

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva  
Instituto de Biologia

**Celso Domingos de Souza Filho**

Taxonomia integrativa de esponjas do gênero *Plakina* (Homoscleromorpha:  
Plakinidae) em Cabo Frio (RJ)

Rio de Janeiro

2016

Taxonomia integrativa de esponjas do gênero *Plakina* (Homoscleromorpha:  
Plakinidae) em Cabo Frio (RJ)

Celso Domingos de Souza Filho

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas  
(Biodiversidade e Biologia Evolutiva), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte  
dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas  
(Biodiversidade e Biologia Evolutiva).

Orientadora: Carla Zilberberg  
Co-orientador: Guilherme Muricy

Rio de Janeiro  
2016

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Carla Zilberberg, pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Cnidaria, por todo o suporte durante esses últimos anos de trabalho e também pela paciência e compreensão nesses últimos meses de trabalho.

Ao meu coorientador, Guilherme Muricy, por todos esses anos me apoiando no trabalho, pelas oportunidades e portas que me abriu.

A minha namorada, Luciana Figueira, por todo amor e carinho nesses anos juntos.

Ao pessoal do laboratório de Cnidaria (Amana, Lívia, Isabela, Vítor) por me ensinarem e tirarem minhas dúvidas nos trabalhos de bancada.

Ao pessoal do laboratório de biologia de Porifera (Fernanda, André, Básłavi, Pedro) por me ajudarem em diversos momentos.

Ao pessoal do laboratório de Porifera (Mirelly, Carolline, Daniele, Ticiano, Mariana) por todo o apoio e pelas longas conversas na hora do café.

Ao pessoal do laboratório de taxonomia de Porifera (Júlio, Cristiana, Sula, Camille, Livia) pelo apoio nesses últimos meses.

À Anaira Lage, por todo o suporte quem tem me dado nos últimos meses.

À Michelle Klautau, por estar sempre disposta a tirar minhas dúvidas.

Ao Emilio Lanna, pela ajuda com a citologia, na preparação do material e nas imagens.

À Leila Pessoa, por todo o apoio e carinho nessa reta final.

## CIP - Catalogação na Publicação

D671t Domingos de Souza Filho, Celso  
Taxonomia integrativa de esponjas do gênero  
Plakina (Homoscleromorpha: Plakinidae) em Cabo  
Frio (RJ) / Celso Domingos de Souza Filho. --  
Rio de Janeiro, 2016.  
67 f.

Orientadora: Carla Zilberberg.  
Coorientador: Guilherme Muricy.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia,  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e  
Biologia Evolutiva, 2016.

1. Cox1. 2. CitB. 3. Citologia. 4. Comunidade  
de bactérias. 5. Porifera. I. Zilberberg, Carla,  
orient. II. Muricy, Guilherme, coorient. III.  
Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## RESUMO

A taxonomia do gênero *Plakina* é baseada principalmente na presença/ausência, forma e tipo de ramificação dos caltropos lofosos (espículas pequenas com quatro actinas e com ramificações em uma, duas, três ou nas quatro actinas), no conjunto espicular e na organização do esqueleto. Apesar do conjunto de espículas ser uma característica confiável na taxonomia do gênero, algumas espécies podem apresentar grande variabilidade morfológica e anatômica e estas podem causar dúvidas sobre a identidade de algumas esponjas. Por esse motivo, utilizamos outros caracteres além daqueles utilizados na taxonomia tradicional para aumentar a robustez na descrição de novas espécies de *Plakina*. Os espécimes estudados neste trabalho foram coletados na poça de maré do Carolina, na região de Cabo Frio no Rio de Janeiro. Para a delimitação das novas espécies de *Pakina* foram utilizados caracteres morfológicos, citológicos, da comunidade de bactérias e DNA mitocondrial (Cox1 e CitB), que têm obtido bons resultados em outros grupos de esponjas. Inicialmente, os espécimes estudados foram organizados em quatro morfotipos baseados principalmente na sua cor (azul, rosa, creme e laranja) e textura (lisa e verrucosa). Os resultados encontrados mostram que os quatro morfotipos pertencem na verdade a duas espécies novas. Além de utilizar métodos práticos e rápidos, os caracteres da taxonomia tradicional possibilitaram a identificação de duas novas espécies de *Plakina* com sucesso e os caracteres que foram mais informativos para a delimitação dessas espécies foram o conjunto espicular, a comunidade de bactérias e as análises moleculares. Porém, outros caracteres como o tipo de superfície, presença ou ausência de cavidades no esqueleto, quantidade e tipos de inclusões nas células e presença de células vacuolares e cinza também foram informativos e úteis para diferenciar as espécies novas das já conhecidas.

Palavras-chave: Cox1, CitB, Citologia, comunidade de bactérias, Porifera.

## ABSTRACT

The taxonomy of the genus *Plakina* is based mostly on the presence/absence, shape and type of ramification of the lophose calthrops (small spicules with four actines and with ramification on one, two, three or on the four actines), in the spicular set and in the organization of the skeleton. Although the set of spicules is a reliable characteristic in the taxonomy of the genus, some species may present great morphological and anatomical variability, which may lead to doubts about the identity of some sponges. For this reason, we used other characters beyond those traditionally used in the traditional taxonomy to increase the strength in the description of new species of *Plakina*. The specimens studied in this work were collected at Carolina tide pool at Cabo Frio region in Rio de Janeiro. For the delimitation of new species of *Plakina* were used morphological, cytological, bacterial community and mitochondrial DNA (Cox1 e CitB) characters, which have obtained good results in other groups of sponges. Initially, the specimens studied were organized into four morphotypes based mostly on their color (blue, pink, cream and orange) and texture (smooth and verrucose). Results show that the four morphotypes are actually two new species. In addition to use practical and fast methods, the use of traditional taxonomic characters were able to distinguish the two new species of *Plakina* with success and the characters that were more informative for the delimitation of these new species were the spicular set, bacterial community and molecules analyses. However, other characters, such as surface type, presence or absence of cavity in the skeleton, quantity and types of cell inclusions and presence of vacuolar and gray cells were also informative and useful to differentiate the new species from the ones already known.

Key-words: Cox1, CitB, Cytology, bacterial community, Porifera.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	iii
<b>RESUMO</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviações	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	11
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	12
3.1. Local de coleta	12
3.2. Coleta e triagem das amostras	12
3.3. Morfologia Externa	12
3.4. Anatomia	14
3.5. Espículas	15
3.6. Citologia/comunidade de bactérias	16
3.7. Análises moleculares	16
<b>4. RESULTADO</b>	21
4.1. Análise dos caracteres	21
4.1.1. Morfologia externa	21
4.1.2. Anatomia interna e organização geral	22
4.1.3. Espículas	22
4.1.4. Citologia	23
4.1.5. Comunidade de bactérias	31
4.1.6. Análise molecular	33
4.2. Comentários sobre os quatro morfotipos	41
4.3 Sistemática	45
4.3.1 <i>Plakina</i> sp. nov. 1	45
4.3.2 <i>Plakina</i> sp. nov. 2	48
<b>5. DISCUSSÃO</b>	52
5.1. Morfologia externa	52
5.2. Anatomia e organização geral	52
5.3. Espículas	53
5.4. Citologia	53

5.5. Comunidade de bactérias	54
5.6. Análises moleculares	55
5.7. Congruência dos métodos	56
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>

Lista de figuras	Pág.
<p>Figura 1. Representantes das classes de esponjas. A – <i>Aplysina archeri</i>, representante da classe Demospongiae. B – <i>Clathrina coriacea</i>, representante da classe Calcarea. C – <i>Euplactella aspera</i>, representante da classe Hexactinellida. Imagens em creative commons no site commons.wikimedia.org.</p>	3
<p>Figura 2. Características da classe Homoscleromorpha. A, Larvas cinctoblástulas em corte transversal. B, Membrana basal em microscopia eletrônica de transmissão. C, espículas dos tipos diodos, triodos, caltropos, caltropos monolofosos e caltropos heterolofosos (candelabra) respectivamente.</p>	6
<p>Figura 3. Variação nas ramificações dos lofocaltropos. A – Caltropo monolofoso de <i>P. monolopha</i>. B – Caltropo monolofoso de <i>P. crypta</i>.</p>	7
<p>Figura 4. Local de coleta. A – Mapa do Brasil com o Rio de Janeiro. B – Mapa da região dos lagos com a cidade de Cabo Frio. C – Foto da saída do Canal de Itajuru com a Poça do Carolina. D – Foto da Poça do Carolina com medições na maré baixa. E - Poça do Carolina na maré baixa. F – Poça do Carolina na subida da maré.</p>	13
<p>Figura 5. Morfologia externa de <i>Plakina</i> sp. nov. 1 (morfotipo azul). A – MNRJ 16490, espécime azul. A seta mostra a borda elevada do espécime. B – MNRJ 17331, espécime com variação de azul para rosa. A seta mostra um ponto rosa no espécime. C – MNRJ 16491, espécimes com variação de azul para rosa. A seta aponta para o espécime coletado.</p>	21
<p>Figura 6. Morfologia externa de <i>Plakina</i> sp. nov. 1 (morfotipo rosa). A - MNRJ 16873. B - MNRJ 16879. C - MNRJ 16489. As setas apontam para os pontos cor de rosa.</p>	22
<p>Figura 7. Morfologia externa de <i>Plakina</i> sp. nov. 2 (morfotipo creme). A - MNRJ 16880. B - MNRJ 17330. A seta aponta para o espécime coletado crescendo sobre</p>	23

outra espécie de esponja. C - MNRJ 16492. A seta aponta para a dobra elevada do espécime.

Figura 8. Morfologia externa de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo laranja). A - MNRJ 17335. B - MNRJ 17547. C - MNRJ 17580. 24

Figura 9. Anatomia do esqueleto dos quatro morfotipos. A – de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo azul) em corte tangencial. B – Morfotipo azul em corte transversal. C – Morfotipo rosado em corte tangencial. D – Morfotipo rosado em corte transversal. E – Morfotipo creme em corte tangencial. F – Morfotipo creme em corte transversal. G – Morfotipo laranja em corte tangencial. H – Morfotipo laranja em corte transversal. cb – cavidade basal. 25

Figura 10. Espículas de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo azul). A – Diodos. B – Triodos. C – Caltropos. D – Caltropos monolofosos. E – Caltropos dilofosos. F – Caltropo trilofoso. G – Espículas mal formadas. As setas apontam para os espinhos nas espículas não lofosas. 26

Figura 11. Espículas de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo rosa). A – Diodos; B – Triodos. C – Caltropos. D – Caltropos monolofosos. E – Caltropos dilofosos. F – Caltropos trilofosos. G – Espículas mal formadas. As setas apontam para os espinhos nas espículas não lofosas. 27

Figura 12. Espículas de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo creme). A – Diodos. B – Triodos. C – Caltropos. D – Caltropos monolofosos. 28

Figura 13. Espículas de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo laranja). A – Diodos. B – Triodos. C – Caltropos. D – Caltropos monolofosos. 28

Figura 14. Citologia de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo azul). A – Região apopilar. B – Célula apopilar. C e D – Arqueócito. E e F – Esclerócito. ca – célula apopilar. cc – colar dos coanócitos. n – núcleo. i – inclusões. cg – complexo de golgi. ps – pseudopodes. fe – fantasma de espícula. b1 – bactéria tipo 1. b2 – bactéria tipo 2. 29

b3 – bactérias tipo 3. b4 – bactérias tipo 4.

Figura 15. Citologia de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo azul). A – Pinacócito. B – Pinacócito tipo T. C – Coanócito. D – Colar dos coanócitos. f – flagelo. n – núcleo. i – inclusão. b1 – bactéria tipo 1. 30

Figura 16. Comunidade de bactéria de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo azul). A – Tipo 1. B – Tipo 2. C – Tipo 3. D – Tipo 4 e 5. b1 – bactéria tipo 1. b2 – bactéria tipo 2. b3 – bactéria tipo 3. b4 – bactéria tipo 4. b5 – bactéria tipo 5. 30

Figura 17. Citologia de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo rosa). A – Região apopilar. B – Célula apopilar. C e D – Arqueócito. E e F – Esclerócito. ca – célula apopilar. n – núcleo. i – inclusão. b1 – bactéria tipo 1. cg – complexo de golgi. mt – mitocôndria. fe – fantasma de espícula. 31

Figura 18. Citologia de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo rosa). A e B – Pinacócitos. C e D – Coanócito. E - Colar dos coanócitos. F – Prosopila. n – núcleo. i – inclusão. f – flagelo. 32

Figura 19. Comunidade de bactéria de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo rosa). A – Tipo 1. B – Tipos 2 e 3. C – Tipos 4 e 5. D – Tipos 4 e 2. b1 – bactéria tipo 1. b2 – bactéria tipo 2. b3 – bactéria tipo 3. b4 – bactéria tipo 4. b5 – bactéria tipo 5. 33

Figura 20. Citologia de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo creme). A – Região apopilar. B – Célula apopilar. C e D – Arqueócito. E e F – Pinacócito. G e H – Coanócitos. n – núcleo. i – inclusão. ca – célula apopilar. i – inclusão. v – vacúolo. b1 – bactéria tipo 1. fe – fantasma de espícula. 34

Figura 21. Citologia e comunidade de bactéria de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo creme). A e B – Células vacuolares. C e D – único tipo de bactéria encontrado. v – vacúolo. i – inclusão. b1 – bactéria tipo 1. 35

- Figura 22. Citologia de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo laranja). A – Região apopilar. 36  
 B – Célula apopilar. C e D – Arqueócito. E e F – Pinacócito. G - colar dos  
 coanócitos. H – Coanócito. N – núcleo. I – inclusão. cg – complexo de golgi. cb –  
 camada basal. b1 – bactéria tipo 1. ce – capa da espícula. f – flagelo.
- Figura 23. Citologia e comunidade de bactéria de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo 37  
 laranja). A e B - colar dos coanócitos. C e D – Células cinza. E e F - único tipo de  
 bactéria encontrado. mt – mitocondria. n – núcleo. v – vacúolo. b1 – bactéria tipo 1.
- Figura 24. Capa que envolve as espículas. A e B – Capa em microscopia eletrônica 38  
 de transmissão. C e D – Capa em microscopia ótica. ce – capa de espícula. fe –  
 fantasma de espícula. ecc – espícula com capa. esc – espícula sem capa.
- Figura 25. Teste de saturação de bases da Cox1 e da CitB. 38
- Figura 26, Análise filogenética de Plakinidae usando a Cox1, com os valores de 39  
 suporte da máxima verossimilhança e da inferência bayesiana em porcentagem. A  
 topologia apresentada é referente ao resultado da máxima verossimilhança com os  
 valores de suporte da inferência Bayesiana.
- Figura 27. Análises filogenéticas de Plakinidae usando a CitB, com os valores de 40  
 suporte da máxima verossimilhança e da inferência Bayesiana em porcentagem. A  
 topologia apresentada é referente ao resultado da máxima verossimilhança com os  
 valores da inferência Bayesiana.

Lista de tabelas	Pág.
Tabela 1. Todas as espécies do gênero <i>Plakina</i> com a sua distribuição.	5
Tabela 2. Exemplares, sua data de coleta, número de tombo, sua coloração e em quais análises foram eles foram utilizados.	14
Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificar via PCR as regiões da Cox1 e CitB de <i>Plakina</i> .	18
Tabela 4. Espécimes estudados nas análises filogenéticas e seus respectivos números de acesso do GenBank, números de tombo da coleção de Porifera do Museu Nacional e referências.	19-20
Tabela 5. Variações da morfologia e da organização geral por espécies e por morfotipos.	42
Tabela 6. Variação das espículas por espécies e por morfotipos.	43
Tabela 7. Variação dos caracteres citologicos por espécies e por morfotipos.	44

## Lista de abreviações

B1		Bactéria tipo 1
B2		Bactéria tipo 2
B3		Bactéria tipo 3
B4		Bactéria tipo 4
B5		Bactéria tipo 5
ca		Célula apopilar
CHAOS	Solução de lise (Guanidine thiocyanate 4M; Nlauroyl sarcosine 0,5%; Tris pH 8.0 25 $\mu$ M; 2-mercaptoetanol (0.7 mL/100mL 0,1M)	
cvb		Cavidade basal
cmb		Camada basal
cc		Colar dos coanócitos
ce		Capa de espícula
cg		Complexo de goldi
CitB		Citocromo oxidase B
Cox1		Citocromo oxidase 1
esc		Espícula sem capa
f		Flagelo
fe		Fantasma de espícula
i		Inclusões
MNRJ		Coleção de Porifera do Museu Nacional

mt	Mitocôndria
n	Núcleo
ps	Pseudópode
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFRJPOR	Coleção de Porifera da Universidade Federal do Rio de Janeiro
v	Vacúolo

## 1. INTRODUÇÃO

As esponjas são metazoários sésseis com um sistema aquífero diferenciado com poros externos, que por uma simples camada de células flageladas bombeia água de forma unidirecional pelo corpo, elas também possuem uma grande população de células capazes de se diferenciarem em outros tipos de células e com uma alta plasticidade na forma de crescimento e com espículas de sílica e de carbonato de cálcio presente em várias espécies (Hooper & van Soest, 2002).

As esponjas, denominação comum para os membros do filo Porifera Grant, 1836, são consideradas os animais multicelulares mais primitivos. Esses animais são sésseis como adultos e planctônicas como larvas e habitam principalmente águas costeiras e são encontrados em todos os ambientes marinhos, das regiões polares aos trópicos e da região entre marés até as grandes profundidades e em ambientes dulcícolas. Se alimentam de matéria orgânica em suspensão na água e filtrada através de seu sistema aquífero. Seu esqueleto pode ser composto por espículas de carbonato de cálcio ou sílica, fibras de espongina, por uma combinação de espículas silicosas e fibras, ou esses componentes podem estar ausentes (Hooper & van Soest, 2002). Esses organismos possuem um papel fundamental nas comunidades bentônicas marinhas, participando de diversas interações com outros organismos como competição por espaço, predação, comensalismo, mutualismo, parasitismo e funcionando como substrato para diversos organismos (Diaz & Rutzler, 2001; Ribeiro *et al.*, 2003; Wulff, 2001, 2006).

As esponjas são estruturalmente simples e em função disso, a sua taxonomia é baseada principalmente em caracteres do esqueleto como tipos de espículas, presença ou ausência de fibras de espongina e a organização desses dois componentes no esqueleto (Hooper & van Soest, 2002). Outros caracteres que também são úteis na sua taxonomia são coloração externa e interna, consistência, aspecto da superfície e tamanho do animal (Boury-Esnault & Rutzler, 1997), porém essas características podem apresentar uma grande variação dentro de uma mesma espécie e entre espécies próximas (Vethaak *et al.*, 1982). Por outro lado, esponjas que não apresentam esqueleto ou apresentam pouca variação do esqueleto tem sido um grande desafio para os taxonomistas (eg. *Oscarella*, *Chondrosia*, *Callyspongia*) (Boury-Esnault *et al.*, 2013; Lazoski *et al.*, 2001; Lopes-Legentil *et al.*, 2010). Essa ausência de esqueleto levou à busca de novos caracteres para a identificação das espécies, e dentre esses, a citologia e a

comunidade de bactérias se mostraram boas ferramentas para delimitação de espécies em alguns grupos (eg. *Oscarella*, *Polymastia*), já que cada espécie possui tipos celulares e bactérias associadas características (Solé-Cava *et al.*, 1992; Muricy *et al.*, 1996a; Boury-Esnault *et al.* 1994). Nos últimos anos, os taxonomistas também têm adotado métodos moleculares como fontes adicionais para a delimitação de espécies. Como por exemplo, o *barcoding* de DNA, que utiliza fragmentos de genes mitocondriais como fonte de informação para auxiliar na identificação de espécies (Erpenbeck *et al.*, 2005). Porém, não existe um consenso sobre quais marcadores universais deveriam ser utilizados (Erpenbeck *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2012).

Atualmente são aceitas quatro classes dentro do filo Porifera (van Soest *et al.*, 2016; Gazave *et al.*, 2010), diferenciadas, principalmente, pela composição e forma das espículas. A classe Demospongia (Fig. 1A) é a maior das quatro classes, sendo caracterizada pela presença de espículas silicosas não hexactinais, podendo ou não estar presentes fibras de espongina. Entretanto, ambas, espículas e fibras, podem estar ausentes em alguns grupos. A classe Calcarea (Fig. 1B) apresenta esponjas com esqueleto composto exclusivamente de carbonato de cálcio e espículas diactinas, triactinas, tetractinas ou poliactinas. A classe Hexactinellida (Fig. 1C) é caracterizada pela organização corporal sincicial e pela presença de espículas silicosas com seis actinas (Hooper & van Soest, 2002).

A classe Homoscleromorpha é caracterizada pela presença de uma larva cinctoblastula (Fig 2A), membrana basal (Fig 2B) feita de colágeno tipo IV, espermatozóides com acrossoma e câmaras de coanócitos esféricas ou ovais, organizadas em um sistema aquífero silêbide ou leuconóide (Gazave *et al.*, 2012; Muricy & Diaz, 2002). Originalmente a classe foi criada como uma subordem da ordem Carnosa, dentro da classe Demospongiae (Topsent, 1895), e foi posteriormente elevada ao ranking de subclasse Homoscleromorpha, com apenas uma ordem, Homosclerophorida (Lévi, 1973). Recentemente, com base em caracteres moleculares, o grupo passou a ser considerado como uma quarta Classe do filo Porifera (Gazave *et al.*, 2010; 2012). Atualmente a classe possui uma ordem (Homosclerophorida) com duas famílias. A família Oscarellidae apresenta somente um gênero (*Oscarella* Vosmaer, 1884), que não apresenta espículas e sua taxonomia é baseada em caracteres moleculares, citológicos e químicos (Gazave *et al.*, 2013). A família Plakinidae, apresenta seis gêneros (*Plakortis* Schulze, 1880, *Plakinastrella* Schulze, 1880, *Placinolopha* Topsent, 1897, *Plakina*

Schulze, 1880, *Corticium* Schmidt, 1862 e *Tetralophophora* Rützler *et al.*, 2014) e sua taxonomia é baseada principalmente no conjunto espicular (Fig 2C) (Muricy & Diaz, 2002; Rützler *et al.*, 2014).

