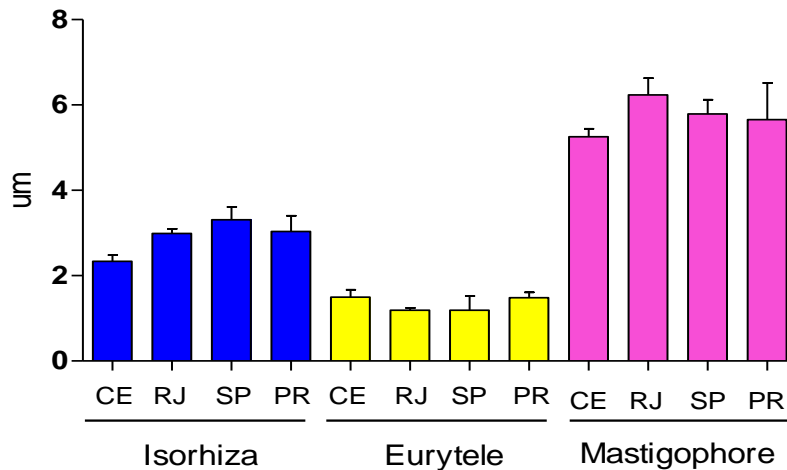


Figure 7. Nematocyst types ratio (length/wide) comparison of the four populations of *Chiropsalmus cf. quadrumanus*. Measurements refer to isorhiza (blue bars), eurytele (yellow bars), and mastigophore (pink bars). Legend: CE (Ceará), SP (São Paulo), RJ (Rio de Janeiro) and PR (Paraná). Each bar represents the average of five measurements with associated standard deviation indicated by the lines. No significant difference was found after Tukey's significant difference test.

Discussion

Molecular markers have been considered effective tools to study population structures (Bucklin & Kocher, 1996), delimitation of species boundaries (Wiens, 1999; Rubinoff & Sperling, 2002), complex life cycles (Miranda *et al.*, 2010), and phylogeography surveys (Avice, 1987). Phylogenetic and phylogeographic inferences addressing these questions should integrate mitochondrial and nuclear DNA combined with ecological, behavioral and morphological data (Kawauchi & Giribet, 2010) – the use of one type of molecular marker is hazardous and may lead to incomplete or erroneous discoveries (cf. Rubinoff & Holland, 2005 and references therein), as well as ignore important biological information. Occasionally, unraveling the genetic structure of populations may reveal cases of cryptic speciation, such as those already been reported for medusozoan taxa around the world (e.g., Dawson & Jacobs, 2001; Holland *et al.*, 2004) even specifically for Atlantic cubozoans (Collins *et al.*, 2011).

The only known species of the genus *Chiropsalmus* for the Western Atlantic Ocean is *Chiropsalmus quadrumanus*, originally described as *Tamoya quadrumana* by Fritz Müller

(1859) from Santa Catarina state (southern Brazil) (see Agassiz, 1862). The species is easily distinguished from other Atlantic cubozoans by its characteristic hand-shaped pedalia and cloverleaf-shaped gastric sacs (Morandini *et al.*, 2005). Other morphological characters are also used to identify the species, especially by amateurs, such as the brown warts on the bell surface, but some characters are lost after preservation.

The congruent results (MP, ML, BI, haplotype network and some morphometric comparisons) for all markers (COI, 16S, ITS, and concatenated sequences) support the hypothesis of two cryptic lineages within the *Chiropsalmus cf. quadrumanus* complex in Brazil. These cryptic lineages have deep divergences, from 9% (16S and ITS) to 19% (for COI) (Tables 2-4) and are highly supported in all analyses (Figure 2). However, the clades do not present latitudinal/geographical structures: the population from Ceará (northernmost region included in the analysis) and São Paulo nest together against the populations of Rio de Janeiro and Paraná (southernmost region). Besides, there is no putative barrier that could be hypothesized as the cause of the lineage differentiation. Therefore, considering the total geographical distribution of the lineages, there is a large area of sympatry (extending minimally from RJ to SP), in which the distributions are overlapped.