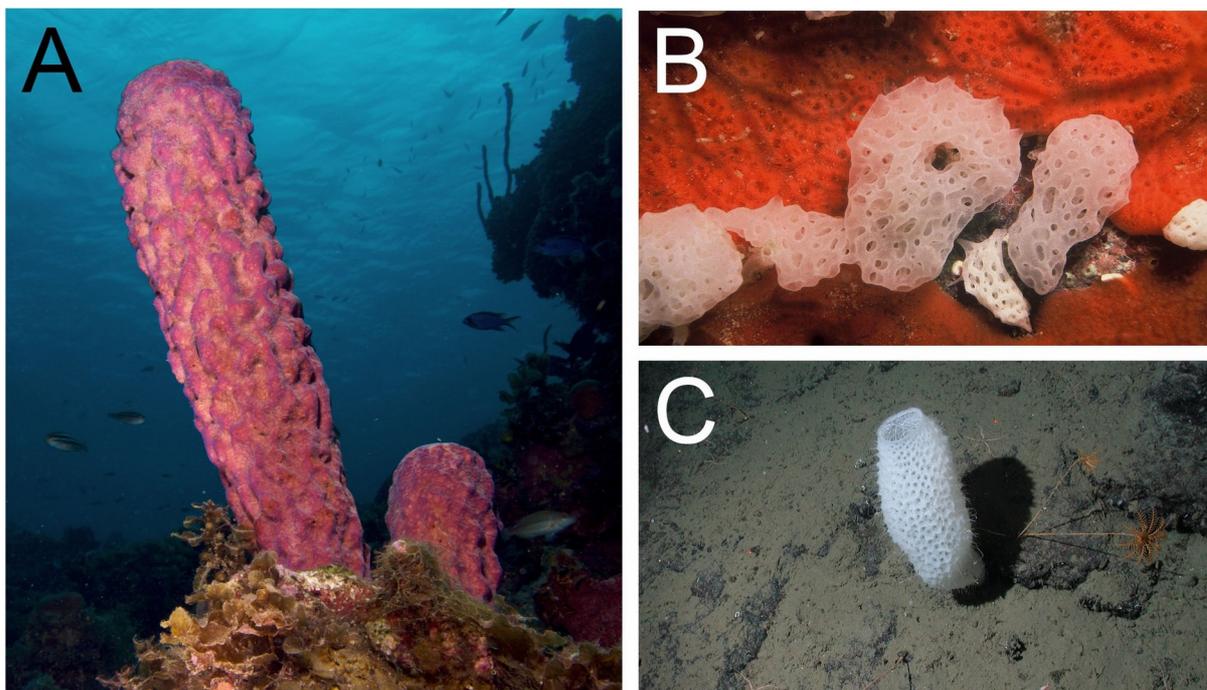


Figura 1. Representantes das classes de esponjas. A – *Aplysina archeri*, representante da classe Demospongiae. B – *Clathrina coriacea*, representante da classe Calcarea. C – *Euplactella aspera*, representante da classe Hexactinellida. Imagens em creative commons no site commons.wikimedia.org.

Com 29 espécies descritas, o gênero *Plakina* é o maior gênero da classe Homoscleromorpha (van Soest *et al.*, 2016), sua distribuição é cosmopolita e seus espécimes são encontrados principalmente em ambientes ciófilos, fixados a substratos duros dentro de cavernas ou sob pedras. O gênero é definido pela presença de caltropos com ramificações (lofocaltropos) em uma (caltropo monolofoso), duas (caltropo dilofoso), três (caltropo trilofoso) e/ou quatro de suas actinas (caltropo tetralofoso) e também podem estar presentes espículas dos tipos diodos, triodos e caltropos simples em uma única classe de tamanho. As esponjas do gênero *Plakina* geralmente são finas e incrustantes, com um esqueleto bem desenvolvido e com espículas sempre formando uma reticulação bem evidente, tanto em corte transversal quanto em corte tangencial. Comumente, cavidades do sistema aquífero são encontradas no esqueleto no ectossoma, abaixo do ectossoma e na parte basal da esponja,

junto ao substrato (Muricy & Diaz, 2002).

Atualmente, o Mediterrâneo é o local com o maior número de registros de espécies de *Plakina*, com 10 espécies conhecidas (*Plakina trilopha* Schulze, 1880, *Plakina monolopha* Schulze, 1880, *Plakina crypta* Muricy *et al.*, 1998, *Plakina bowerbanki* (Sarà, 1960), *Plakina dilopha* Schulze, 1880, *Plakina endoumensis* Muricy *et al.*, 1998, *Plakina jani* Muricy *et al.*, 1998, *Plakina reducta* (Pulitzer-Finali, 1983), *Plakina topsenti* (Pouliquen, 1972) e *Plakina weinbergi* Muricy *et al.*, 1998) (Pansini *et al.*, 2011; van Soest *et al.*, 2016), seguido pelo Caribe com seis espécies (*Plakina elisa* (de Laubenfels, 1936), *Plakina jamaicensis* Lehnert & van Soest, 1998, *Plakina monolopha*, *Plakina tetralopha* (Hechtel, 1965), *Plakina trilopha* e *Plakina versatilis* (Schmidt, 1880) (Domingos *et al.*, 2015; van Soest *et al.*, 2016). As outras espécies do gênero estão dispersas pelos oceanos Pacífico (*Plakina atka* Lehnert *et al.*, 2005, *Plakina tanaga* Lehnert *et al.*, 2005, *Plakina muricyae* Cruz-Barraza *et al.*, 2014, *Plakina paradilopha* Cruz-Barraza *et al.*, 2014, *Plakina bioxea* Green & Bakus, 1994, *Plakina fragilis* Desqueyroux-Faúndez & van Soest, 1997, *Plakina microlobada* Desqueyroux-Faúndez & van Soest, 1997, *Plakina pacifica* Desqueyroux-Faúndez & van Soest, 1997 e *Plakina tetralophoides* Muricy *et al.*, 1998), Índico (*Plakina kanaky* Ruiz *et al.*, 2015, *Plakina australis* (Gray, 1867), *Plakina corticioides* Vacelet *et al.*, 1976 e *Plakina corticolopha* Lévi & Lévi, 1983) e Atlântico (*Plakina brachylopha* Topsent, 1927 e *Plakina coerulea* Cedro *et al.*, 2013) (Tab. 1; van Soest *et al.*, 2016).

No Brasil, o gênero *Plakina* é representado apenas por duas espécies, *P. coerulea*, registrada para um recife urbano no município de Maceió, Alagoas (Cedro *et al.*, 2013) e *P. trilopha*, registrada para a plataforma continental de Pernambuco (Boury-Esnault, 1973). Entretanto, o número de espécies do gênero no Brasil provavelmente é bem maior, visto que, existem registros do gênero em Fernando de Noronha (PE), Cadeia Vitória-Trindade (ES) (Muricy *et al.*, 2011) e Cabo Frio (RJ) (Belmonte *et al.*, 2015).

A maioria das espécies do gênero *Plakina* possuem distribuição restrita (van Soest *et al.*, 2016). Somente duas espécies apresentam distribuição ampla: *P. monolopha* e *P. trilopha* (Domingos *et al.*, 2015). Essas, foram originalmente descritas para a região do Mediterrâneo por Schulze, 1880 e, posteriormente, registradas para várias localidades no mundo (Tab. 1) por diversos pesquisadores, porém, com descrições muito curtas ou muitas vezes sem descrições (eg. Boury-Esnault, 1973; Miloslavich *et al.*, 2010). Por esses motivos existem

Tabela 1. Todas as espécies do gênero *Plakina* com a sua distribuição.

Espécie	Distribuição	Referência
<i>Plakina atka</i>	Pacífico: EUA	Lehnert <i>et al.</i> , 2005
<i>Plakina australis</i>	Índico: Austrália	Gray, 1867
<i>Plakina bioxea</i>	Pacífico: EUA	Green & Bakus, 1994
<i>Plakina bowerbanki</i>	Atlântico: Mediterrâneo: Itália, Grécia	Sarà, 1960; Pulitzer-Finali, 1983
<i>Plakina brachylopha</i>	Atlântico: Portugal	Topsent, 1927
<i>Plakina coerulea</i>	Atlântico: Brasil	Cedro <i>et al.</i> , 2013
<i>Plakina corticioides</i>	Índico: Madagascar	Vacelet <i>et al.</i> , 1976
<i>Plakina corticolopha</i>	Índico: Nova Caledônia	Lévi & Lévi, 1983
<i>Plakina crypta</i>	Atlântico: Mediterrâneo: França	Muricy <i>et al.</i> , 1998
<i>Plakina dilopha</i>	Atlântico: Mediterrâneo: França, Grécia	Schulze, 1880
<i>Plakina elisa</i>	Atlântico: Caribe: Panamá	de Laubenfels, 1936
<i>Plakina endoumensis</i>	Atlântico: Mediterrâneo: França	Muricy <i>et al.</i> , 1998
<i>Plakina fragilis</i>	Pacífico: Equador	Desqueyroux-Faúndez & van Soest, 1997
<i>Plakina jamaicensis</i>	Atlântico: Caribe: Belize, Jamaica	Lehnert & van Soest, 1998; Rützler <i>et al.</i> , 2000
<i>Plakina jani</i>	Atlântico: Mediterrâneo: França	Muricy <i>et al.</i> , 1998
<i>Plakina kanaky</i>	Índico: Nova Caledônia	Ruiz <i>et al.</i> , 2015
<i>Plakina microlobata</i>	Pacífico: Equador	Desqueyroux-Faúndez & van Soest, 1997
<i>Plakina monolopha</i>	Antártico, Atlântico, Índico, Pacífico.	van Soest <i>et al.</i> , 2016
<i>Plakina muricyae</i>	Pacífico: México	Cruz-Barraza <i>et al.</i> , 2014
<i>Plakina pacifica</i>	Pacífico: México	Desqueyroux-Faúndez & van Soest, 1997
<i>Plakina paradilopha</i>	Pacífico: México	Cruz-Barraza <i>et al.</i> , 2014
<i>Plakina reducta</i>	Atlântico: Mediterrâneo: Itália, Líbano	Pulitzer-Finali, 1983
<i>Plakina tanaga</i>	Índico: Nova Caledônia	Lehnert <i>et al.</i> , 2005
<i>Plakina tetralopha</i>	Atlântico: Caribe: Jamaica	Hechtel, 1965
<i>Plakina tetralophoides</i>	Pacífico: Japão	Muricy <i>et al.</i> , 1998
<i>Plakina topsenti</i>	Atlântico: Mediterrâneo: França, Itália	Pouliquen, 1972; van Soest, 2001
<i>Plakina trilopha</i>	Antártico, Atlântico, Índico, Pacífico.	van Soest <i>et al.</i> , 2016
<i>Plakina versatilis</i>	Atlântico: Caribe: São Vicente e Granadinas	Schmidt, 1880
<i>Plakina weinbergi</i>	Atlântico: Mediterrâneo: Chipre, Grécia	Gerovasileiou <i>et al.</i> , 2015; Muricy <i>et al.</i> , 1998

dúvidas sobre a validade desses registros e muito provavelmente esses espécimes são espécies ainda desconhecidas de *Plakina* (Muricy *et al.*, 1998; van Soest *et al.*, 2016).

A taxonomia do gênero é baseada principalmente no conjunto espicular, em especial na morfologia dos lofocaltropos. As actinas dessas espículas podem apresentar duas ou mais ramificações, podendo estas se ramificar novamente de duas a quatro vezes a apresentam pontas lisas ou com espinhos. Essas ramificações podem ser na base, na parte medial ou na parte apical da actina (Muricy *et al.*, 1998; Muricy & Diaz, 2002). Além disso, algumas espécies podem apresentar somente um tipo de lofocaltropos (eg. *P. monolopha*, *P. coerulea*) (Muricy *et al.*, 1998; Cedro *et al.*, 2013) ou todos os quatro tipos (eg. *P. trilopha*, *P. endoumensis*) (Muricy *et al.*, 1998), além de que o mesmo tipo de lofocaltropo pode apresentar diferentes ramificações, podendo ser bastante simples (eg. *P. monolopha*; Fig 3A) (Muricy *et al.*, 1998) ou extremamente elaborada (eg. *P. crypta*; Fig 3B) (Muricy *et al.*, 1998).

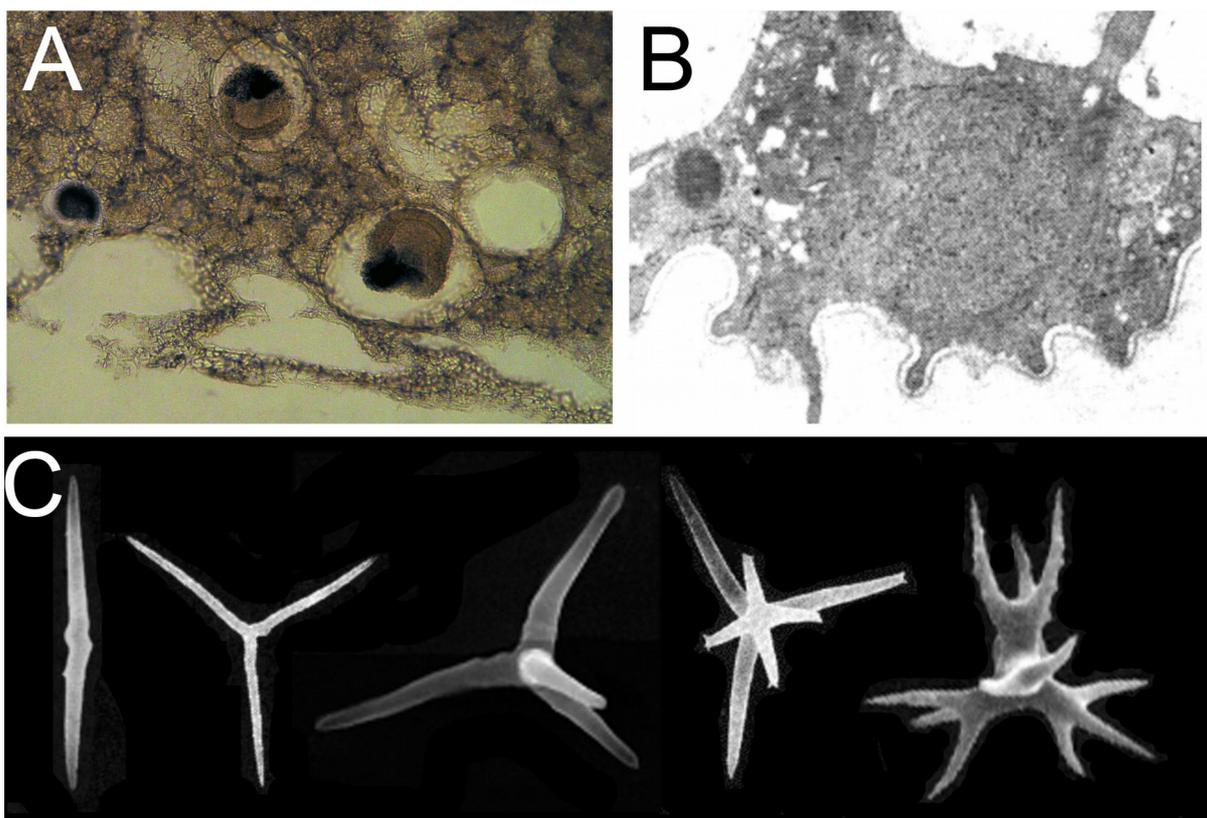


Figura 2. Características da classe Homoscleromorpha. A, Larvas cinctoblástulas em corte transversal. B, Membrana basal em microscopia eletrônica de transmissão. C, espículas dos tipos diodos, triodos, caltropos, caltropos monolofosos e caltropos heterolofosos (candelabra) respectivamente.

Os caracteres morfológicos externos também são muito importantes para a taxonomia tradicional do gênero, pois muitas espécies podem ser facilmente reconhecidas pela sua morfologia externa (eg. *P. crypta*), coloração característica (eg. *P. coerulea*) ou pelo conjunto desses caracteres (Muricy *et al.*, 1998; Cedro *et al.*, 2013). Entretanto, várias espécies possuem as descrições originais simples e incompletas como *P. reducta* (Pulitzer-Finali, 1983), *P. elisa* (de Laubenfels, 1936), *P. corticioides* Vacelet *et al.*, 1976, *P. versatile* (Schmidt, 1880) e *P. topsenti* (Pouliquen, 1972). Todas essas espécies foram descritas antes de 1997 e muito dos problemas taxonômicos do gênero *Plakina* antes dessa época eram devidos a falta de padronização das descrições e unidade dos pesquisadores e de suas publicações. Nomes como *oxea*, *oxeote*, *triaxon*, *tetragon*, *microcalthropes*, *acanthomicrocalthropes* e *micromesoorthotrichotriaenes* eram utilizados para a descrição das espículas, e muitas vezes essas publicações não apresentavam imagens das espículas (eg. de Laubenfels, 1936; Pouliquen, 1972).

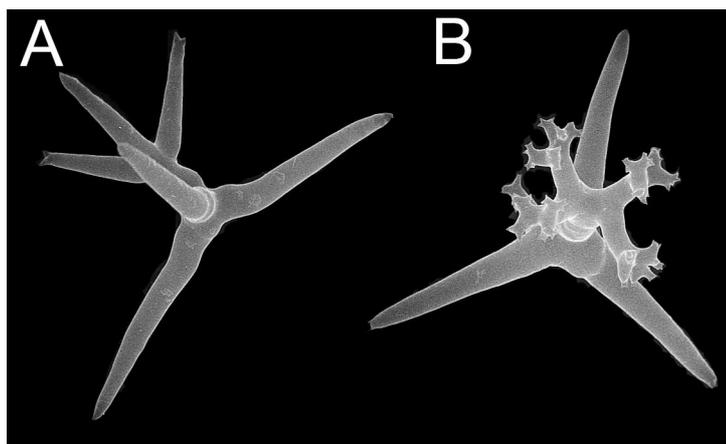


Figura 3. Variação nas ramificações dos lofocaltropos. A – Caltropo monolofoso de *P. monolopha*. B – Caltropo monolofoso de *P. crypta*.

Esses problemas de nomenclatura das espículas foram resolvidos com a publicação do *Thesaurus of Sponge Morphology* (Boury-Esnault & Rutzler, 1997), da revisão taxonômica do gênero no Mediterrâneo (Muricy *et al.*, 1998) e da publicação do *Systema Porifera* (Muricy & Diaz, 2002), onde foram descritos e padronizados os nomes das espículas encontradas no gênero *Plakina*.

Grande parte das espécies conhecidas de *Plakina* foram descritas através da taxonomia tradicional, com descrições da morfologia externa, anatomia e espículas. Apesar da atual

estabilidade desses caracteres, a definição de espécies com base apenas em caracteres morfológicos levou à criação de espécies cujas definições não correspondem aos limites genéticos das espécies biológicas (Muricy *et al.*, 1996a) e determinar os limites das variações morfológicas dentro e entre as espécies é um desafio para os taxonomistas atuais (Ackers *et al.*, 1992). Atualmente existem poucos estudos sobre a morfogênese das espículas em Homoscleromorpha, mas já é sabido que fatores ambientais como concentração de sílica, temperatura, predação e sazonalidade podem alterar a sua formação em Demospongiae (Loh & Pawlik, 2009; Maldonado *et al.*, 1999; Vethaak *et al.*, 1982) e em alguns casos indivíduos da mesma espécie podem ser menos semelhantes entre si e mais a outras espécies próximas (Ackers *et al.*, 1992). Ademais, a utilização de somente uma ferramenta para descrição de novas espécies tem sido bastante criticada por diversos pesquisadores (eg. Dayrat, 2005; Yeates *et al.*, 2011) e apesar da eficiência do uso dos lófocaltropos para diferenciação das espécies de *Plakina*, a utilização da morfologia das espículas pode não ser o suficiente para diferenciar espécies crípticas como *P. monolopha* e *P. trilopha* ou espécies com grande variabilidade morfológica como *P. kanaky* (Ruiz *et al.*, 2015).

Outras ferramentas como isoenzimas, citologia, comunidade de bactérias e mtDNA também já foram utilizadas para delimitação de espécies de *Plakina* e apresentaram bons resultados (Ereskovsky *et al.*, 2013; Cruz-Barraza *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2015; Muricy *et al.*, 1996a; Muricy *et al.*, 1999). Dessas espécies, somente três (*P. kanaky*, *P. muricyae* e *P. paradilopha*) foram originalmente descritas com o auxílio de outras ferramentas, como citologia, comunidade de bactérias e dados moleculares (Cruz-Barraza *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2015).

Muricy *et al.*, 1996 estudaram quatro morfotipos de *Plakina* do Mediterrâneo que pela taxonomia tradicional poderiam ser identificadas como *P. trilopha*. Porém, esses morfotipos apresentavam pequenas variações morfológicas e ecológicas e o estudo de isoenzimas mostrou que esses quatro morfotipos eram geneticamente diferentes sendo, posteriormente, descritas duas novas espécies (*P. endoumensis* e *P. jani*) (Muricy *et al.*, 1998). Já em outro trabalho, foi investigado a citologia e a comunidade de bactérias dessas duas espécies mais a *P. trilopha* e a *P. crypta* (Muricy *et al.*, 1999). Nesse trabalho foi observado que a citologia pode apresentar alguns caracteres que apresentam variações entre as espécies, como a presença/ausência de células vacuolares e o número de microvilosidades nos coanócitos.

Além disso, foi observado que a comunidade de bactérias de cada espécie estudada era única, sendo esta uma ótima característica para discriminar essas espécies de *Plakina*.

Trabalhos recentes utilizaram marcadores mitocondriais para identificação e descrição de novas espécies do gênero *Plakina*. Ereskovsky *et al.*, 2013 utilizaram dados da taxonomia tradicional (morfologia externa, anatomia e espículas) associado a filogenias moleculares resgatadas através do marcador da Citocromo oxidase B. Já Ruiz *et al.*, 2015 utilizaram também dados da taxonomia tradicional, entretanto, eles optaram por utilizar filogenias moleculares utilizando a região da Citocromo oxidase 1, além de dados da citologia e comunidade de bactérias. Cruz-Barraza *et al.*, 2014 utilizaram dados da taxonomia tradicional associada a filogenias moleculares resgatadas através dos marcadores da citocromo oxidase 1 e da citocromo oxidase B. Nesses trabalhos, os resultados encontrados através da taxonomia tradicional, citologia e comunidade de bactérias foram congruentes com os resultados encontrados utilizando os dois marcadores moleculares (Ereskovsky *et al.*, 2013; Cruz-Barraza *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2015).

Apesar da atual estabilidade da taxonomia do gênero *Plakina* e das diversas ferramentas disponíveis para a identificação e descrição de espécies dentro deste gênero, o conhecimento da diversidade do grupo no Brasil ainda é pequeno. Observações preliminares revelaram a presença de alguns exemplares de *Plakina coerulea* e de quatro morfotipos de *Plakina* em uma poça de maré na saída do Canal de Itajurú (Praia do Forte) na região de Cabo Frio (RJ). Além de quatro morfotipos desconhecidos de *Plakina* (que não se encaixavam em nenhuma das descrições de espécies de *Plakina* conhecidas), também foram encontrados dois espécimes de *Plakina* condizente com as descrições de *P. coerulea*. Essa espécie foi originalmente descrita para uma piscina de maré em Maceió, AL, utilizando somente caracteres da taxonomia tradicional (morfologia externa, anatomia e espículas), sendo somente um espécime usado na descrição desta espécie (Cedro *et al.*, 2013).

Os morfotipos de *Plakina* encontrados nesta poça em Cabo Frio apresentavam características morfológicas externas, anatômicas e as espículas muito semelhantes. Porém, esses também apresentavam uma ampla variação de cor (azul, rosa, creme e laranja), diferentes tipos de superfície e alguns espécimes com degradê de cores. Como dito anteriormente, já é sabido que fatores ambientais e ecológicos podem alterar os caracteres morfológicos, em especial as espículas (Loh & Pawlik, 2009; Maldonado *et al.*, 1999;

Vethaak *et al.*, 1982) e que algumas características, como a cor, podem apresentar grandes variações dentro e entre as espécies (eg. Ruiz *et al.*, 2015).

A poça de mare, onde foram encontrados os quatro morfotipos de *plakina*, possui aproximadamente 50 m<sup>2</sup> e sofre muita variação nos fatores ambientais devido ao isolamento do mar durante a maré baixa. Devido a essa variabilidade dos caracteres morfológicos externos, como a cor desses quatro morfotipos aliado a variabilidade ambiental da poça de maré, ficam dúvidas sobre quantas espécies realmente esses quatro morfotipos representam, por isso a necessidade da utilização de diferentes metodologias que suportem a identificação taxonômica desses morfotipos.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

- Delimitar as espécies de *Plakina* encontradas na região de Cabo Frio sob diferentes enfoques metodológicos com o intuito de estudar a variabilidade dos caracteres taxonômicos.

### Objetivos específicos

- Descrever os caracteres da taxonomia tradicional de *Plakina* (morfologia, anatomia e espículas), entender a sua variabilidade e avaliar a sua eficácia como ferramenta para delimitação de espécies.
- Descrever os componentes celulares e bacterianos das espécies encontradas de *Plakina*, entender a sua variabilidade e averiguar a sua eficácia como ferramenta para delimitação de espécies.
- Avaliar a aplicabilidade das sequências da Citocromo oxidase 1 e a Citocromo oxidase B de *Plakina* como ferramenta para delimitação de espécies.
- Identificar molecularmente os espécimes de *Plakina coerulea* do Brasil.
- Comparar os resultados obtidos das diferentes metodologias e averiguar a eficácia destes como uma ferramenta integrativa para delimitação de espécies de *Plakina*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local de coleta

As amostras de *Plakina* foram coletadas na poça de maré do Carolina (22°53'13.0"S 42°00'17.9"W), que fica localizada à direita da entrada do canal de Itajurú, na região de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. A poça possui aproximadamente 50 m<sup>2</sup> e durante a maré baixa fica isolada do mar, enquanto que durante a maré alta fica totalmente submersa (Fig. 4). Todas as coletas foram realizadas durante a maré baixa (Fig. 4E, F).

#### 3.2. Coleta e triagem das amostras

Na primeira expedição foram coletadas diversas esponjas para a triagem e identificação em laboratório. Os espécimes coletados foram selecionados pelo tipo de superfície, bordas elevadas e facilidade de se desprender do substrato. Com base nos resultados da morfologia, variação espicular e organização do esqueleto foram determinados quatro morfotipos de *Plakina* presentes nessa poça de maré (azul, rosa, creme e laranja).

No total foram realizadas cinco coletas (Tab. 2) e antes de cada esponja ser coletada, essas foram fotografadas e alguns dados morfológicos foram anotados em campo e essas informações foram incluídas nas etiquetas. Logo após, as esponjas foram retiradas do substrato através de raspagem e cada uma foi cortada em até três pedaços, um para cada fixador diferente: etanol 96% para morfologia e anatomia, glutaraldeído diluído em tampão cacodilato de sódio (Glutaraldeído 25%; Cacodilato de Sódio 0,4M; água do mar 50%) para citologia e comunidade de bactérias e solução de lise CHAOS (tiocianato de guanidina 4M; N-lauril sarcosil 0,5%; Tris pH 8.0 25μM; 2-mercaptoetanol (0.7 mL/100mL 0,1M) para as análises moleculares.

#### 3.3. Morfologia Externa

Os caracteres morfológicos externos de importância taxonômica das esponjas são a cor, forma, textura e consistência. É muito comum algumas dessas características se perderem depois de fixadas. Por exemplo, a cor pode ser perdida ou modificada dependendo do fixador ou das próprias características químicas das esponjas. Também, os ósculos, que em *Homoscleromorpha* costumam ser um pouco elevados em relação à superfície possuem uma fina membrana e, quando fixados, os ósculos se contraem e dificilmente essa característica pode ser visualizada. Outra característica importante para a taxonomia é a superfície, pois

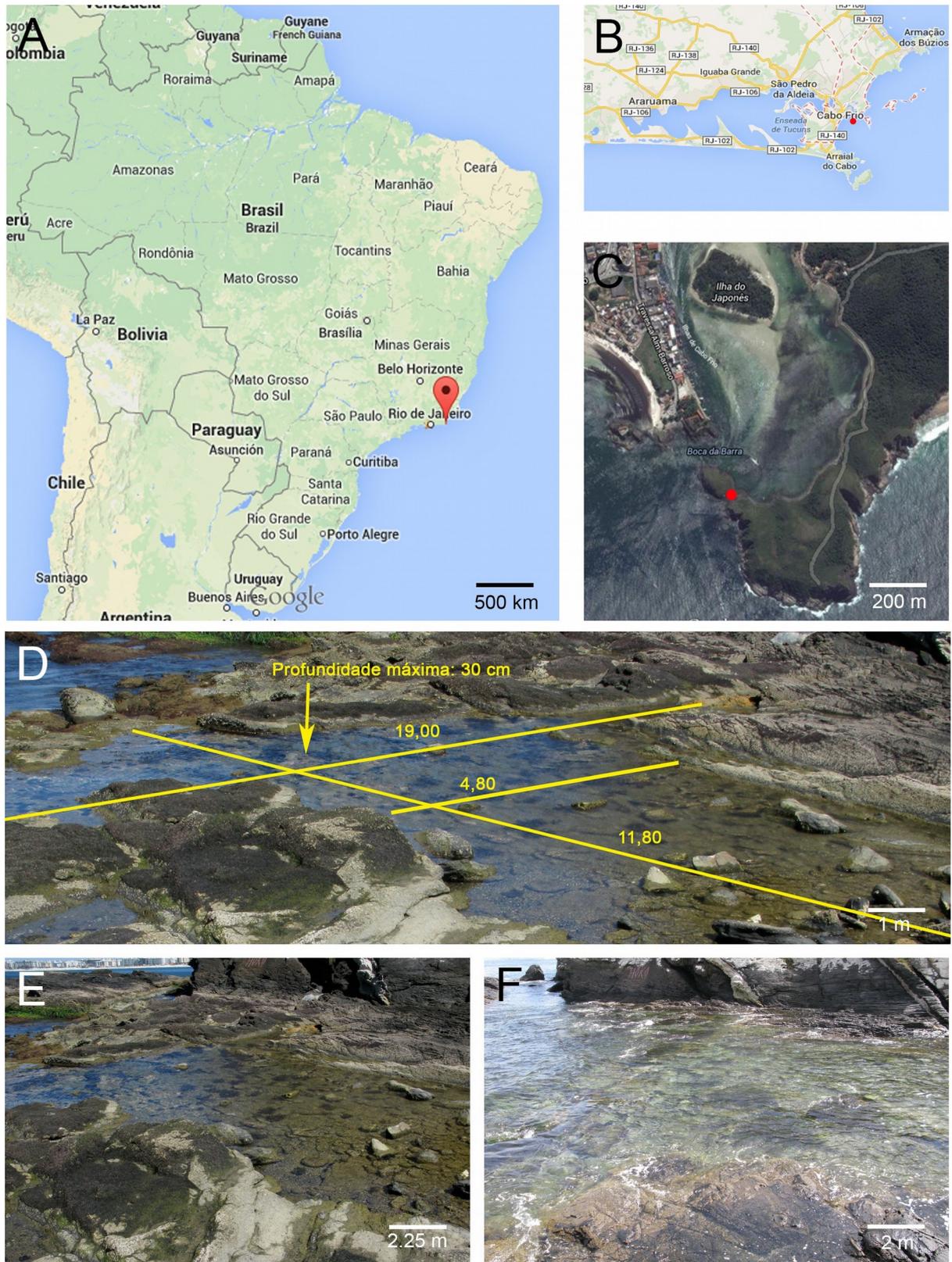


Figura 4. Local de coleta. A – Mapa do Brasil com o Rio de Janeiro. B – Mapa da região dos lagos com a cidade de Cabo Frio. C – Foto da saída do Canal de Itajuru com a Poça do Carolina. D – Foto da Poça do Carolina com medições na maré baixa. E - Poça do Carolina na maré baixa. F – Poça do Carolina na subida da maré.

depois de fixadas, as esponjas costumam se contrair, perdendo a sua forma natural (Muricy & Díaz, 2002; Muricy *et al.*, 1998).

Tabela 2. Exemplares, sua data de coleta, número de tombo, sua coloração e em quais análises foram eles foram utilizados.

Data de coleta	Número de tombo	Morfotipo	Morfologia das espículas	Anatomia	Citologia	Biologia molecular
25 de fevereiro de 2013	MNRJ 16488	Azul	X	X	X	
	MNRJ 16489	Rosa	X	X	X	
	MNRJ 16490	Azul	X	X		
	MNRJ 16491	Azul	X	X		
	MNRJ 16492	Creme	X	X		
23 de abril De 2013	MNRJ 16751	Azul	X			
	MNRJ 16748	Creme	X			
15 de janeiro De 2014	MNRJ 16872	Rosa	X	X		X
	MNRJ 16873	Rosa	X	X		X
	MNRJ 16879	Rosa	X	X		X
	MNRJ 16880	Creme	X	X		X
	MNRJ 17330	Creme	X	X	X	X
	MNRJ 17331	Rosa+Azul	X	X		X
	MNRJ 17332	Azul	X	X		X
	MNRJ 17334	Azul	X	X		X
	MNRJ 17335	Laranja	X	X	X	X
	MNRJ 17336	Creme	X	X	X	X
	MNRJ 17546	Laranja	X	X		X
22 de março De 2014	MNRJ 17547	Laranja	X			
	MNRJ 17553	Laranja	X	X		X
	MNRJ 17554	Laranja	X	X		X
	MNRJ 17580	Laranja	X	X		

### 3.4. Anatomia

A montagem de lâmina de corte transversal foi feita cortando um pequeno fragmento de esponja de 0,5x0,5x0,2 cm. Esse fragmento foi desidratado em uma série alcoólica 96%, Butanol e Xilol por duas vezes cada, por 10 minutos em cada série. Após a desidratação, esse fragmento foi incluído em parafina derretida e deixada em uma estufa a 60°C por 24 horas. Depois desse tempo, o fragmento foi colocado em um molde de bloco de parafina, coberto com parafina derretida e deixado para secar em temperatura ambiente. Depois de seco, o

bloco foi cortado com bisturi a mão livre. As preparações de corte foram submergidas em Xilol para retirar a parafina. Então, foram colocados em uma lâmina e a lamínula foi selada com Entellan (Muricy *et al.*, 1998).

Já a montagem de lâmina de corte tangencial foi feita colocando a esponja sob uma lupa, e com a ajuda de uma pinça de ponta fina e um bisturi, foi realizado um corte bem fino na superfície da esponja. Esse corte foi colocado em uma lâmina e adicionado uma gota de Xilol para clarear o corte por 1 minuto, depois o Xilol foi removido com o auxílio de uma folha de papel toalha. As preparações de corte, então, foram colocados em uma lâmina e a lamínula foi selada com Entellan (Muricy *et al.*, 1998).

Depois de prontas, as lâminas foram observadas em microscópio ótico (Nikon Eclipse e 200) e as estruturas do esqueleto foram descritas e medidas de acordo com a metodologia padrão em Porifera (Boury-Esnaul & Rutzler, 1997; Hajdu *et al.*, 2011). As imagens do esqueleto foram obtidas através de câmera fotográfica acoplada em um microscópio ótico e editadas no programa Photoshop CS6.

### 3.5. Espículas

Para dissociação das espículas um fragmento de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> da esponja foi cortado e colocado em um tubo de ensaio. Nesse tubo foi adicionado aproximadamente 5 ml de ácido nítrico. O tubo, então, foi aquecido em lamparina até que todo o material orgânico fosse consumido e depois foi adicionado água destilada até 1 cm da borda do tubo de ensaio para diluir o ácido nítrico. Logo após, o tubo de ensaio foi colocado numa centrífuga por seis minutos a 1000 rpm para depositar as espículas no fundo do tubo de ensaio. A água destilada foi retirada do tubo de ensaio com a ajuda de uma pipeta. Ela foi retirada sempre com a ponta da pipeta o mais próximo possível da superfície para não levantar as espículas do fundo, deixando no fundo, aproximadamente 5 ml. Esse procedimento com a água destilada foi realizado duas vezes e esse mesmo procedimento foi realizado mais duas vezes com álcool 96°. Então, o tubo de ensaio foi homogeneizado a mão livre para misturar as espículas com o álcool 96° e ele foi retirado do tubo de ensaio e guardado em um tubo do tipo Eppendorf. Para a montagem das lâminas, o tubo Eppendorf contendo as espículas foi homogeneizado a mão livre para misturar as espículas ao álcool e com a ajuda de uma pipeta descartável, uma pequena gota de álcool com espícula foi depositado numa lâmina. A lâmina foi aquecida em lamparina até a completa evaporação do álcool. A lâmina foi, então, selada com Entellan e

lamínula (Hajdu *et al.*, 2011).

As lâminas de espículas foram observadas em microscópio ótico (Nikon Eclipse e200) e as descrições e medições das espículas foram realizadas de acordo com a metodologia padrão de Porifera (Boury-Esnaul & Rutzler, 1997). As espículas do tipo diodos foram medidas em comprimento por espessura em todo o comprimento da espícula. Os triodos, caltropos normais e lofosos foram medidos em comprimento por espessura em cada actina das espículas. No caso dos caltropos lofosos as medidas apresentadas são das actinas simples, não ramificadas e das actinas ramificadas. Para a montagem dos stubs, o tubo Eppendorf contendo as espículas foi homogeneizado a mão livre para misturar as espículas ao álcool e com a ajuda de uma pipeta descartável, uma alíquota da mistura foi depositada numa lâmina presa ao stub com fita dupla face de carbono, após a secagem desse material a quente, o stub foi metalizado a ouro e as imagens foram obtidas no Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Invertebrados do Museu Nacional no microscópio eletrônico Jeol 6390 LV e editadas no programa Photoshop CS6 e organizadas em pranchas no mesmo.

### 3.6. Citologia/comunidade de bactérias

A citologia do material foi investigada em colaboração com o professor Dr. Emilio Lanna da UFBA. Os espécimes coletados foram pós fixados e desidratados no Museu Nacional por mim, e a inclusão em resina e os cortes foram feitos pelo professor Emilio.

As esponjas fixadas em glutaraldeído 2.5% diluído em tampão cacodilato de sódio foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2% e desidratadas em uma série alcoólica para inclusão em resina Epon. Os cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo, contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila e observados no microscópio eletrônico de transmissão na Fiocruz de Salvador.

### 3.7. Análises moleculares

Para as análises moleculares foram escolhidos dois marcadores mitocondriais, parte da região da citocromo oxidase-1 (Cox1) e parte da citocromo oxidase b (CitB) e como métodos de análise filogenéticos foram escolhidos a máxima verossimilhança e a inferência bayesiana. Esses marcadores foram escolhidos pela quantidade de sequências disponíveis para comparação e porque esses marcadores já são muito usados para análises filogenéticas e para determinar espécies de *Plakina* e da classe Homoscleromorpha (eg. Cruz-Barraza *et al.*, 2014;

Ereskovsky *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2015) e os resultados dessas análises têm gerados bons resultados para a taxonomia desse grupo.

O DNA foi extraído e preparado de acordo com a metodologia modificada de Fukami *et al.*, 2004. O DNA foi extraído do material fixado em uma solução tampão de guanidina (CHAOS) e macerado com a ajuda de um pistilo. Em um tubo Eppendorf de 1,5 mL foi adicionado 250 µL de CHAOS, 250 µL de tampão PEB (20 mM de Fosfato de Sódio, 1 mM de EDTA, 5 mM de β-mercaptoetanol) e 500 µL de fenol:clorofórmio. Essa mistura foi homogeneizada a mão livre por cinco minutos e centrifugada a 14000 rpms por cinco minutos. Depois de centrifugada, a mistura se separou em duas fases e a fase sobrenadante foi transferida para um tubo novo e o restante foi descartado. Então, foi misturado mais 500 µL de fenol:clorofórmio e essa mistura foi novamente homogeneizada a mão livre e centrifugada a 14000 rpm por cinco minutos, cada. Novamente, a mistura se separou em duas fases e a fase sobrenadante foi transferida para um tubo novo e o restante foi descartado. A este sobrenadante foi adicionado 500 µL de isopropanol 100 % PA gelado e essa mistura foi homogeneizada a mão livre rapidamente e levada ao freezer a -20°C por pelo menos 24 horas. Depois desse tempo, a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por dez minutos fazendo com que o DNA fosse depositado no fundo do tubo. O isopropanol sobrenadante foi retirado virando gentilmente o tubo para não retirar o DNA do fundo. Ao DNA, foi adicionado 500 µL de etanol 70° PA, sendo homogeneizado a mão livre e centrifugado a 14000 rpm por cinco minutos. O DNA novamente foi depositado ao fundo do tubo e o álcool 70° foi retirado virando gentilmente o tubo para não retirar o DNA do fundo. O DNA foi deixado para secar em temperatura ambiente e depois de seco foram adicionados 50 µL de água deionizada e 0,5 µL de RNase (10 mg/ml). Essa mistura foi homogeneizada a mão livre e estocada no freezer a - 20°C. A quantidade de DNA no extrato, foi determinada por eletroforese em gel de agarose na concentração de 0,8% com tampão TBE 1X (Tris-HCL 89mM; ácido bórico 89mM; EDTA 2mM) utilizando um marcador λ de concentração de DNA (GeneRuler 10 pb Ladder Plus DNA).

As sequências foram amplificadas usando-se os iniciadores Cox1 e CitB (Tab. 3) (Follmer, 1994; modificado de Lavrov *et al.*, 2008). Para cada amostra foi misturado em um microtubo de 0,4 ml, 13,2 µL de água deionizada, 2,9 µL de 10x Buffer (sem MgCl<sub>2</sub>), 2,9 µL de dNTP Mix (4x2mM), 2,9 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2,9 µL BSA (10mg/ml), 1,5 µL de primer F (10 pmol/ml), 1,5 µL de primer R (10 pmol/ml), 1 µL de DNA ou de água deionizada para o

teste branco. As reações de amplificação foram feitas com 1 ciclo de 94°C por 4 minutos, 1 ciclo de 44°C por 1 minuto, 1 ciclo de 72°C por 1 minuto, 35 ciclos de 92°C por 1 minuto, 35 ciclos de 44°C por 1 minuto, 35 ciclos de 72°C por 1 minuto e 1 ciclo de 72°C por 1 minuto. Os produtos amplificados foram detectados em um gel de agarose a 1% com tampão TBE corado com GelRed. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* de 100bp. Para as reações de sequenciamento, os produtos das amplificações foram purificados e sequenciadas pelo método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) e o sequenciamento foi feito por sequenciador automático (ABI 3500).

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificar via PCR as regiões da Cox1 e CitB de *Plakina*.

Primer	Direção	Sequência	Região	Referência
LCO1490	Senso	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Cox1	Follmer, 1994
HC02198	Anti-senso	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Cox1	Follmer, 1994 modificado de Lavrov <i>et al.</i> , 2008
Cob-F1	Senso	5'-ATGTNTTNCCTTGRGGWCAAATGTC-3'	CitB	Lavrov <i>et al.</i> , 2008 modificado de Lavrov <i>et al.</i> , 2008
Cob-R1	Anti-senso	5'-GGATTGAWCGTAAAWATWGCRTAAGC-3'	CitB	Lavrov <i>et al.</i> , 2008

Além das sequências baixadas do GenBank (15), 17 espécimes foram trabalhados nas análises moleculares, quatro espécimes de *Plakina coerulea* depositados na coleção de Porifera do Museu Nacional (o holótipo, um espécime de Fernando de Noronha e dois espécimes coletados em Cabo Frio), três espécimes de *Plakina* azul, três espécimes de *Plakina* rosa, três espécimes de *Plakina* creme e quatro espécimes de *Plakina* laranja (Tab. 4). Como *outgroup*, foi utilizado o gênero *Corticium*. Os eletroferogramas de ambas as fitas foram visualizados, editados e foi feito um consenso dessas no programa Chromas Lite 2.1.1 (disponível em <http://www.technelysium.com.au>). As sequências obtidas foram alinhadas no MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), utilizando-se o algoritmo *ClustalW* com os parâmetros 15:6.66 (Thompson *et al.*, 1994).

Para averiguar se existia saturação de bases nos dois marcadores, foi feito um teste de

saturação de bases para ambos os genes e para isso foi computada uma matriz de distâncias p e uma matriz de distância K2P no programa MEGA6 que foram plotadas em um gráfico.

O modelo evolutivo foi escolhido utilizando o programa JModeltest 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012). Para isso foi feito uma análise para computar a *score* de verossimilhança (likelihood) e depois o cálculo do “AIC”. O melhor modelo evolutivo escolhido pelo programa para a Cox1 e para a CitB foi Tpm2uf +I+G.

A reconstrução filogenética foi feita por dois métodos (1) Máxima verossimilhança, usando a ferramenta do Phym1 (Guindon *et al.*, 2010; disponível em [www.atgc-montpellier.fr](http://www.atgc-montpellier.fr)) porém ela não suporta o modelo evolutivo indicado no JModeltest, por isso foi utilizado o modelo HKY+G para a Cox1 e para a CitB, que foi o segundo melhor modelo encontrado e para testar o suporte dos clados foi feito *bootstrap* com 1.000.000 réplicas; (2) Análise Bayesiana, que foi feita no programa MrBayes v3.2.3 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003), considerando os modelos evolutivos encontrados no Jmodeltest e *burn in* de 50 e o suporte dos clados foi calculado pela probabilidade posterior. A topologia encontrada pelo MrBayes e os valores dos parâmetros livres do modelo de evolução molecular foram estudados pelo programa Tracer v1.0 para avaliar se esses se encontraram em uma mesma região ótima. As árvores dos dois marcadores obtidas na máxima verossimilhança e na inferência Bayesiana foram visualizadas no programa FigTree v1.4.2 e editadas no programa Photoshop CS6.

Tabela 4. Espécimes estudados nas análises filogenéticas e seus respectivos números de acesso do GenBank, números de tombo da coleção de Porifera do Museu Nacional e referências.