Haplotype networks also show two well defined loops of samples (CE-SP and RJ-PR) connected by 32-58 mutational steps depending on the marker (COI, 16S, ITS) (Figures 3-5). Populations of the same lineage share haplotypes for each marker, suggesting intra-lineage genetic connectivity. Biologically, the dispersal capability of *C. cf. quadrumanus* has not been studied. On one hand, it is still a challenge to understand how the distant populations from Ceará and São Paulo remain connected, even though box jellyfish are good swimmers (Hammer *et al.*, 1995; Buskey, 2003; Coates, 2003), especially because of the influence of ocean water masses such as Equatorial and Brazilian currents (*cf.* Boltovskoy, 1981). On the other hand, connectivity between Rio de Janeiro and Paraná populations is feasible and could be facilitated by the southward Brazilian current.

Genetic differences in *C. cf. quadrumanus* from geographically distant specimens from North Carolina and Rio de Janeiro was detected hitherto (Bentlage *et al.*, 2009). We have compared this DNA sequence from North Carolina material and found it different from both Brazilian lineages (8-12 % for 16S). Therefore, there are at least three cryptic species under the name *Chiropsalmus cf. quadrumanus* in the Western Atlantic. This number may increase with

better sampling and more complete samples from the possible ghost populations, mainly from the Caribbean, northern Brazil, from Ceará to Rio de Janeiro, and from Santa Catarina State (type locality).

Once the general morphology of the Brazilian specimens of *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* is similar, we searched for morphometric differences between the populations used in the phylogeographic analysis. There is statistically significant difference between the two different lineages (CE-SP and RJ-PR) in the bell height (BH). Other characteristics, including those of the cnidome, do not support both lineages, even though pedaliem length (RJ vs. SP) and manubrium length (CE vs. PR) were found to be significantly different. Therefore, morphometrical patterns are congruent with the molecular evidence.

Taxonomic consequences of our delimitation of two lineages are important to be remarked. A neotype of *Chiropsalmus quadrumanus* was proposed based on a specimen with 8 cm in bell height and 7 digitate projections in pedalia, from the northern coast of the State of São Paulo (Ubatuba - Gershwin, 2006a: 8, MZUSP Cnidarian Collection, 493). The specimens described by F. Müller (1859), ca. 10 cm tall and 12 cm in diameter, were from the State of Santa Catarina, therefore geographically closer to Paraná. Other specimens recorded in the literature from SW Atlantic are from Surinam (4-8 cm BH) and Brazil in the states of Paraíba (2.5-3 cm BH); Bahia (5 cm BH); Espírito Santo (3.5 cm BH); Rio de Janeiro (8 cm BH); São Paulo (Ubatuba 5-6 cm BH; including Gershwin's neotype the range would be 5-8 cm); and Paraná (5 cm BH) (Gershwin, 2006a). The impossibility to get DNA data from these specimens and the existence of an area of sympatry make it difficult to establish morphological and geographical boundaries for the two cryptic Brazilian lineages. Apparently, the lineage referring to *Chiropsalmus quadrumanus*, as originally described by Fritz Müller (1859), would correspond to larger specimens. This lineage may live at the subtropical region under influence of southern Central Atlantic South Water (CASW), such as usually occur in Brazilian Southern states (Paraná and Santa Catarina) and in upwelling region influence (as in the location sampled in the State of Rio de Janeiro). Therefore, the neotype of *Chiropsalmus quadrumanus* would correspond to the new species.

The uncertainty on the taxonomy of the Atlantic genus *Chiropsalmus* resulted from a mixture of conservativeness taxonomy, scattered information, and cryptic speciation. The lack of additional material from intermediate populations and the lack of knowledge on historical

features (Marques *et al.*, 2003), life-cycle, ecology, ontogeny, and behavior data of *C. cf. quadrumanus* prevent us from establishing clear species boundaries and their definitions. Presently we assume the existence of at least three cryptic species in the *C. cf. quadrumanus* complex, both with sympatric (the Brazilian lineages) and allopatric distribution (the North-American lineage). The South-American lineages are corroborated either by multiloci phylogeography and morphometric features.