Espécie	Mitocondrial completo	Cox1	CitB	Referência
<i>Corticium diamantensis</i>	-	-	KF915295	Ereskovsk et al., 2013
<i>Corticium candelabrum</i>	HQ269363	-	-	Gazave et al., 2010
<i>Corticium candelabrum</i>	JX999073	-	-	Riesgo et al., 2013
<i>Plakina muricyae</i>	-	KJ162930	KJ162928	Curz-Barraza et al., 2014
<i>Plakina jani</i>	HQ269360	-	-	Gazave et al., 2010
<i>Plakina jani</i>	NC_014860	-	-	Gazave et al., 2010
<i>Plakina crypta</i>	HQ269352	-	-	Gazave et al., 2010
<i>Plakina crypta</i>	NC_014885	-	-	Gazave et al., 2010

Tabela 4. Continuação.

Espécie	Mitocondrial completo	Cox1	CitB	Referência
<i>Plakina jamaicensis</i>	-	-	KF915293	Ereskovsk et al., 2013
<i>Plakina trilopha</i>	HQ269356	-	-	Gazave et al., 2010
<i>Plakina trilopha</i>	NC_014852	-	-	Gazave et al., 2010
<i>Plakina monolopha</i>	HQ269351	-	-	Gazave et al., 2010
<i>Plakina monolopha</i>	NC_014884	-	-	Gazave et al., 2010
<i>Plakina kanaky</i>	-	HG799484	-	Ruiz et al., 2014
<i>Plakinastrella cf. onkodes</i>	EU237487	-	-	Wang & Lavrov, 2008
<i>Plakinastrella aff. Onkodes</i>	NC_010217	-	-	Lavrov et al., 2008
<i>Plakortis albicans</i>	-	KJ162931	KJ162929	Cruz-Barraza et al., 2014
<i>Plakortis simplex</i>	HQ269362	-	-	Gazave et al., 2010
<i>Plakortis simplex</i>	NC_014868	-	-	Gazave et al., 2010
<i>Plakortis angulospiculatus</i>	EF519536	-	-	Erpenbeck et al., 2008
<i>Plakina coerulea</i> (Holótipo) Alagoas	-	-	MNRJ 14295	Este estudo
<i>Plakina coerulea</i> Cabo Frio	-	MNRJ 19188	MNRJ 19188	Este estudo
<i>Plakina coerulea</i> Cabo Frio	-	MNRJ 19235	MNRJ 19235	Este estudo
<i>Plakina coerulea</i> Fernando de Noronha	-	-	UFRJPOR 3121	Este estudo
<i>Plakina</i> Azul	-	MNRJ 17331	MNRJ 17331	Este estudo
<i>Plakina</i> Azul	-	-	MNRJ 17332	Este estudo
<i>Plakina</i> Azul	-	-	MNRJ 17334	Este estudo
<i>Plakina</i> Rosa	-	-	MNRJ 16872	Este estudo
<i>Plakina</i> Rosa	-	MNRJ 16873	MNRJ 16873	Este estudo
<i>Plakina</i> Rosa	-	-	MNRJ 16879	Este estudo
<i>Plakina</i> Creme	-	MNRJ 16880	MNRJ 16880	Este estudo
<i>Plakina</i> Creme	-	MNRJ 17330	MNRJ 17330	Este estudo
<i>Plakina</i> Creme	-	MNRJ 17336	MNRJ 17336	Este estudo
<i>Plakina</i> Laranja	-	MNRJ 17335	MNRJ 17335	Este estudo
<i>Plakina</i> Laranja	-	MNRJ 17546	MNRJ 17546	Este estudo
<i>Plakina</i> Laranja	-	MNRJ 17553	MNRJ 17553	Este estudo
<i>Plakina</i> Laranja	-	MNRJ 17554	MNRJ 17554	Este estudo

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise dos caracteres

#### 4.1.1. Morfologia externa

Os exemplares do morfotipo azul (Fig. 5 A) possuem a cor azul-escuro, forma incrustante, são finos, irregulares e apresentam as bordas elevadas. A superfície é lisa e o tamanho pode variar de poucos milímetros quadrados a 25 cm<sup>2</sup> com 0,1 a 0,2 cm de espessura. Os ósculos não são visíveis e a consistência é sempre macia. Os espécimes do morfotipo rosa (Fig. 6) possuem a morfologia bastante semelhante ao azul, com exceção da coloração, que é creme rosada. Alguns espécimes do morfotipo azul podem apresentar um degradê de cor do azul-escuro ao rosado (Fig. 5 B e C).

Os espécimes dos morfotipos creme (Fig. 7) e laranja (Fig. 8) também possuem a morfologia semelhante ao azul, com exceção da coloração, da superfície verrugosa e do tamanho que pode chegar a 50 cm<sup>2</sup>.

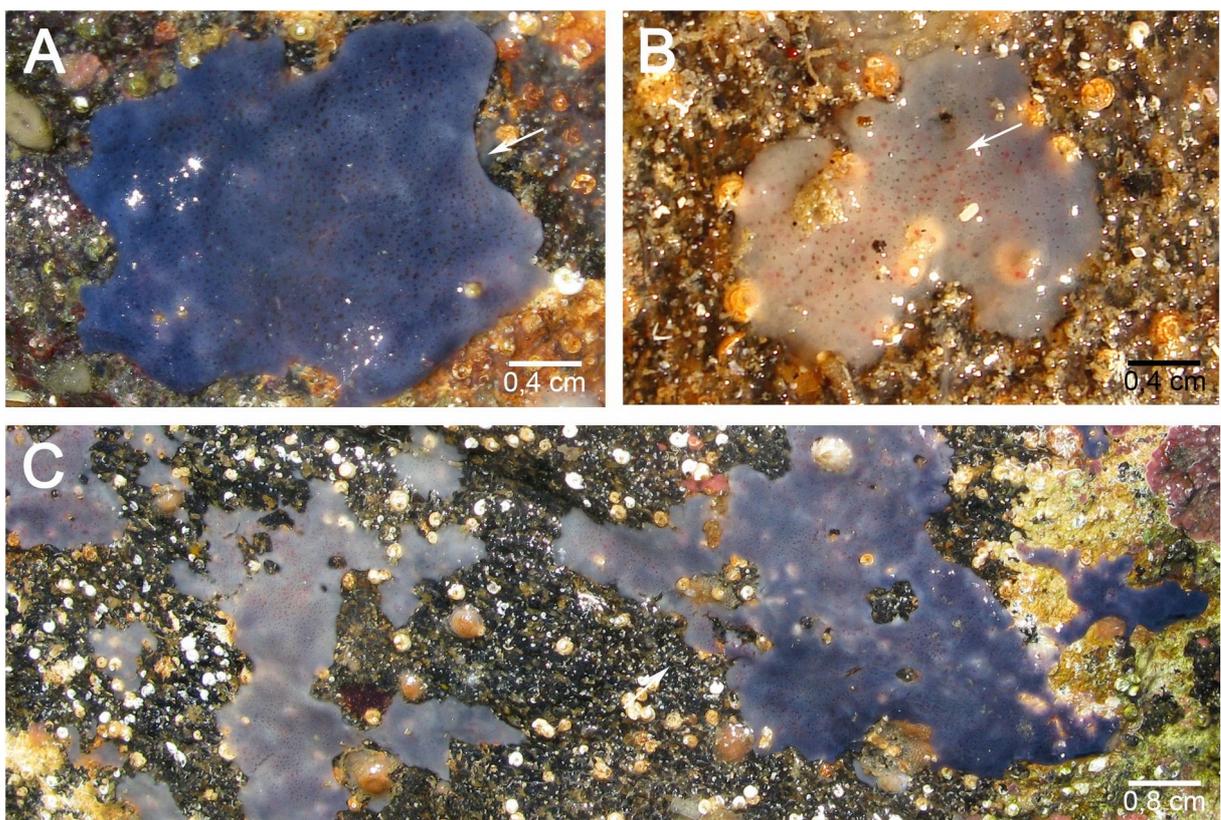


Figura 5. Morfologia externa de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo azul). A – MNRJ 16490, espécime azul. A seta mostra a borda elevada do espécime. B – MNRJ 17331, espécime com variação de azul para rosa. A seta mostra um ponto rosa no espécime. C – MNRJ 16491, espécimes com variação de azul para rosa. A seta aponta para o espécime coletado.

#### 4.1.2. Anatomia interna e organização geral

O sistema aquífero dos quatro morfotipos é do tipo silêbide com câmaras de coanócitos do tipo euripilosas e a anatomia interna é bastante semelhante. O esqueleto tangencial apresenta malhas circulares de espículas (Fig. 9A-D) e o esqueleto ectossomal e coanossomal não possuem diferenciação em corte transversal, apresentando uma reticulação alveolar bem evidente. As cavidades basais estão presentes em todos os morfotipos, enquanto as cavidades ectossomais e subectossomais estão ausentes (Fig. 9E-H).

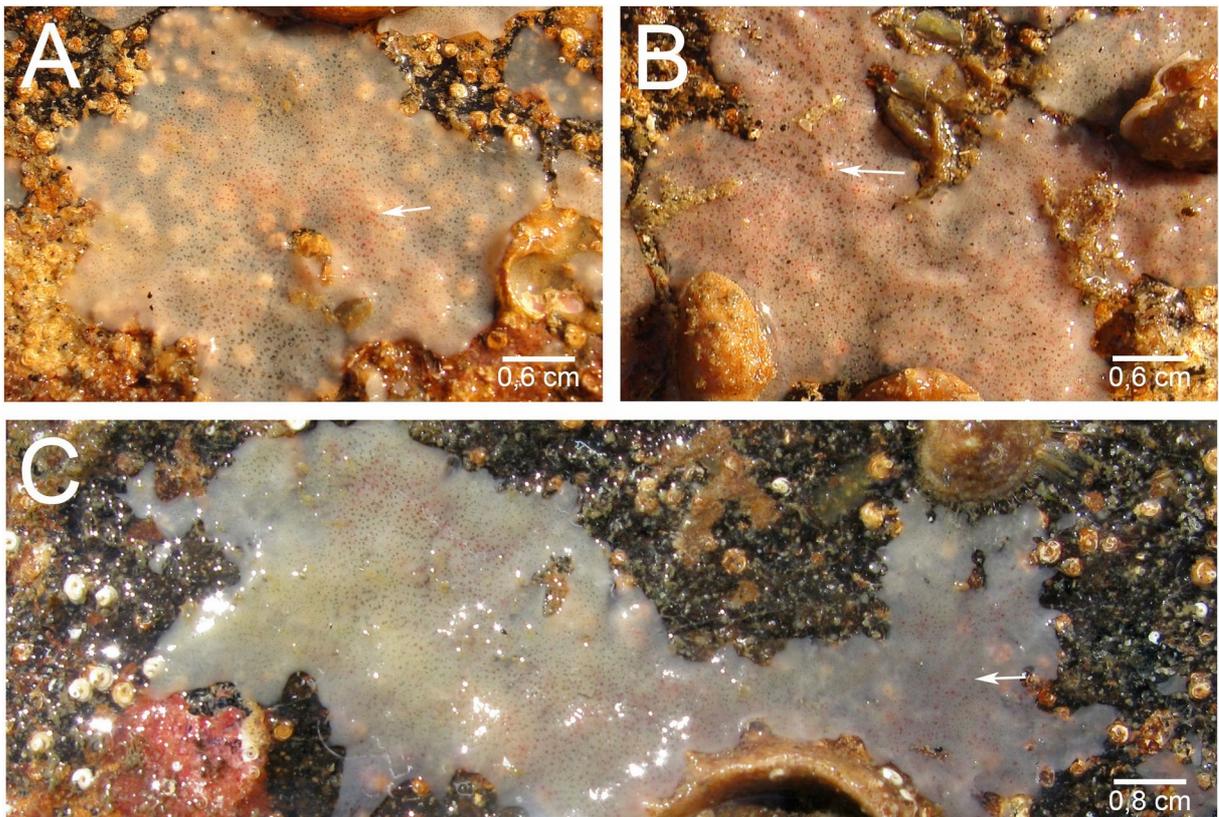


Figura 6. Morfologia externa de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo rosa). A - MNRJ 16873. B - MNRJ 16879. C - MNRJ 16489. As setas apontam para os pontos cor de rosa.

#### 4.1.3. Espículas

Nos morfotipos azul e rosa, os diodos, triodos e caltropos são mais sinuosos e algumas espículas apresentam espinhos próximos à torção central (Fig. 10A-C; 11A-C), já nos morfotipos creme e laranja os diodos, triodos e caltropos são mais regulares, lisos e não apresentam espinhos (Fig. 12A-C; 13A-C).

Os caltropos monolofosos do morfotipo rosa possuem duas a quatro ramificações mediais (Fig. 11D) e os morfotipos azul, creme e laranja possuem de duas a três ramificações mediais (Fig. 10D; 12D; 13D). Porém, os morfotipos azul e rosa sempre apresentam um

buquê de espinhos terminais nos caltropos monolofosos, enquanto os morfotipos creme e laranja raramente apresentam espinhos terminais e os apresentam sempre em pequena quantidade. Além disso, os morfotipos azul e rosa apresentam caltropos robustos e bastante sinuosos, mas os caltropos monolofosos dos morfotipos creme e laranja são finos e menos sinuosos.

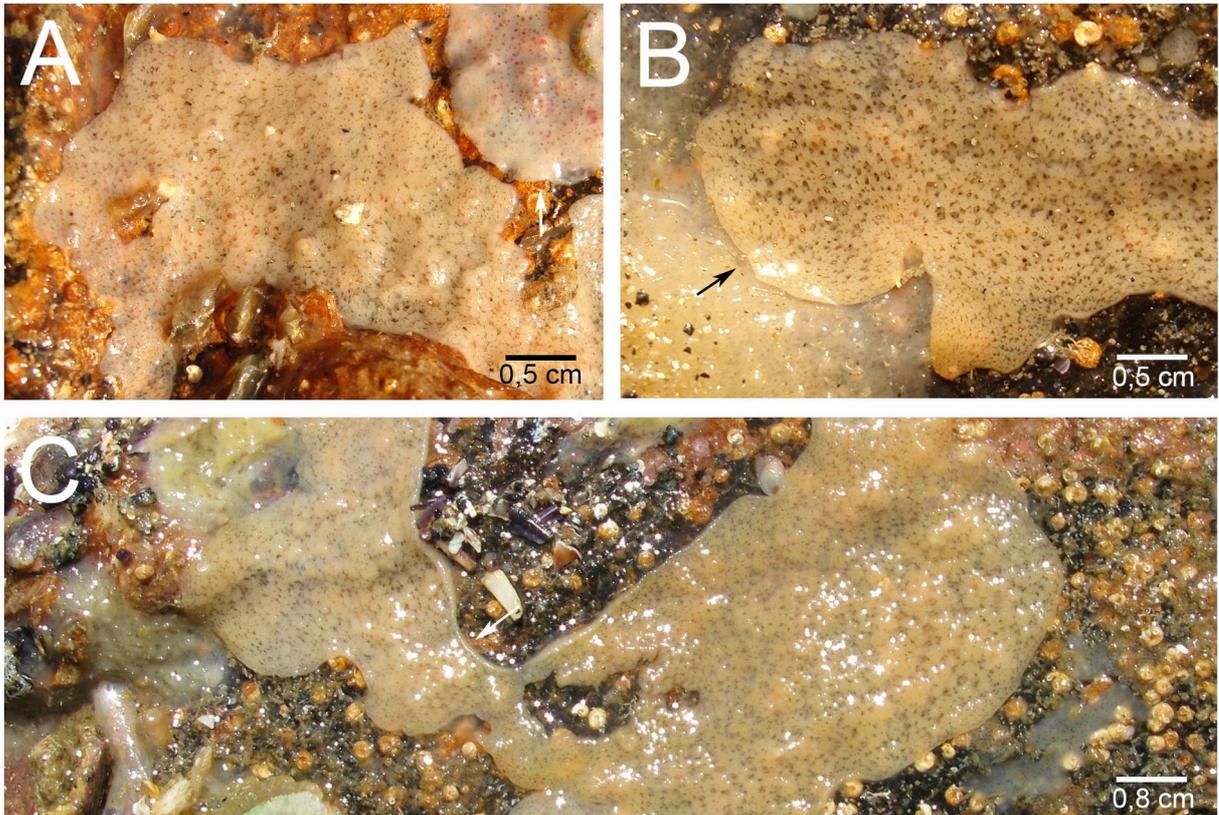


Figura 7. Morfologia externa de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo creme). A - MNRJ 16880. B - MNRJ 17330. A seta aponta para o espécime coletado crescendo sobre outra espécie de esponja. C - MNRJ 16492. A seta aponta para a dobra elevada do espécime.

Os morfotipos azul e rosa são os únicos a apresentarem caltropos dilofosos e trilofosos. Os primeiros possuem as actinas não lofosas lisas, regulares, podendo ou não apresentar espinhos terminais e as actinas lofosas com duas ou três ramificações mediais e duas ou três ramificações apicais com espinhos terminais (Fig. 10E; 11E). Os caltropos trilofosos possuem a actina não lofosa lisa e regular com as pontas sem espinhos terminais e com as actinas lofosas com três ramificações mediais e duas ou três ramificações terminais com espinhos terminais (Fig. 10F; 11F).

#### 4.1.4. Citologia

As células apolares nos quatro morfotipos são irregulares, possuem o núcleo arredondado e diferem na quantidade de inclusões, o morfotipo azul possui de 30-40 (Fig. 14A, B), o morfotipo rosa apresenta de 23-40 (Fig. 17A, B), o morfotipo creme apresenta 16-

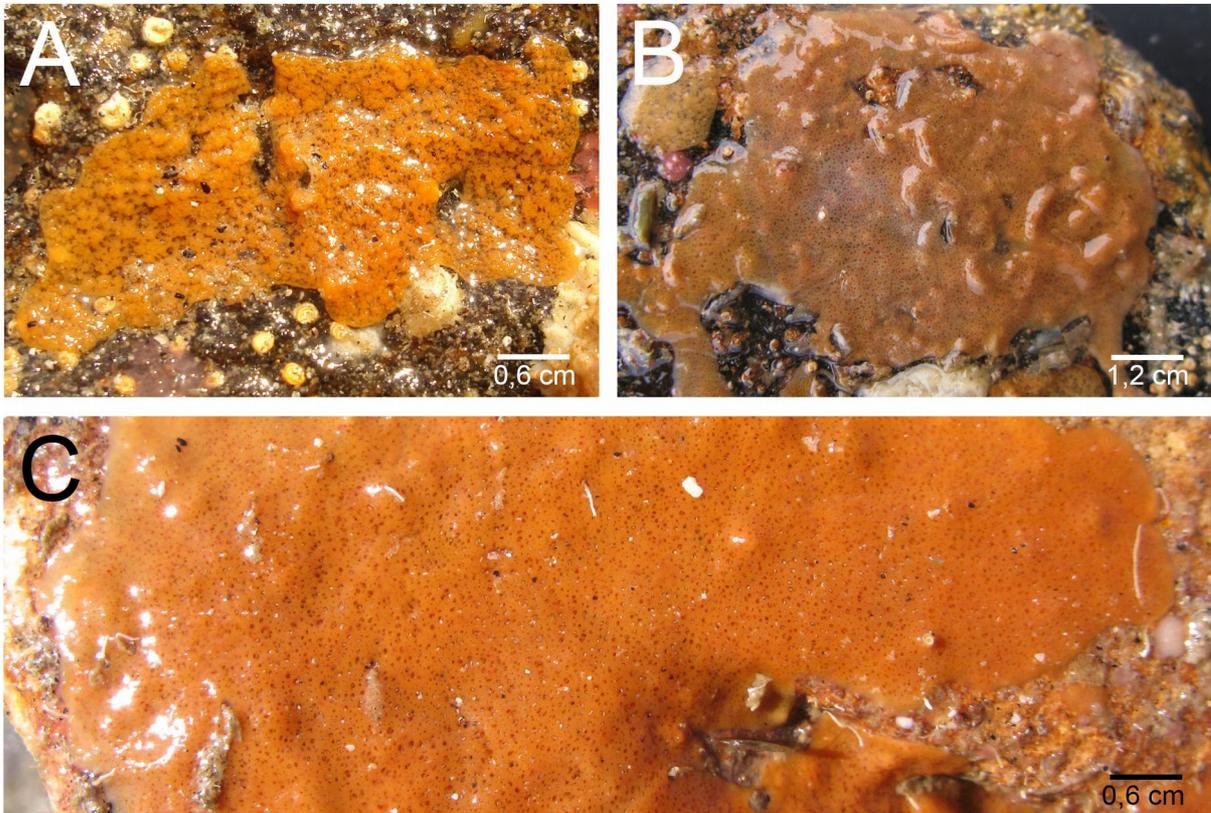


Figura 8. Morfologia externa de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo laranja). A - MNRJ 17335. B - MNRJ 17547. C - MNRJ 17580.