Acknowledgements

We would like to thank Amanda Cunha, Juliana Bardi, Lucília Miranda, Thaís Miranda, Sabrina Baroni, and Maximiliano Maronna for discussions and laboratory support. André Morandini, Bastian Bentlage, Eduardo Monteiro, Fernando Marques, Helena Matthews-Cascon, Tito Lotufo, The Animal Ecology Laboratory (LABOMAR) students and Renato Nagata provided access to biological material, and Ezequiel Ale provided access to unpublished primer. This work had financial support from CAPES, CNPq, and FAPESP.

References

- Agassiz, L. (1862) *Contributions to the natural history of the United States of America – Second monograph 4*. Little, Brown & Co., Boston, 380 pp.
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transaction on Automatic Control*, 19: 716-723.
- Avise, J.C, Arnold, J., Martin Ball, R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.
- Barroso, R., Klautau, M., Solé-Cava, A.M., Paiva, P.C. 2001 *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae), the "cosmopolitan" fireworm, consist of at least three cryptic species. *Marine Biology*, 157: 69-80.
- Baker, J.M., Funch, P., Giribet, G. 2007. Cryptic speciation in the recently discovered American cyclophoran *Symbion americanus*; genetic structure and population expansion. *Marine Biology*, 152: 2183-2193.
- Bentlage, B., Cartwright, P., Yanagihara, A.A., Lewis, C., Richards, G.S., Collins, A.G. 2009. Evolution of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa), a group of highly toxic invertebrates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1707: 1-10.
- 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.
- Boltovskoy, E. 1981. Masas de agua en el Atlántico Sudoccidental. Pp. 227-237. In: Boltovskoy, D. (Ed.), *Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, 936p.
- Bucklin, A., Kocher, T.D. 1996. Source regions for recruitment of *Calanus finmarchicus* to George Bank: Evidence from molecular population genetic analyses of mtDNA. *Deep-Sea Research Part II*, 43: 1665-1681.

- Buskey, E.J. 2003. Behavioral adaptations of the cubozoan medusa *Tripedalia cystophora* for feeding on copepod (*Dioithona oculata*) swarms. *Marine Biology*, 142: 225-232.
- Calder, D.R., Peters, E.C. 1975. Nematocysts of *Chiropsalmus quadrumanus* with comments on the systematic status of the Cubomedusae. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 27: 364-369.
- Chen, S.H., Su, S.Y., Lo, C.Z., Chen, K.H., Huang, T.J., Kuo, B.H., Lin, C.Y. 2009. PALM: a Paralleled and integrated framework for Phylogenetic Inference with Automatic Likelihood Model selectors. *PLoS ONE*, 4: 1-6.
- Coates, M.M. 2003. Visual ecology and functional morphology of Cubozoa (Cnidaria). *Integrative and Comparative Biology*, 43: 542-548.
- Collins, A.G., Bentlage, B., Gillan, W., Lynn, T.H., Morandini, A.C., Marques, A.C. 2011. Naming the Bonaire banded box jelly, *Tamoya ohboya*, n. sp. (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeida: Tamoyidae). *Zootaxa*, 2753: 53-68.
- Cunningham, C.W., Buss, L.W. 1993. Molecular evidence for multiple episodes of paedomorphosis in the family Hydractiniidae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(1): 57-69.
- Dawson, M.N., Jacobs, D.K. 2001. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biological Bulletin*, 200: 92-96.
- Douek, J., Barki, Y., Gateño, D., Rinkevich, B. 2002. Possible cryptic speciation within the sea anemone *Actinia equina* complex detected by AFLP markers. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 136: 315-320.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- 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: 294-197.
- Gershwin, L., 2006a. Comments on *Chiropsalmus* (Cnidaria: Cubozoa: Chirodropida): a preliminary revision of the Chiropsalmidae, with descriptions of two new genera and two new species. *Zootaxa*, 42: 1-42.

- Gershwin, L., 2006b. Nematocysts of the Cubozoa. *Zootaxa*, 1232: 1-57.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98. Available: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> [Accessed April 18 2011].
- Hammer, W.M., Jones, M.S., Hammer, P.P. 1995. Swimming, feeding, circulation and vision in the Australian box jellyfish, *Chironex fleckeri* (Cnidaria: Cubozoa). *Marine and Freshwater Research*, 46: 985-990.
- Holland, B.S., Dawson, M.N., Crow, G.L., Hofmann, D.K. 2004. Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): Molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian islands. *Marine Biology*, 145: 1119-1128.
- Ji, Y.J., Zhang, D.X., He, L.J. 2003. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*, 3: 581-585.
- Kawauchi, G.Y., Giribet, G. 2010. Are there true cosmopolitan sipunculan worms? A genetic variation study within *Phascolosoma perlucens* (Sipuncula, Phascolosomatidae). *Marine Biology*, 157: 1417-1431.
- Kramp, P.L. 1961. Synopsis of the medusae of the world. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, 40: 1-469.
- Lessios, H.A., Kessing, B.D., Robertson, D.R., Paulay, G. 1999. Phylogeography of the pantropical sea urchin *Eucidaris* in relation to land barriers and ocean currents. *Evolution*, 53: 806-817.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analyses of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Mariscal, R.N., 1974. Nematocysts. pp. 129-178. In: Muscatine, L., Lenhoff, H.M. (Eds.), *Coelenterate Biology*. Academic Press, New York, 501 p.
- Marques, A.C., Morandini, A.C., Pinto, M.M. 1997. Cnidome of *Chiropsalmus quadrumanus* (Cnidaria, Cubozoa) from Brazil. *Proceedings VII COLACMAR, Santos*, 1: 136-138.

- Marques, A.C., Migotto, A.E., Morandini, A.C. 2003. Synopsis of knowledge on Cnidaria Medusozoa from Brazil. *Biota Neotropica*, 3(2): 1-35.
- Mayer, A.G. 1910. The Scyphomedusae. pp. 499-735. In: *The medusae of the world*. Carnegie Institution, Washington D.C., 735p.
- Mianzan, H.W., Cornelius, P.F.S. 1999. Cubomedusae y Scyphomedusae. pp. 513-559. In: Boltovskoy, D. (Ed.). *South Atlantic Zooplankton*. Backhuys Publishers, Leiden, vol. 1, 868p.
- Migotto, A.E., Marques, A.C. Morandini, A.C., Silveira, F.L. 2002. Checklist of the Cnidaria Medusozoa of Brazil. *Biota Neotropica*, 2: 1-31.
- Miranda, L.S., Collins, A.G., Marques, A.C. 2010. Molecules clarify a cnidarian life cycle: The hydrozoan *Microhydrula limopsicola* is an early life stage of the staurozoan *Haliclystus antarcticus*. *PLoS ONE*, 5(4): e10182.
- Morandini, A.C., Ascher, D., Stampar, S.N., Ferreira, J.F.V. 2005. Cubozoa e Scyphozoa (Cnidaria: Medusozoa) de águas costeiras do Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, 95: 281-294.
- Müller, F. (1859) Zwei neue Quallen von Santa Catharina (Brasilien). *Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Halle – Originalaufsätze aus dem Gebiete der gesamten Naturwissenschaften*, 5: 1-12 (pls. 1-3).
- Östman, C. 2000. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Scientia Marina*, 64: 31-46.
- Palumbi, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27: 547-572.
- Polzin, T., Daneschmand, S.V. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, 31: 12-20.
- Posada, D., Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference undermixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.

- Rubinoff, D., Holland, B.S. 2005. Between two extremes: Mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Systematic Biology*, 54: 952-961.
- Rubinoff, D., Sperling, F.A.H. 2002. Evolution of ecological traits and wing morphology in *Hemileuca* (Saturniidae) based on two gene phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25:70-86.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4b 10. Sinauer Associates, Sunderland. Available: <http://paup.csit.fsu.edu> [Accessed April 18 2011].
- Varón, A., Sy Vinh, L., Wheeler, W.C. 2009. POY version 4: Phylogenetic analysis using dynamic homologies. *Cladistics*, 26: 72-85.
- Wiens, J.J. 1999. Polymorphism in systematics and comparative biology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 30: 327-362.

Capítulo 3

Considerações finais

Ferramentas moleculares e morfométricas foram utilizadas para avaliar a estrutura populacional filogeográfica da cubomedusa *Chiropsalmus cf. quadrumanus* na costa brasileira. O presente trabalho constitui o primeiro estudo filogeográfico para qualquer espécie de cubozoário.