27 (Fig. 20A, B) e o morfotipo laranja apresentam de 21-25 (Fig. 22A, B). Os arqueócitos nos quatro morfotipos são irregulares (Fig. 14C, D; 17C, D; 20C, D; 22C, D). O núcleo dos arqueócitos nos quatro morfotipos é grande e arredondado ou irregular. Os esclerócitos foram encontrados somente nos morfotipos azul e rosado e são irregulares, com o núcleo esférico ou um pouco irregular (Fig. 14E, F; 17E, F). Os pinacócitos nos quatro morfotipos são achatados, irregulares e possuem o núcleo oval ou achatado (Fig. 15A; 18A, B; 19E, F; 22E, F). Alguns pinacócitos tipo “T” foram visualizados somente nos morfotipos azul e rosa, eles possuem o núcleo localizado na parte apical da célula, são arredondados e possuem poucas inclusões (Fig. 15B; 18A). Os coanócitos nos quatro morfotipos são piramidais e nos morfotipos azul e rosa são mais cilíndricos e altos, com o núcleo achatado e sempre localizado na parte apical da célula (Fig. 15C; 18C, D). Nos morfotipos creme e laranja os coanócitos são mais baixos, arredondados, com o núcleo em forma de pêra e encontrados na

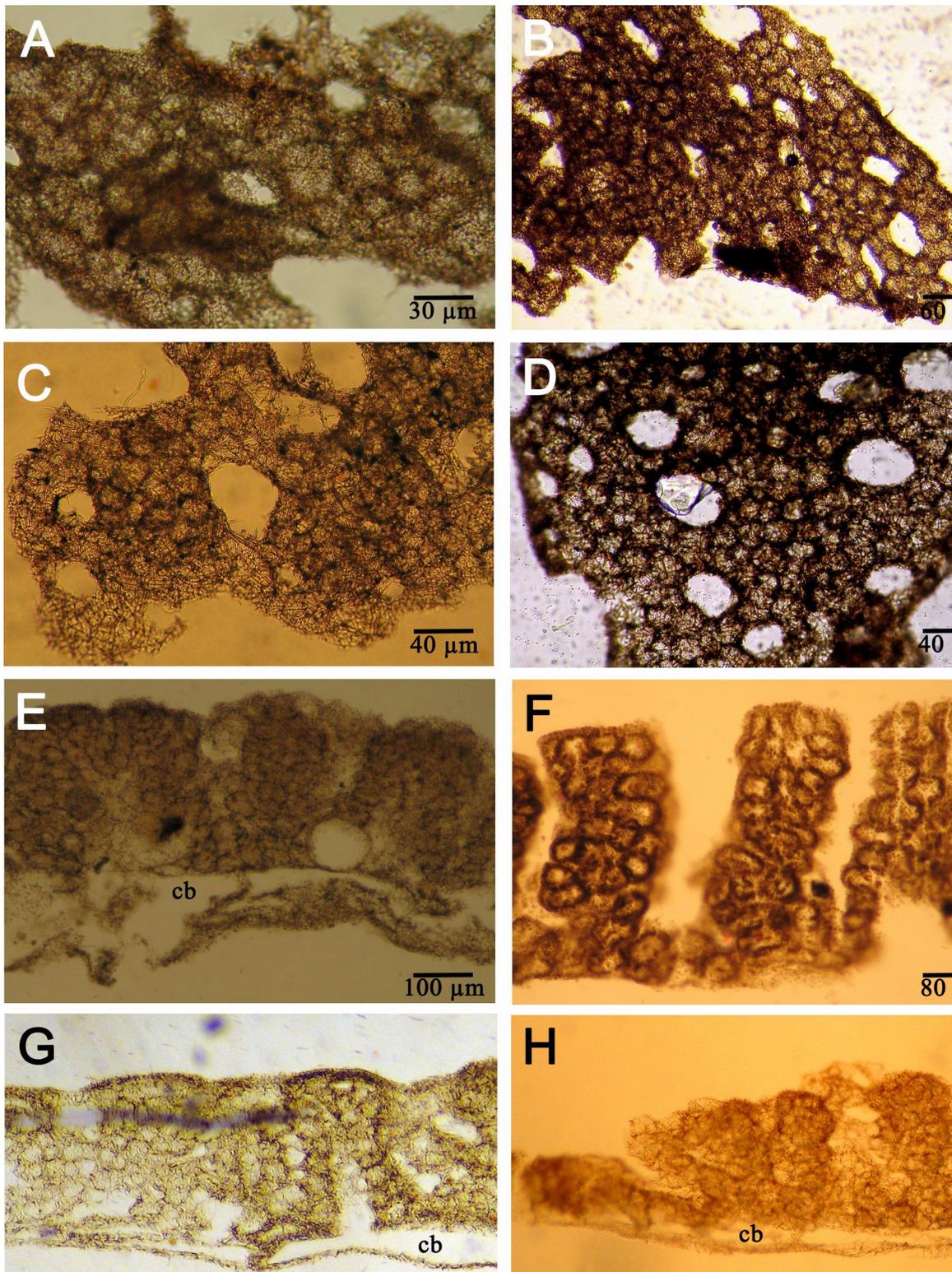


Figura 9. Anatomia do esqueleto dos quatro morfotipos. A – de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo azul) em corte tangencial. B – Morfotipo azul em corte transversal. C – Morfotipo rosado em corte tangencial. D – Morfotipo rosado em corte transversal. E – Morfotipo creme em corte tangencial. F – Morfotipo creme em corte transversal. G – Morfotipo laranja em corte tangencial. H – Morfotipo laranja em corte transversal. cb – cavidade basal.

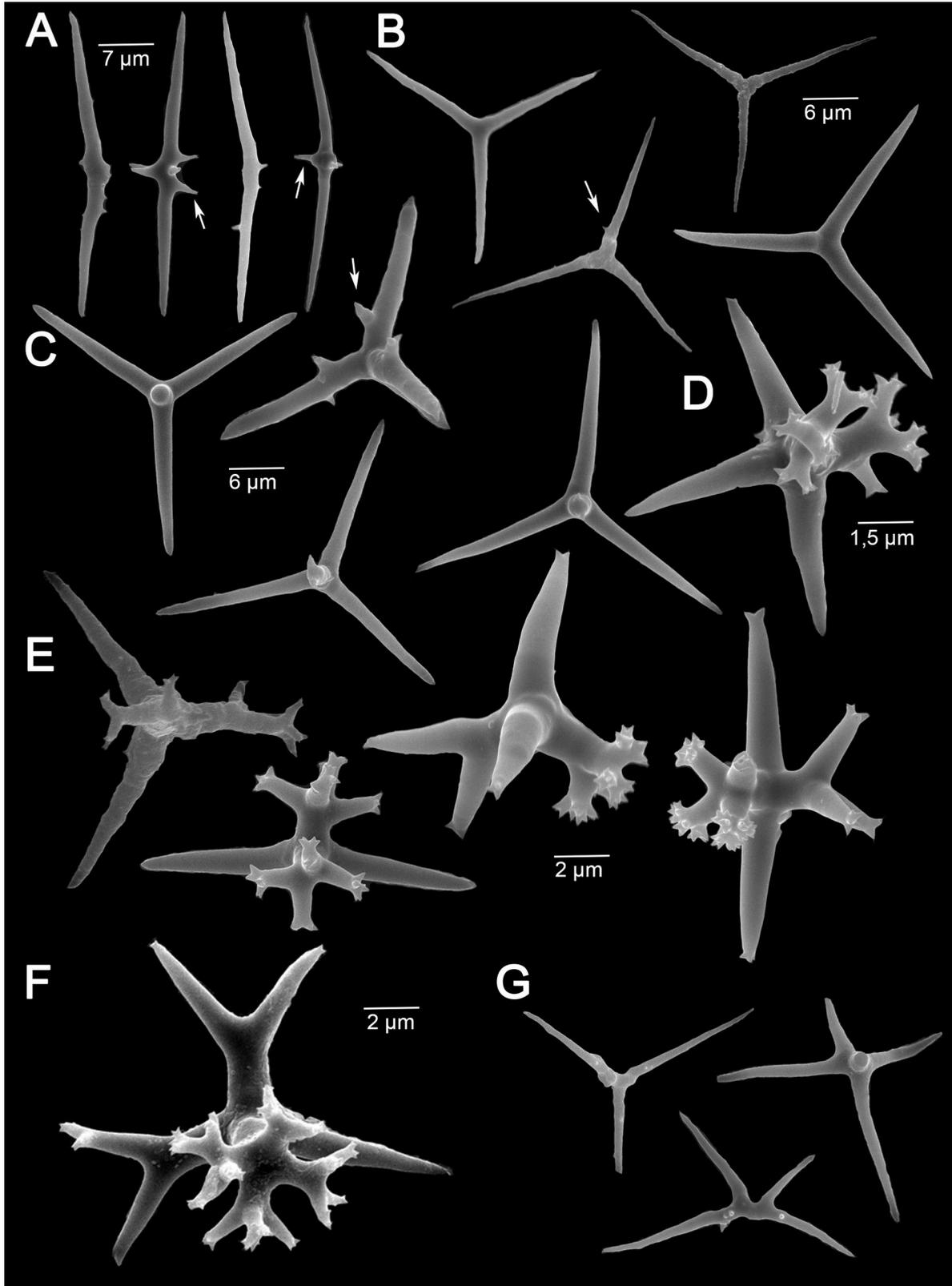


Figura 10. Espículas de *Plakina* sp. nov. 1 (morfortipo azul). A – Diodos. B – Triodos. C – Caltropos. D – Caltropos monolofosos. E – Caltropos dilofosos. F – Caltropo trilofoso. G – Espículas mal formadas. As setas apontam para os espinhos nas espículas não lofosas.

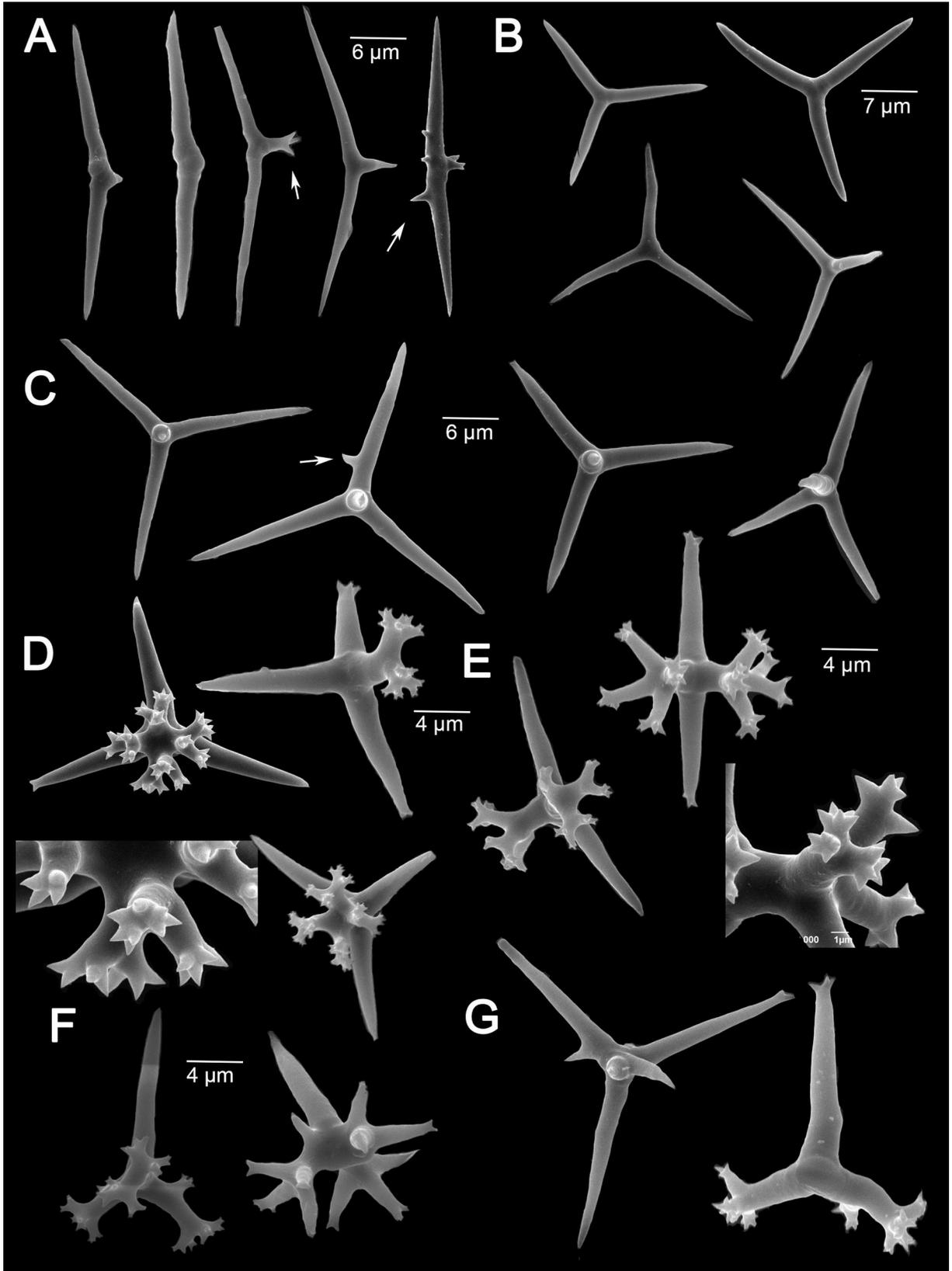


Figura 11. Espículas de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo rosa). A – Diodos; B – Triodos. C – Caltropos. D – Caltropos monolofosos. E – Caltropos dilofosos. F – Caltropos trilofosos. G – Espículas mal formadas. As setas apontam para os espinhos nas espículas não lofosas.

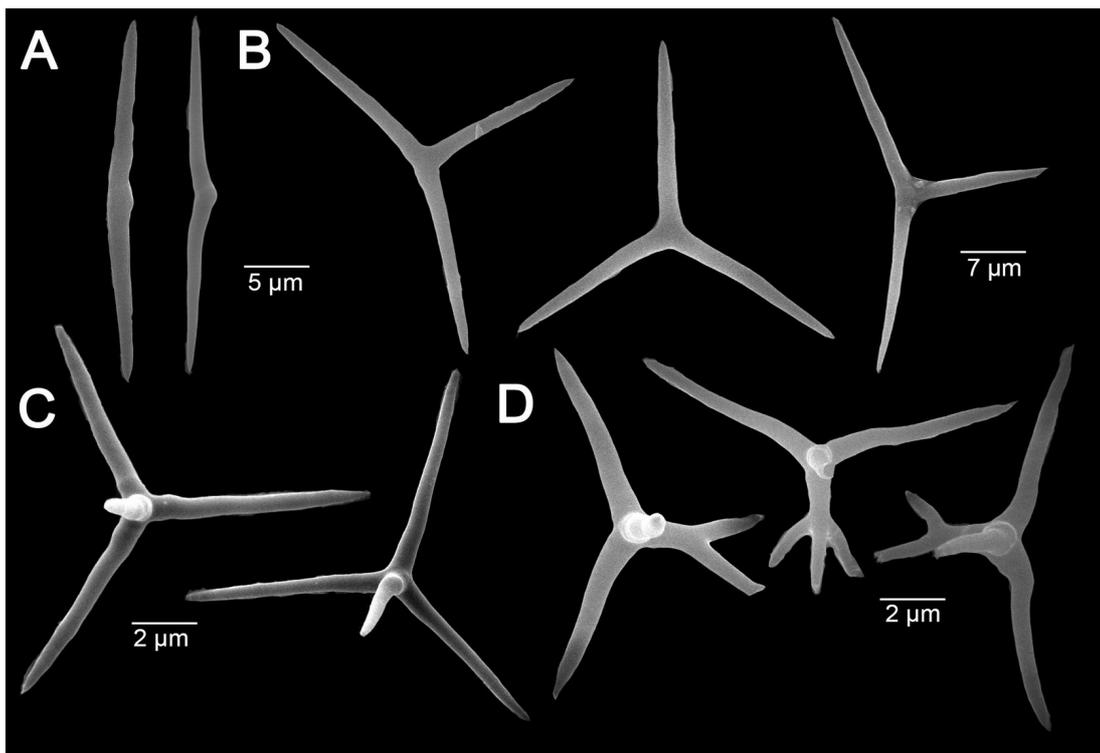


Figura 12. Espículas de *Plakina* sp. nov. 2 (morfofoto creme). A – Diodos. B – Triodos. C – Caltropos. D – Caltropos monolofosos.

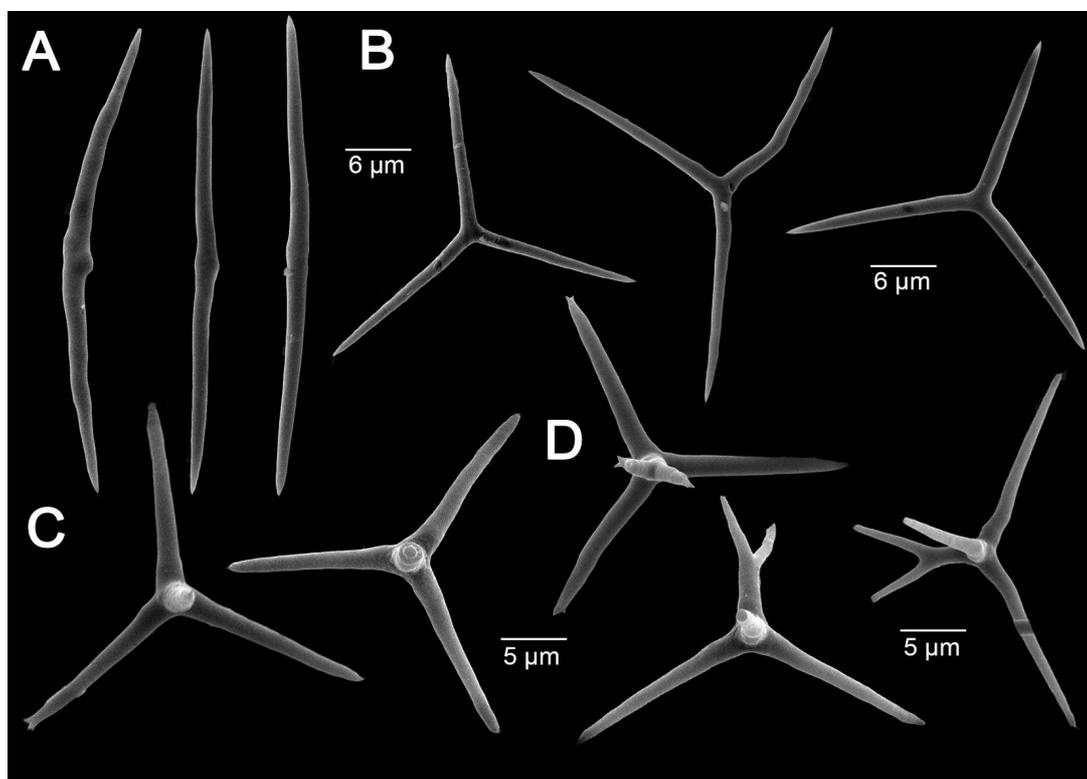


Figura 13. Espículas de *Plakina* sp. nov. 2 (morfofoto laranja). A – Diodos. B – Triodos. C – Caltropos. D – Caltropos monolofosos.

parte medial ou apical da célula (Fig. 20G, H; 22H). O colar no morfotipo azul apresenta de 21-34 microvilosidades (Fig. 15D), no morfotipo rosado são 24-27 (Fig. 18E), no morfotipo creme são aproximadamente 30 e no morfotipo laranja aproximadamente 25 (Fig. 22G). As células vacuolares foram encontradas somente nos morfotipos creme e laranja e são esféricas ou arredondadas, com o núcleo pequeno e oval (Fig. 21A, B; 23A, B). Células cinza (*gray cells*) foram encontradas somente no morfotipo laranja. Elas possuem a forma arredondada a irregular e possuem algumas pequenas projeções e núcleo esférico a irregular (Fig. 23C, D). Também foram encontradas somente no morfotipo laranja uma espécie de capa laranja que envolve algumas espículas (Fig. 24).

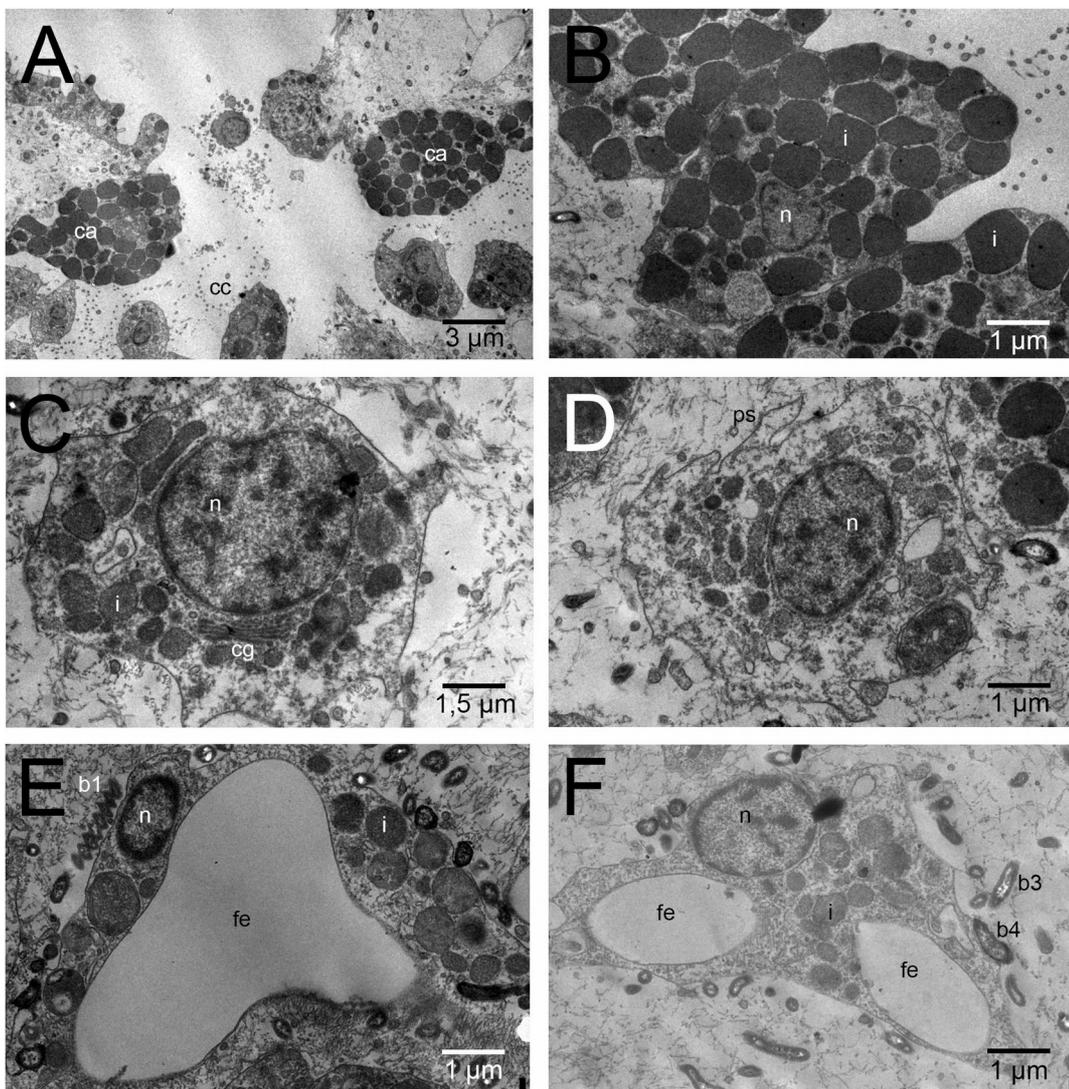


Figura 14. Citologia de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo azul). A – Região apopilar. B – Célula apopilar. C e D – Archeócito. E e F – Esclerócito. ca – célula apopilar. cc – colar dos coanócitos. n – núcleo. i – inclusões. cg – complexo de golgi. ps – pseudopodes. fe – fantasma de espícula. b1 – bactéria tipo 1. b2 – bactéria tipo 2. b3 – bactérias tipo 3. b4 – bactérias tipo 4.

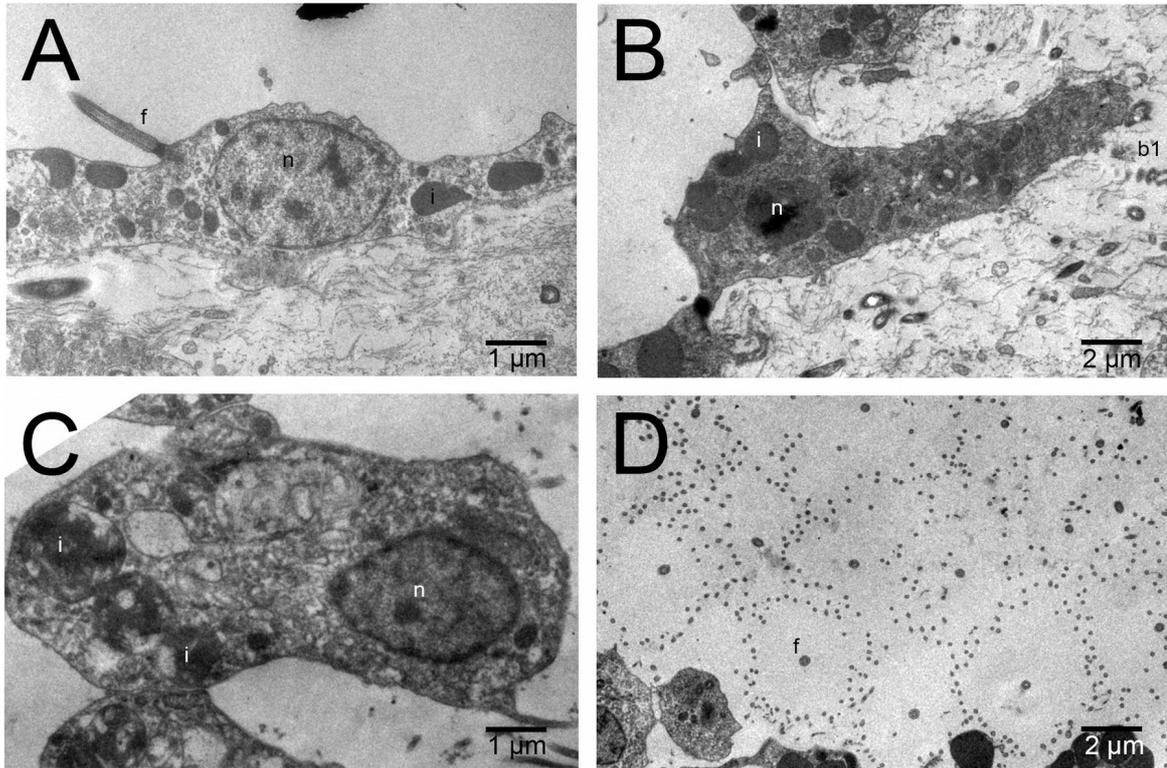


Figura 15. Citologia de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo azul). A – Pinacócito. B – Pinacócito tipo T. C – Coanócito. D – Colar dos coanócitos. f – flagelo. n – núcleo. i – inclusão. b1 – bactéria tipo 1.

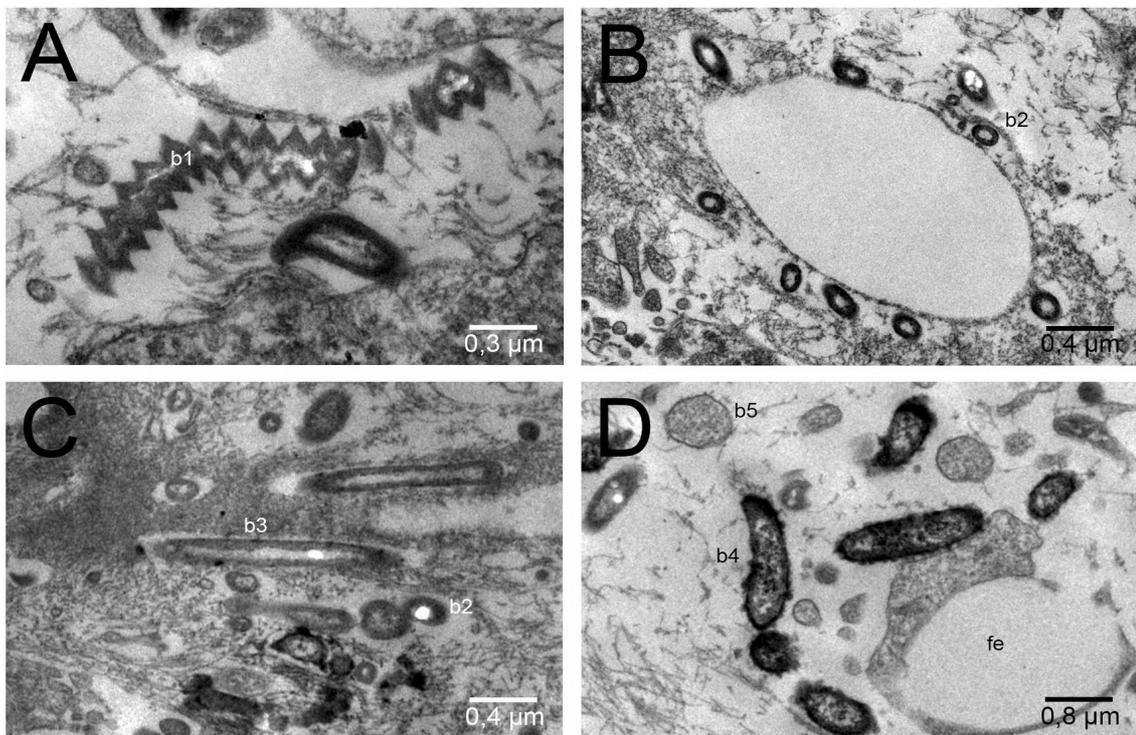


Figura 16. Comunidade de bactéria de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo azul). A – Tipo 1. B – Tipo 2. C – Tipo 3. D – Tipo 4 e 5. b1 – bactéria tipo 1. b2 – bactéria tipo 2. b3 – bactéria tipo 3. b4 – bactéria tipo 4. b5 – bactéria tipo 5.

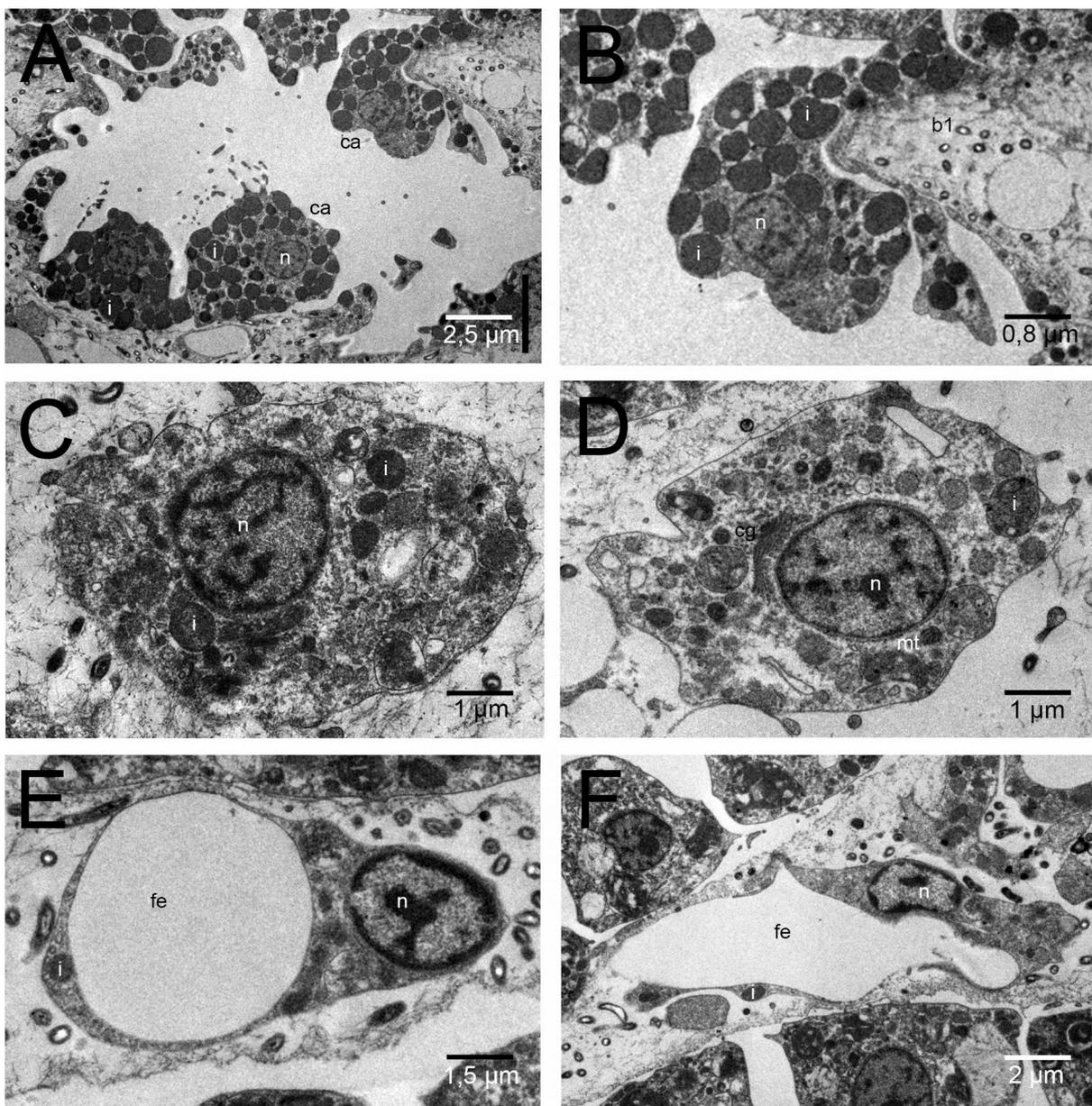


Figura 17. Citologia de *Plakina* sp. nov. 1 (morfofoto rosa). A – Região apopilar. B – Célula apopilar. C e D – Archeócito. E e F – Esclerócito. ca – célula apopilar. n – núcleo. i – inclusão. b1 – bactéria tipo 1. cg – complexo de golgi. mt – mitocôndria. fe – fantasma de espícula.

#### 4.1.5. Comunidade de bactérias

Os quatro morfotipos possuem uma baixa densidade de bactérias associadas ao mesoólio. Nos morfotipos azul e rosa foram encontrados cinco tipos diferentes de bactéria. O primeiro tipo bacteriano é pouco comum, possui uma forma sanfonada com a parte interna da bactéria clara, com poucos grânulos escurecidos e a parte mais externa parece ser uma camada única e bastante escura (Fig. 16A; 19A). O segundo tipo de bactéria é o mais comum, possui a forma

esférica com o seu núcleo claro e a parte mais externa com somente uma camada, espessa e bastante escurecida (Fig. 16B; 19B, D). O terceiro tipo de bactéria é bastante comum, possui a

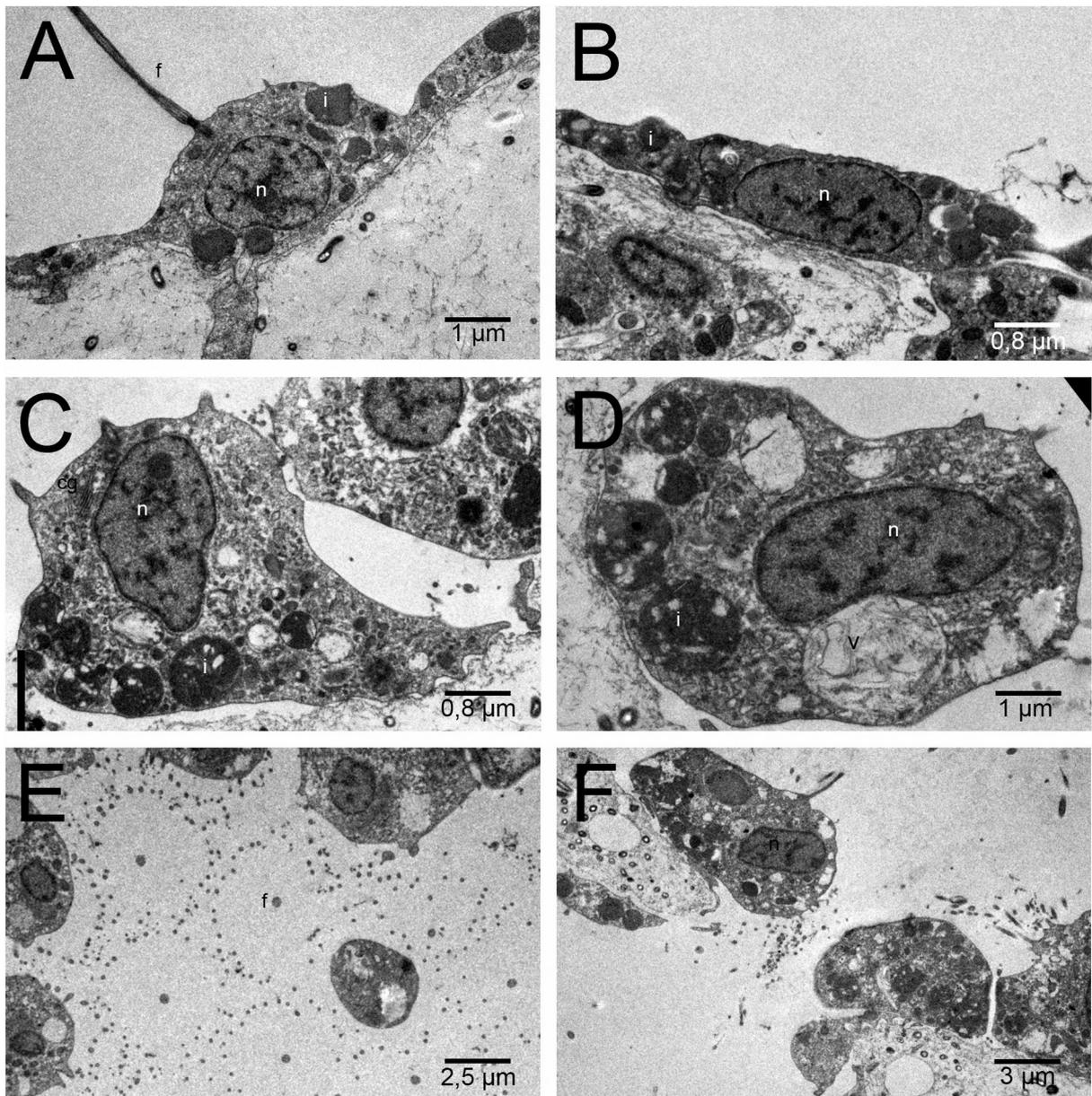


Figura 18. Citologia de *Plakina* sp. nov. 1 (morfortipo rosa). A e B – Pinacócitos. C e D – Coanócito. E - Colar dos coanócitos. F – Prosopila. n – núcleo. i – inclusão. f – flagelo.

forma de bastão e em alguns casos pode apresentar uma curvatura em uma das extremidades, e essas podem ser arredondadas ou pontiagudas. A parte interna da bactéria possui algumas partes mais escuras e outras partes mais claras com a parede espessa e bastante escurecida (Fig. 16C; 19B). O quarto tipo de bactéria também é bastante comum, possui a forma esférica ou em forma de bastão, com as extremidades arredondadas. Podem apresentar uma das

extremidades mais espessa que a outra, a parte mais interna com muitos grânulos bem escurecidos e possui a parede bem espessa (Fig. 16D; 19C, D). O quinto tipo de bactéria é bastante abundante dentro do mesoilo, possui a forma esférica e oval com a parte interna com muitos grânulos claros e pequenos e possui uma parede fina (Fig. 16C, D). Ao contrário dos morfotipos azul e rosa, que apresentam uma grande diversidade de tipos de bactérias, os morfotipos creme e laranja apresentam somente um tipo de bactéria associada, esse tipo possui forma de bastão, com a parte mais interna pouco densa com alguns filamentos que ligam a parte interna à parede externa. Esse tipo de bactéria apresenta uma parede espessa e irregular (Fig. 21C, D; 23E, F).

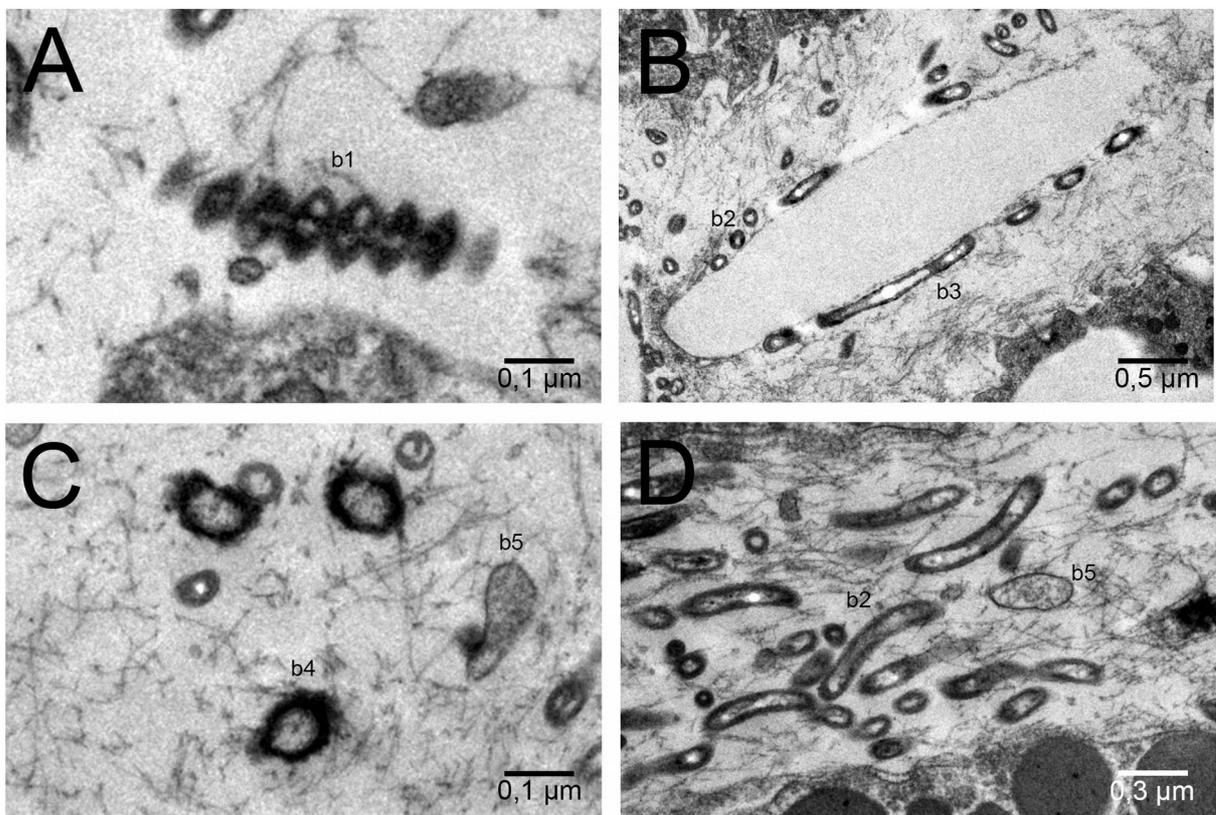


Figura 19. Comunidade de bactéria de *Plakina* sp. nov. 1 (morfotipo rosa). A – Tipo 1. B – Tipos 2 e 3. C – Tipos 4 e 5. D – Tipos 4 e 2. b1 – bactéria tipo 1. b2 – bactéria tipo 2. b3 – bactéria tipo 3. b4 – bactéria tipo 4. b5 – bactéria tipo 5.

#### 4.1.6. Análise molecular

O teste de saturação de bases em ambos os marcadores não apresentou evidências de saturação, como mostrado pela relação entre as distâncias 'p' e as distâncias corrigidas para taxas de transição/transversão K2P (Fig. 25).

Não foi possível fazer um bom alinhamento com as esponjas do gênero *Oscarella* nas

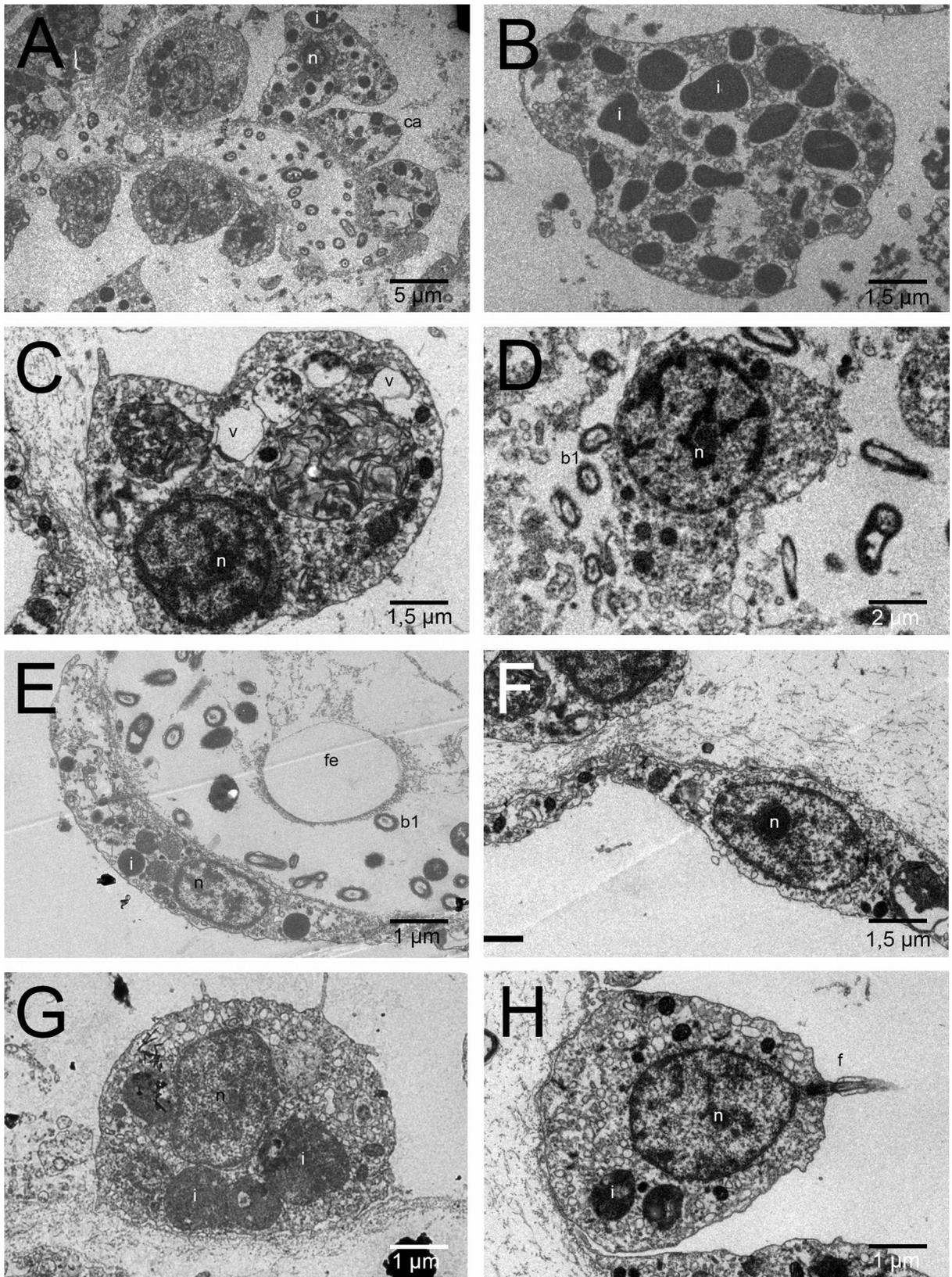


Figura 20. Citologia de *Plakina* sp. nov. 2 (morfortipo creme). A – Região apopilar. B – Célula apopilar. C e D – Arqueócito. E e F – Pinacócito. G e H – Coanócitos. n – núcleo. i – inclusão. ca – célula apopilar. i – inclusão. v – vacúolo. b1 – bactéria tipo 1. fe – fantasma de espícula.