Como considerações gerais, ressaltamos que:

- As análises moleculares, bem como as morfométricas, apresentaram resultados congruentes e indicaram que há pelo menos duas linhagens definidas ((CE -SP) e (RJ-PR)) da espécie *Chiropsalmus cf. quadrumanus* na costa brasileira. Estudos mais abrangentes que contenham espécimes de outros pontos da costa brasileira, incluída a localidade tipo (Santa Catarina, Müller, 1859), poderão verificar a existência de outras possíveis espécies crípticas e ampliar o conhecimento sobre a distribuição das duas linhagens encontradas neste estudo.
- Há a possibilidade de existir diferenças morfológicas entre as duas linhagens caracterizadas neste estudo, as quais não foram encontradas por nós devido às condições do material utilizado. Igualmente, novas coletas são necessárias, assim como proceder uma revisão aprofundada dos caracteres morfológicos e morfométricos de espécimes frescos ou preferivelmente vivos para evitar a perda de caracteres após fixação e preservação.
- O agrupamento das populações nos dois clados definidos não apresenta estrutura latitudinal, tampouco uma clara barreira que possa explicar esta diferenciação. Destacamos que há uma pretensa área de simpatria das populações entre os estados de Rio de Janeiro e São Paulo. Há uma hipótese, a ser testada, que as linhagens estão relacionadas a diferentes massa d'água,

porém mais dados, em especial sobre a biologia e ecologia do complexo *C. quadrumanus*, são necessários.

- A rede de haplótipos dos três marcadores utilizados indica fluxo gênico entre as populações intra-linhagens. No caso do clado formado pelas populações de Rio de Janeiro e Paraná, o fluxo genético poderia ser explicado pela dispersão via Corrente do Brasil no sentido sul. Por outro lado, a distância geográfica e a influência das correntes oceânicas da região (Corrente Equatorial) tornam pouco provável a comunicação entre as populações de Ceará e São Paulo, embora devam existir muitas “ghost populations”.
- As consequências taxonômicas do presente trabalho são importantes e ainda deverão ser trabalhadas, uma vez que os dados corroboram a existência de três espécies crípticas, uma linhagem correspondente à Carolina do Norte nos Estados Unidos, e as outras duas linhagens brasileiras. O número de espécies que estarão incluídos no complexo *C. quadrumanus* dependerá de estudos multidisciplinares a serem realizados nas populações fantasma ao longo da costa Atlântica do Continente Americano, especialmente no Caribe, a costa norte do Brasil à oeste do Ceará, e a região compreendida entre Ceará e Rio de Janeiro. É necessária também a amostragem no estado de Santa Catarina, com o intuito de descrever um neótipo mais adequado para a linhagem do estado, que pode ser assumida como *Chiropsalmus quadrumanus* ‘senso estrito’.
- Uma vez que *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* é a maior causadora de acidentes com banhistas no Brasil (Haddad Jr. *et al.*, 2002; Haddad Jr., 2003), o melhor conhecimento sobre as linhagens permitirá compreender eventuais diferenças na toxicidade do veneno.

A falta de informação sobre a espécie, em conjunto com atitudes taxonômicas conservadoras e eventos de especiação críptica, não nos permitem delimitar as novas espécies com clareza. De qualquer maneira, nossos resultados revelam que há um complexo de pelo menos três espécies com o nome *Chiropsalmus quadrumanus* no Atlântico Americano.

Referências Bibliográficas

- Boltovskoy, E. 1981. Masas de agua en el Atlántico Sudoccidental. Pp. 227-237. In: Boltovskoy, D. (Ed.), Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, 936p.
- Haddad Jr., V., Silveira, F.L., Cardoso, J.L.C., Morandini, A.C. 2002. A report of 49 cases of cnidarian envenoming from southeastern Brazilian coastal waters. *Toxicon*, 40: 1445-1450.
- Haddad Jr., V. 2003. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 591-597.
- Müller, F. (1859) Zwei neue Quallen von Santa Catharina (Brasilien). *Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Halle – Originalaufsätze aus dem Gebiete der gesamten Naturwissenschaften*, 5: 1–12 (pls. 1–3).