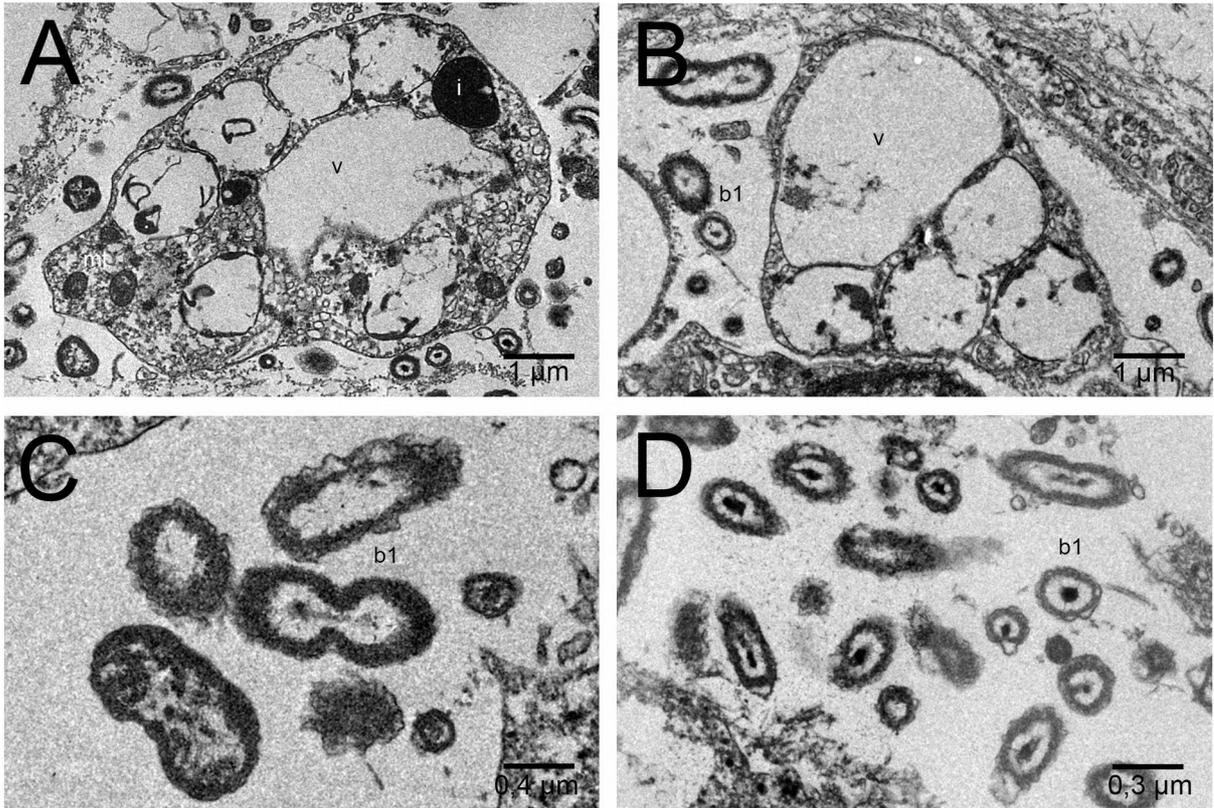


Figura 21. Citologia e comunidade de bactéria de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo creme). A e B – Células vacuolares. C e D – único tipo de bactéria encontrado. v – vacúolo. i – inclusão. b1 – bactéria tipo 1.

análises da Cox1, pois quando uma seqüência de *Oscarella* era inserida no alinhamento, vários *indels* eram criados. Por isso, seqüências de *Corticium candelabrum* foram utilizadas como grupo externo. O alinhamento da Cox1 apresentou 679 pbs e as árvores resultantes das análises de máxima verossimilhança e da inferência Bayesiana encontraram topologias idênticas (Fig. 26). O clado que suporta todos os Plakinideos, exceto *Corticium*, teve um alto valor de suporte para as duas análises (99%/100%). Esses Plakinideos apresentaram dois cladros. O primeiro contém os gêneros *Plakortis*, *Plakinastrella* e algumas esponjas do gênero *Plakina* (*P. trilopha*, *P. kanaky*, *P. jani*, *P. coerulea* e os morfotipos azul e rosado) e tiveram baixos valores de suporte (40%/59%) para as duas análises e o segundo clado contendo *P. muricyae*, *P. monolopha*, *P. crypta* e os morfotipos creme e laranja, esse com altos valores de suporte (84%/99%) em ambas as análises.

Os morfotipos azul e rosa aparecem como um grupo monofilético, em um clado bem separado das outras espécies de *Plakina* do mesmo clado, com 100% de suporte em ambas as análises.

*Plakina coerulea* também aparece como um grupo monofilético bem suportado

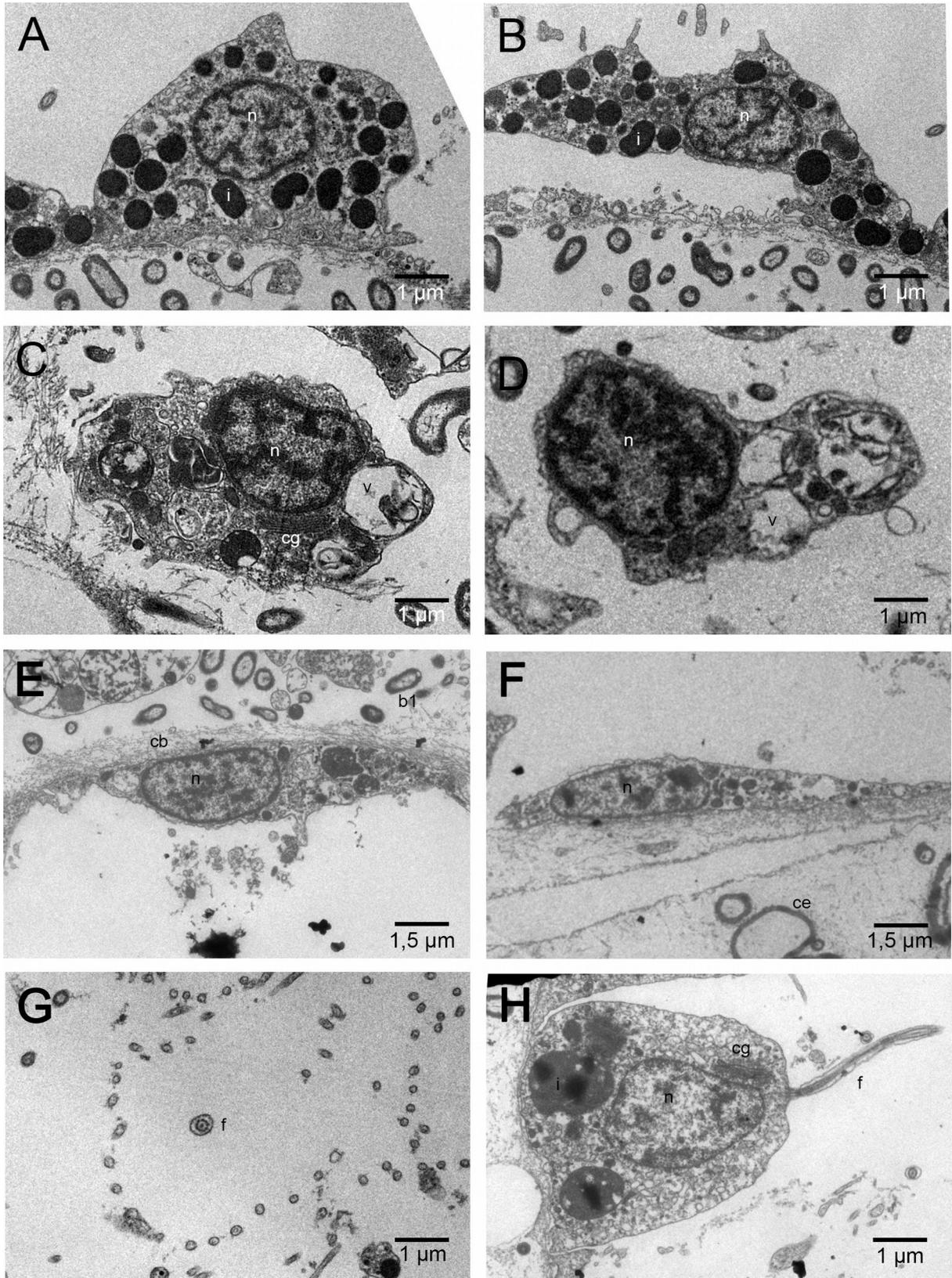


Figura 22. Citologia de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo laranja). A – Região apopilar. B – Célula apopilar. C e D – Arqueócito. E e F – Pinacócito. G - colar dos coanócitos. H – Coanócito. N – núcleo. I – inclusão. cg – complexo de golgi. cb – camada basal. b1 – bactéria tipo 1. ce – capa da espícula. f – flagelo.

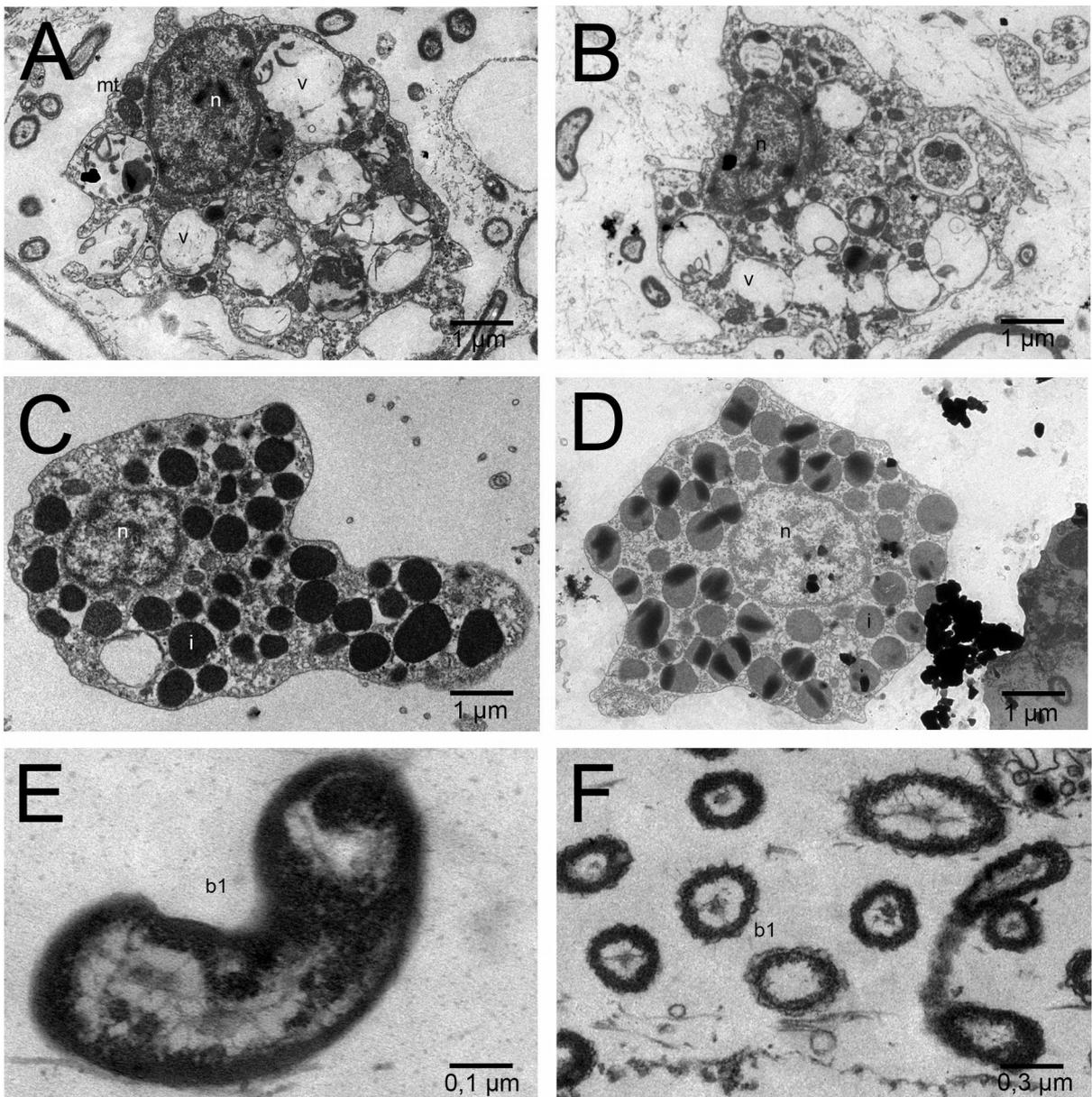


Figura 23. Citologia e comunidade de bactéria de *Plakina* sp. nov. 2 (morfotipo laranja). A e B - colar dos coanócitos. C e D - Células cinza. E e F - único tipo de bactéria encontrado. mt – mitocondria. n – núcleo. v – vacúolo. b1 – bactéria tipo 1.

(100%/100%) com a espécie aparecendo como um grupo irmão de *P. trilopha* (95%/100%).

Os morfotipos creme e laranja apareceram como um grupo monofilético com altos valores de suporte (99%/100%), mas com baixa similaridade entre as amostras. Esses dois morfotipos aparecem como um grupo irmão de *P. muricyae*, também com altos valores de suporte (83%/99%).

O alinhamento da CitB apresentou 422 pbs e as árvores resultantes das análises de

máxima verossimilhança e da inferência Bayesiana encontraram topologias muito similares para este marcador (Fig. 27). Assim como nas análises da Cox1, o gênero *Plakina* apareceu como um grupo parafilético, com dois clados muito semelhantes a Cox1, entretanto nas análises da CitB, os gêneros *Plakortis* e *Plakinastrella* se encontram como um grupo irmão aos morfotipos azul e rosa, com um clado com alto valor de suporte (83%/96%). Assim como nas análises da Cox1, os morfotipos azul e rosa se mostraram monofiléticos, com altos valores de suporte (93%/99%).

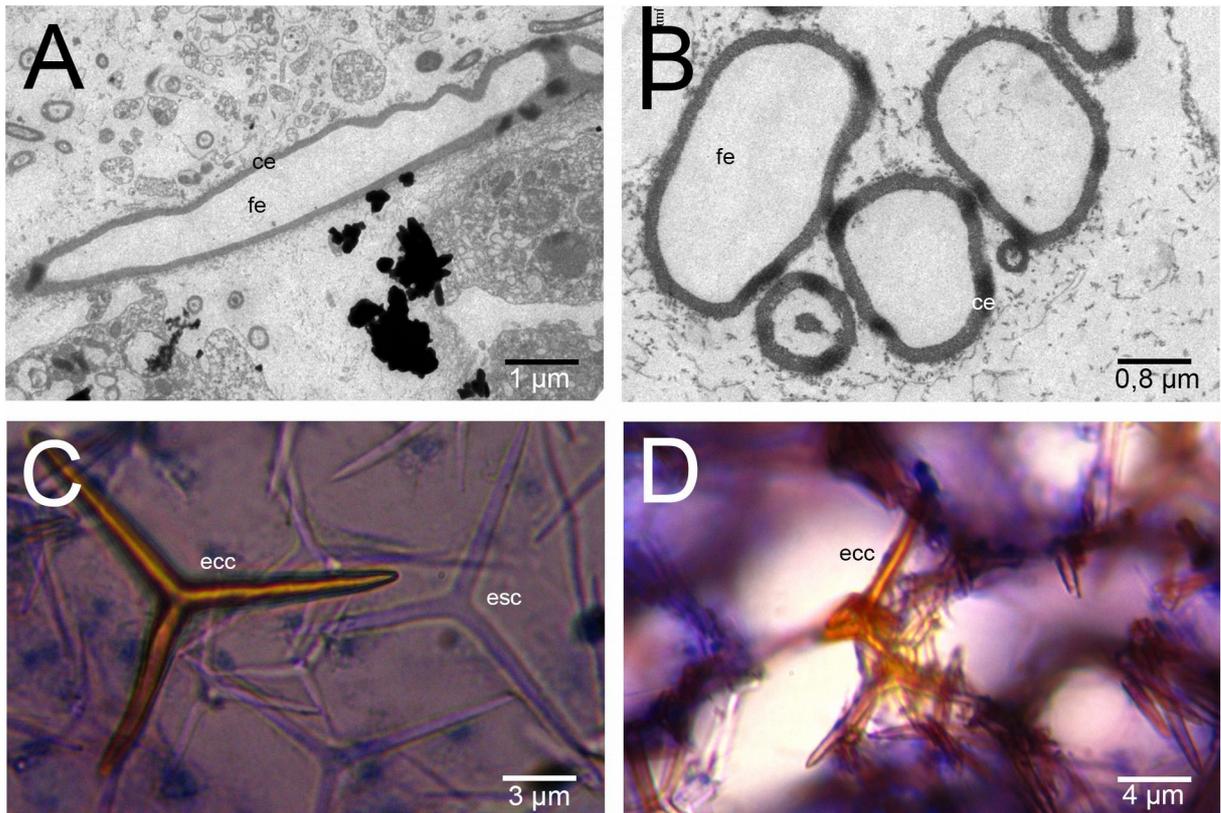


Figura 24. Capa que envolve as espículas. A e B – Capa em microscopia eletrônica de transmissão. C e D – Capa em microscopia ótica. ce – capa de espícula. fe – fantasma de espícula. ecc – espícula com capa. esc – espícula sem capa.

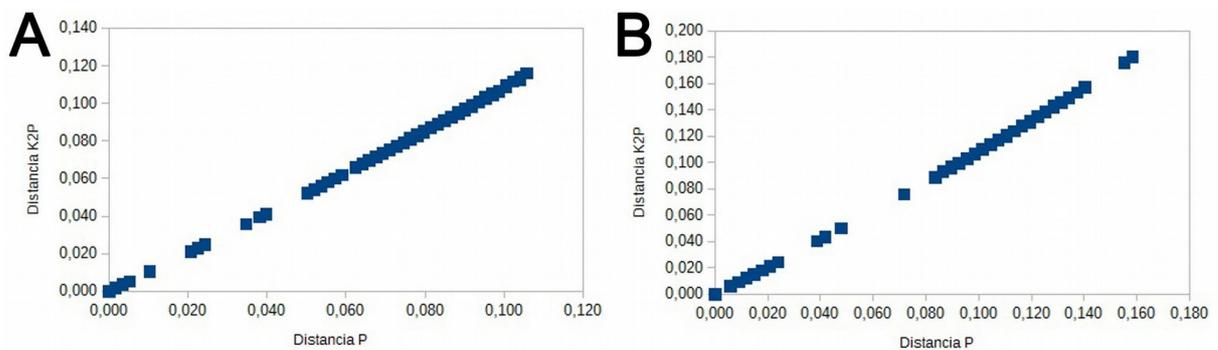


Figura 25. Teste de saturação de bases da Cox1 e da CitB.

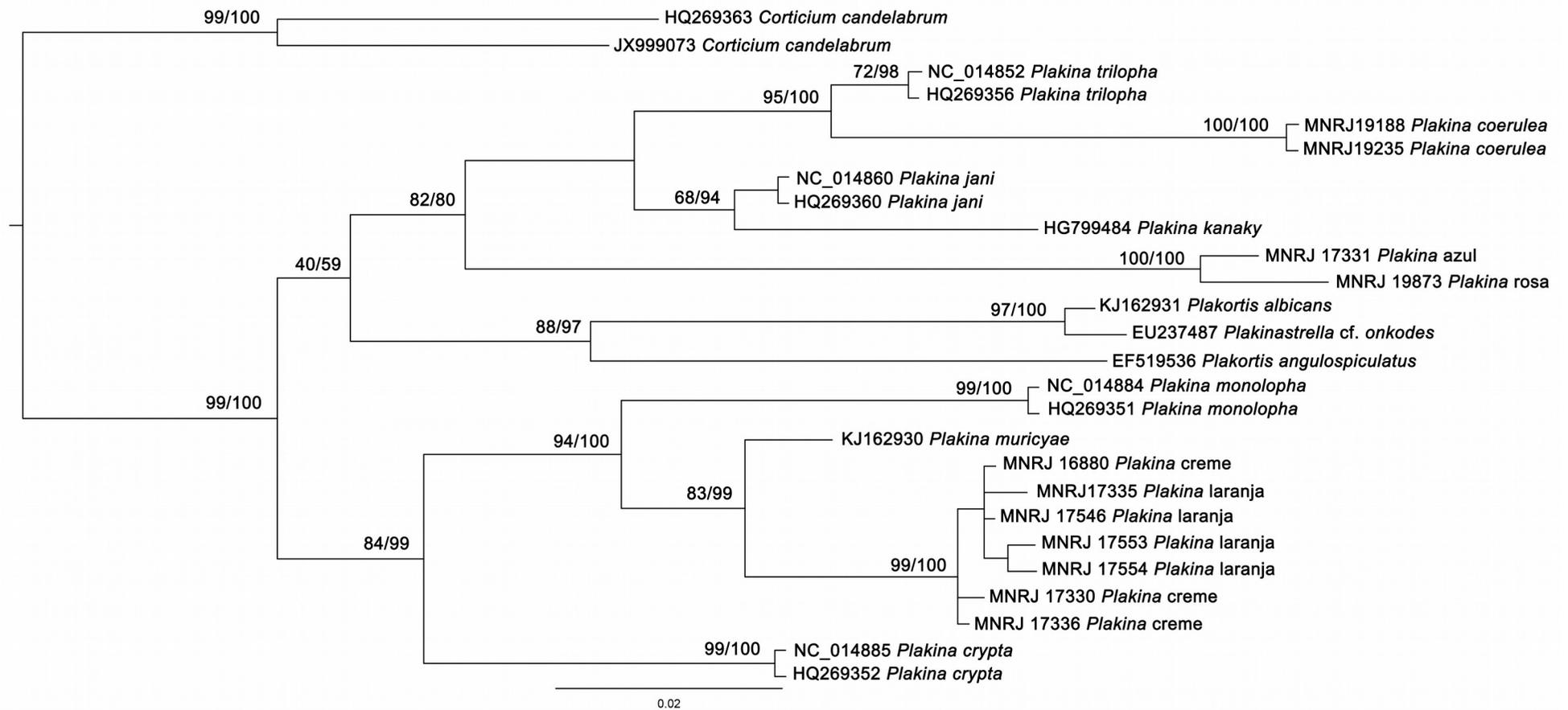


Figura 26, Análise filogenética de Plakinidae usando a Cox1, com os valores de suporte da máxima verossimilhança e da inferência bayesiana em porcentagem. A topologia apresentada é referente ao resultado da máxima verossimilhança com os valores de suporte da inferência Bayesiana.