RESUMO

Os Cubozoa vivem em águas tropicais e subtropicais ao redor do mundo. A *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* (Cubozoa: Chiropsalmidae) habita na costa Atlântica americana entre os 35°N e 27°S, uma área com barreiras putativas que poderiam impedir a distribuição contínua de *C.* cf. *quadrumanus*, tornando-se um modelo interessante para estudos de estrutura populacional e filogeografia. O objetivo deste trabalho foi analisar a estrutura haplotípica de quatro populações da *C.* cf. *quadrumanus* da costa brasileira. Nossas análises foram baseadas nos marcadores mitocondriais COI e 16S e a região nuclear ITS de 40 indivíduos provenientes de Ceará (03°43'S 038°29'W); Rio de Janeiro (22°37'S 041°54'W); São Paulo (23°26'S 45°04' W) e Paraná (25°41'S 048°25'W), assim como por estudos morfométricos de 5 indivíduos de cada população. Análises filogenéticas e de redes de haplótipos de cada marcador revelaram uma profunda divergência gênica entre duas linhagens, Ceará - São Paulo e Rio de Janeiro - Paraná, dados estes corroborados por alguns caracteres das análises morfométricas. Nossos resultados sugerem que a espécie *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* é um complexo de espécies resultado da combinação entre taxonomia conservadora e especiação críptica. Estudos mais abrangentes que contenham espécimes de outros pontos da costa brasileira, incluída a localidade tipo (Santa Catarina, Müller, 1859), poderão verificar a existência de outras possíveis espécies crípticas e ampliar o conhecimento sobre a distribuição das duas linhagens encontradas neste estudo. As conseqüências taxonômicas do presente trabalho são importantes e ainda deverão ser trabalhadas. A falta de informação sobre a espécie, em conjunto com atitudes taxonômicas conservadoras e eventos de especiação críptica, não nos permitem delimitar as novas espécies com clareza. De qualquer maneira, nossos resultados revelam que há um complexo de espécies com o nome *Chiropsalmus quadrumanus* no Atlântico Americano. O presente trabalho constitui o primeiro estudo filogeográfico para qualquer espécie de cubozoário.

Palavras chave: Cubozoa, *Chiropsalmus*, COI, 16S, ITS, Filogeografia, especiação críptica.

ABSTRACT

Cubozoans live in tropical and subtropical waters around the world. *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* (Cubozoa: Chiropsalmidae) inhabits the Atlantic coast of America between 35°N and 27°S, an area with putative barriers that could prevent the continuous distribution of *C. cf. quadrumanus*, turning the species an interesting model to study population structure and phylogeography. The aim of this work was to analyze the haplotype structure of four populations of *C. cf. quadrumanus* from the Brazilian coast. We carried out our analyses based on the COI and 16S mitochondrial markers and the nuclear ITS region of 40 individuals from Ceará (03°43'S 038°29'W); Rio de Janeiro (22°37'S 041°54'W); São Paulo (23°26'S 45°04' W) and Paraná (25°41'S 048°25'W), as well by morphometric surveys of 5 individuals from each population. Phylogenetic and haplotype network analyses of each marker revealed a deep genetic divergence between two lineages, Ceará - São Paulo and Rio de Janeiro - Paraná, this data were corroborated by some characters of the morphometrical analyses. Our results suggest that the species *Chiropsalmus* cf. *quadrumanus* is a complex of species resulting of the mixture of over-conservative taxonomy and cryptic speciation. More inclusive studies containing specimens from other points of the Brazilian coast, including the type locality (Santa Catarina, Müller, 1859), could verify the existence of other possible cryptic species and increase the knowledge about the distribution of the two lineages found in this study. The taxonomic consequences of this survey are important and should be overwrought. Lack of information about the species, conservative taxonomic attitudes and cryptic speciation events prevent us to delimit new species clearly. However, our results revealed a species complex named *Chiropsalmus quadrumanus* in the Atlantic coast of America. The present work represents the first phylogeographic approach of any cubozoan species.

Key words: Cubozoa, *Chiropsalmus*, COI, 16S, ITS, phylogeography, cryptic speciation.