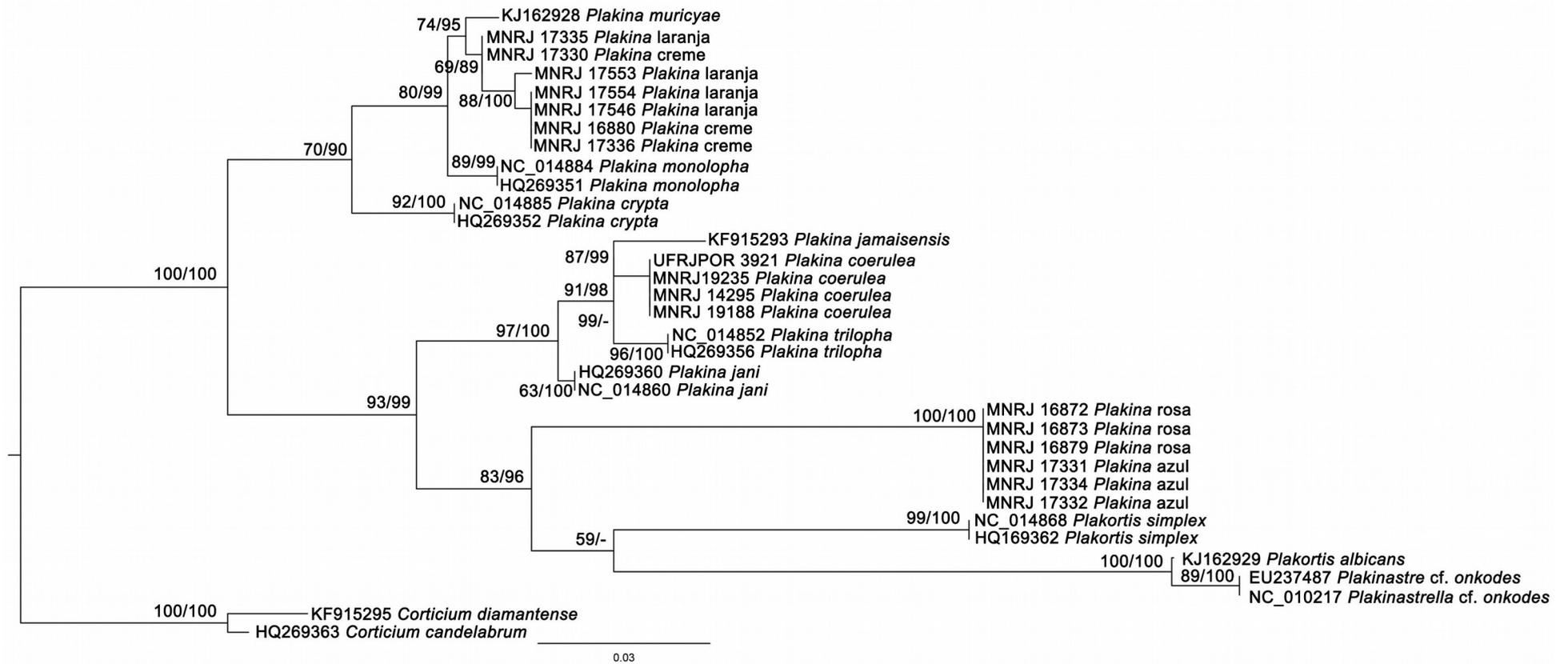


Figura 27. Análises filogenéticas de Plakinidae usando a CitB, com os valores de suporte da máxima verossimilhança e da inferência Bayesiana em porcentagem. A topologia apresentada é referente ao resultado da máxima verossimilhança com os valores da inferência Bayesiana.

Os morfotipos creme e laranja aparecem nas análises como um grupo monofilético. Porém, com baixo valor de suporte para a máxima verossimilhança e alto para a inferência Bayesiana (69%/89%). Além disso, esses dois morfotipos aparecem como grupo irmão de *P. muricyae* e o clado que suporta os espécimes de *Plakina* creme e laranja mais *P. muricyae* possui altos valores de suporte (74%/95%).

O holótipo de *P. coerulea*, os dois espécimes coletados em Cabo Frio e o espécime de Fernando de Noronha foram identificados molecularmente e se apresentaram como um grupo monofilético, com altos valores de suporte em ambas as análises (87%/99%).

#### 4.2. Comentários sobre os quatro morfotipos

Os resultados obtidos nesse trabalho apontam que os quatro morfotipos de *Plakina* encontrados na poça de maré do Carolina podem ser considerados duas espécies diferentes. A *Plakina* sp. nov. 1 contendo os morfotipos azul e rosa e a *Plakina* sp. nov. 2 contendo os morfotipos creme e laranja.

Essas espécies são muito semelhantes na forma, variação de tamanho, consistência, tipo de sistema aquífero, tipo de câmaras de coanócitos (Tab. 5), organização do esqueleto, presença de cavidades basais, presença de diodos, triodos, caltropos, caltropos monolofosos e presença de células apopilares, coanócitos, pinacócitos e arqueócitos (Tab. 5; 6; 7). Entretanto, essas espécies são facilmente diferenciadas pela superfície lisa (Fig. 5; 6) e pelo padrão de ramificação dos caltropos lofosos bastante elaborados (Fig. 10D-F; 11D-F) em *Plakina* sp. nov. 1 contra a superfície verrucosa (Fig. 7; 8) e pelo padrão de ramificação simples (Fig. 12D; 13D) em *Plakina* sp. nov. 2. Além disso, *Plakina* sp. nov. 1 apresenta algumas características que estão ausentes em *Plakina* sp. nov. 2, como os caltropos dilofoso, trilofosos e esclerócitos (Tab. 6; 7); e em contrapartida, somente *Plakina* sp. nov. 2 apresenta células vacuolares (Tab. 6). O conjunto de bactérias das duas espécies é totalmente diferente, enquanto *Plakina* sp. nov. 1 apresenta cinco diferentes tipos de bactérias (Fig. 16; 19), *Plakina* sp. nov. 2 apresenta somente um (Fig. 21C, D; 23 E, F), sendo este diferente dos cinco tipos encontrados na primeira espécie. As reconstruções filogenéticas também suportam que os quatro morfotipos são duas espécies. Nessas análises, as duas espécies aparecem distantes e em clados bem distintos para ambos os marcadores utilizados neste trabalho (Fig. 26, 27).

Tabela 5. Variações da morfologia e da organização geral por espécies e por morfotipos.

	Cor	Forma	Superfície	Consistência	Sistema aquífero	Câmaras de coanócitos	Referências
Morfotipo Azul	Azul escuro	Incrustante	Lisa	Macia	Silêibide	Euripilasas	Este estudo
Morfotipo Rosa	Rosa	Incrustante	Lisa	Macia	Silêibide	Euripilasas	Este estudo
Morfotipo Creme	Creme	Incrustante	Verrucosa	Macia	Silêibide	Euripilasas	Este estudo
Morfotipo Laranja	Laranja	Incrustante	Verrucosa	Macia	Silêibide	Euripilasas	Este estudo
<i>Plakina muricyae</i>	Branco a verde amarelado	Incrustante	Lisa	Firme	-	-	Cruz-Barraza et al., 2014
<i>Plakina monolopha</i>	Branco ou creme	Discoidal	Microlobada	Macia	Silêibide	-	Muricy et al., 1998
<i>Plakina crypta</i>	Branco	Discoidal	Microlobada	Macia	Silêibide	Euripilasas	Muricy et al., 1998
<i>Plakina jamaicensis</i>	Marrom amarelado	Incrustante	Lisa	Firme	Leuconóide	Diplodal	Lehnert & van Soest, 1998
<i>Plakina trilopha</i>	Branco a branco rosado	Incrustante	Lisa	Firme	Silêibide-Leuconóide	Euripilasas ou Afodal	Muricy et al., 1998
<i>Plakina jani</i>	Marrom amarelado	Lobada	Lisa	Firme	Silêibide-Leuconóide	Euripilasas ou Afodal	Muricy et al., 1998
<i>Plakina coerulea</i>	Azul celeste	Incrustante	Microtuberculada	Compressível	-	-	Cedro et al., 2013
<i>Plakina kanaky</i>	Azul celeste, vermelho, amarelo ou verde	Lobada	Lisa	Macia	Leuconóide	Diplodal	Ruiz et al., 2015

Tabela 6. Variação das espículas por espécies e por morfotipos.

	Diodo	Triodo	Calthropo	Calthropos Monolofosos		Calthropos Dilofosos		Calthropos Trilofosos		Calthropos Tetralofosos		Referências
				Actina não lofosa	Actina lofosa	Actina não lofosa	Actina lofosa	Actina não lofosa	Actina lofosa	Actina não lofosa	Actina lofosa	
Morfotipo Creme	20-50-70/2-2,6-4	15-21-26/1-1.8-3	9-11-15/1	10-11-15/1	8-8.6-11/1	Ausente		Ausente		Ausente		Este estudo
Morfotipo Laranja	37-56,6-74,1/1-2,4-3	7,4-19,9-27,1/1-2,1-4	6-12,1-25/1-2	6-12-16/1-2	5-7,5-10/1-2	Ausente		Ausente		Ausente		Este estudo
Morfotipo Azul	35-52.2-65/1-2.5-4	8-18.9-28/1-1,9-3	5-16.5-25/1-1.7-3	6-13.6-24/1-1.5-3	5-7.5-18/1-1.5-3	10-12.3-17/1-1.9-4	9-6.9-5/2-2.1-3	10-14-15/1-2	6-6.2-9/1-2	Ausente		Este estudo
Morfotipo Rosa	50-59,3-73/2-3,1-4	22-26,7-30/2-2,9-4	11-21,1-27/1-2,2-4	10-16-24/2-3	7-8,3-10/1-2	12-14,5-20/1-2-4	6-7,8-13/1-1,8-3	11-14,3-20/2-3	5-9-10/1-2,2-4	Ausente		Este estudo
<i>Plakina muricyae</i>	35-92,5/0,5-5,0	6,2-37,5	6,2-30,0	7,5-25,0?	7,5-25,0?	Ausente		Ausente		Ausente		Cruz-Barraza et al., 2014
<i>Plakina monolopha</i>	52,2-71,3-93,0/1,5-4,1	11,2-23,5-34,4/1,2-3,5	15,5-18,9-31,0/1,2-3,2	8,0-24,5-31,8/1,3-2,5	Ausente		Ausente		Ausente		Muricy et al., 1998	
<i>Plakina crypta</i>	35,3-64,6-80,8/1,5-3,2	15,0-23,4-35,5/1,5-3	11,0-19,2-30,3/1,6-3,2	19,3-23,1-30,5/1,5-2,5	Ausente		Ausente		Ausente		Muricy et al., 1998	
<i>Plakina jamaicensis</i>	69,0-78,2-91,1/2,3-2,9	22,1-27,5-32,1/1,2-2,0	5,5-9,6-11,6/0,8-2,9	22,4-27,1-31,7/1,1-1,6	Ausente		Ausente		Ausente		Lehnert & van Soest, 1998	
<i>Plakina trilopha</i>	40,5-74,5-88,0/1,3-3,5	12,2-26,5-33,8/1,8-3,3	10,5-23,0-35,8/1,3-3,5	20,5-26,2-30,8/1,5-2,3	Ausente		Ausente		Ausente		Muricy et al., 1998	
<i>Plakina jani</i>	43,0-67,3-100,5/1,2-3,6	16,2-37,5/1,6-3,2	16,5-23,1-38,8/1,5-3,5	22,5-27,9-38,3/1,5-2,5	Ausente		Ausente		Ausente		Muricy et al., 1998	
<i>Plakina coerulea</i>	63-,0-78,8-90,0/3,5,6-7	44,0-50,3-61,0*	41,0-45,3-55,0*/5,0-6,5-9,0	Ausente		Ausente		Ausente		Ausente		Cedro et al., 2013
<i>Plakina kanaky</i>	Ausente	Ausente	Ausente	20-30	20-30	Ausente		15-27,5	2,5-5	2,5-5	2,5-5	Ruiz et al., 2015

Tabela 7. Variação dos caracteres citológicos por espécies e por morfotipos.

	Coanócito		Célula apopilar		Arqueócito	Pinacócito	Esclerócito	Celula vacuolar	Célula cinza	Referências
	Forma	Microvilosidade (n°)	Forma	Quantidade de inclusões	Forma	Forma	Forma	Forma	Forma	
<i>Plakina azul</i>	Piramidal-cilindrico	21-34	Irregular-esférico	30-37	Ovóides-irregular	Achatados-irregulares	Irregular	Ausentes	Ausentes	Este estudo
<i>Plakina rosa</i>	Piramidal-cilindrico	24-27	Irregular-esférico	23-40	Ovóides-irregular	Achatados-irregulares	Irregular	Ausentes	Ausentes	Este estudo
<i>Plakina creme</i>	Piramidal-arredondado	~30	Irregular	16-26	Irregular	Achatados-irregulares	Ausentes	Esféricas-arredondadas	Ausentes	Este estudo
<i>Plakina laranja</i>	Piramidal-arredondado	~25	Irregular	21-25	Irregular	Achatados-irregulares	Ausentes	Esféricas-arredondadas	Esférica-arredondada	Este estudo
<i>Plakina trilopha</i>	Piramidal	40	Ovóide-irregular	20	Ovóides-irregular	Achatado-ovóide	Ovóides-irregular	Ausentes	Ausentes	Muricy et al., 1999
<i>Plakina jani</i>	Piramidal	27-39	Ovóide-irregular	5-20	Presente	Ovóide	Presentes	Esféricas	Ausentes	Muricy et al., 1999
<i>Plakina endoumensis</i>	Cilindrico	30-38	Ovóide-irregular	5-15	Ovóide-irregular	???	Ovóide-irregular	Ausentes	Ausentes	Muricy et al., 1999
<i>Plakina crypta</i>	Piramidal	44-49	Ovóide-irregular	40	Ovóide-irregular	ovóide	Irregular	Ausentes	Ausentes	Muricy et al., 1999
<i>Plakina kanaky</i>	Ovóide-piramidal	28-35	Achatado-arredondad	0	Irregular	Achatado-arredondad	Ausente	Ausente	Ausente	Ruiz et al., 2015

### 4.3 Sistemática

Classe Homoscleromorpha Bergquist, 1978

Ordem Homosclerophorida Dendy, 1905

Família Plakinidae Schulze, 1880

Gênero *Plakina* Schulze, 1880

Definição: Plakinidae com esqueleto composto por espículas do tipo diodo, triodo ou caltropo em uma única classe de tamanho, com caltropos com uma, duas, três ou quatro actinas com ramificações lofosas (Muricy and Diaz, 2002).

#### 4.3.1 *Plakina* sp. nov. 1

##### Diagnose

*Plakina* sp. nov. 1 possui cor azul-escuro a rosa, incluindo espécimes em degradê de cor. A superfície é pouco verrucosa, quase lisa e o sistema aquífero é do tipo silêibide com câmaras de coanócito do tipo euripilosas. As cavidades basais estão presentes e outras cavidades estão ausentes. As espículas encontradas são diodos, triodos e caltropos com espinhos localizados próximo a dobra central, caltropos monolofosos (1m, ts), caltropos dilofosos (1p, 2d, ts) e caltropos trilofosos (1m, 2t, ts). A espécie é a única do gênero a apresentar pinacócitos tipo “t” e apresenta cinco tipos de bactérias associadas, sendo o tipo 1, também único, com uma forma sanfonado. A espécie foi reconhecida molecularmente pelos marcadores mitocondriais da Cox1 e da CitB como um grupo monofilético com altos valores de suporte em análises filogenéticas pela máxima verossimilhança e inferência Bayesiana.

##### Morfologia externa

A forma de *Plakina* sp. nov. 1 é incrustante e irregular (Fig. 5; 6). A espessura é fina e as bordas são elevadas. A variação de tamanho encontrada entre os espécimes é de menos de 1 cm<sup>2</sup> à 5,0 x 2,5 cm. A cor em vida é azul-escuro a rosa, incluindo espécimes em degradê de cor (Fig. 5B, C). A superfície é lisa e pouco verrucosa. Os ósculos não são visíveis e a consistência é macia e frágil.

##### Anatomia interna e organização geral

O sistema aquífero dessa espécie é do tipo silêibide e as câmaras de coanócitos são do tipo euripilosas. O esqueleto tangencial (Fig. 9A, B) possui uma reticulação com mechas

circulares de espículas (14,8–29,5–74,1  $\mu\text{m}$ ). O ectossoma e o coanossoma não possuem diferenciação em corte transversal. O esqueleto transversal possui uma reticulação do tipo alveolar bem evidente (Fig. 9E, F), com malhas circulares de espículas (19,7–43,4–61,7  $\mu\text{m}$ ). As cavidades basais também estão presentes (altura: 20,0–83,5–210,0  $\mu\text{m}$ ).

### Espículas

Algumas espículas dos tipos diodos, triodos e caltropos possuem espinhos nas actinas e próximos a torção central (Fig. 10A-C; 11A-C). Os diodos (Fig. 10A; 11A) são sinuosos, irregulares, com a torção central irregular e possui as pontas pouco afiadas ou arredondadas (35,0–55,7–73,0/1,0–2,8–4  $\mu\text{m}$ ). Os triodos (Fig. 10B; 11B) são sinuosos, irregulares, com a torção central irregular e possui as pontas pouco afiadas ou arredondadas (8,0–22,8–30,0/1–2,4–4,0  $\mu\text{m}$ ). Os caltropos (Fig. 10C; 11C) são sinuosos, irregulares, finos e com as pontas pouco afiadas ou arredondadas (5,0–18,8–27,0/1,0–1,9–4,0  $\mu\text{m}$ ). Os caltropos monolofosos (Fig. 10D; 11D) possuem duas ou três ramificações mediais com espinhos terminais (actina lofosa: 3,0–7,9–18,0/1,0–3,0  $\mu\text{m}$ ; actina não lofosa: 6,0–14,5–24,0/1,0–3,0  $\mu\text{m}$ ). Os caltropos dilofosos (Fig. 10E; 11E) possuem quatro ramificações proximais com duas a quatro ramificações distais com espinhos terminais. Alguns dilofosos possuem uma das actinas lofosas com duas ramificações proximais (actina lofosa: 5,0–7,3–13,0/2,0–2,0–3,0  $\mu\text{m}$ ; actina não lofosa: 10,0–13,4–20,0/1,0–1,9–4,0  $\mu\text{m}$ ). Os caltropos trilofosos (Fig. 10F; 11F) possuem três ramificações mediais, duas ou três ramificações distais com espinhos terminais. Alguns caltropos trilofosos apresentam as actinas lofosas com duas ramificações proximais, sem espinhos terminais (actina lofosa: 5,0–7,6–10,0/1,0–2,2–4,0  $\mu\text{m}$ ; actina não lofosa: 10,0–14,1–20,0/1,0–3,0  $\mu\text{m}$ ). Os caltropos tetralofosos estão ausentes.

### Citologia

As células apopilares (Fig. 14A,B; 17A, B) possuem forma irregular (6,3–8,2–10,5/5,2–6,6–9,2  $\mu\text{m}$ ). Seu núcleo é arredondado ou em forma de pera (2,0–2,5  $\mu\text{m}$ ) e não foi visualizado a microvilli. O Citoplasma é denso, com 23–40 inclusões homogêneas (0,2–1,0–1,8  $\mu\text{m}$ ). Os coanócitos (Fig. 15C; 18C, D) são piramidais ou cilíndricos (2,2–7,5/4,0–11,0  $\mu\text{m}$ ). Seu núcleo é achatado e fica localizado na parte apical da célula (2,0–4,0/0,8–2,5  $\mu\text{m}$ ). Diversas inclusões são encontrados principalmente na parte basal do coanócito (0,1–0,8–2,0  $\mu\text{m}$ ). O complexo de Golgi foi visualizado próximo ao núcleo na parte apical da célula (1/0,2–

0,5  $\mu\text{m}$ ). O colar possui de 21 a 34 microvilli. O coanócito pode formar pequenos pseudópodes (0,2-0,3  $\mu\text{m}$ ). Os arqueócitos (Fig. 14C, D; 17C, D) são ovoides ou irregulares (5-8,4/3,6-5,2  $\mu\text{m}$ ). Seu núcleo é arredondado e pode ocupar grande parte da célula (1,5-3,1/1,4-2,3  $\mu\text{m}$ ). Os pseudópodes são facilmente visualizados e pode variar de 0,5-1,4  $\mu\text{m}$  de comprimento. Algumas inclusões ovais ou esféricas foram visualizadas (0,1-0,5-1,0  $\mu\text{m}$ ). As mitocôndrias são pequenas (0,2-0,6  $\mu\text{m}$ ). O complexo de Golgi também foi visualizado (16-20/0,3-0,4  $\mu\text{m}$ ). Os pinacócitos (Fig. 15A; 18A, B) são irregulares, achatados e com projeções irregulares (3-9,9-14,9/1,6-2,5-3,7  $\mu\text{m}$ ). Seu núcleo é arredondado ou oval (2,5-3,3/1,4-3,1  $\mu\text{m}$ ). O citoplasma é pouco denso, com poucas inclusões (0,2-0,5-0,9  $\mu\text{m}$ ). O flagelo mede entre 0,2-0,3  $\mu\text{m}$ . Alguns pinacócitos tipo “T” foram visualizados (4,5/8,8  $\mu\text{m}$ ), seu núcleo fica localizado na parte apical da célula, é arredondado (1,4/1,3  $\mu\text{m}$ ) e a célula possui poucas inclusões (0,3-0,9  $\mu\text{m}$ ). Os esclerócitos (Fig. 14E, F; 17E, F) são irregulares (6,4-9,2-12,8/2,6-5,9-6,2  $\mu\text{m}$ ). Seu núcleo é esférico e pode ser um pouco irregular (1,5-2,0-2,5/0,8-1,4-1,9  $\mu\text{m}$ ). O citoplasma é pouco denso, com poucas inclusões (0,2-0,5-1,1  $\mu\text{m}$ ).

#### Bactérias simbiotes

Foram encontradas cinco tipos diferentes de bactérias associadas ao mesoólio e a densidade de bactéria no mesoólio pode ser considerada baixa. Alguns indivíduos do tipos bacterianos 2 e 3 foram encontrados em volta dos “fantasmas” da espículas. O primeiro tipo bacteriano (Fig. 16A; 19A) é pouco comum, possui uma forma sanfonada com a parte interna da bactéria clara, com poucos grânulos escurecidos e a parte mais externa parece ser uma camada única e bastante escura (1,9-2,3/0,3  $\mu\text{m}$ ). O segundo tipo de bacteriano (Fig. 16B; 19B, D) é o mais comum, possui a forma esférica com o seu núcleo claro e a parte mais externa com somente uma camada, espessa e bastante escurecida (0,2-0,3  $\mu\text{m}$ ). O terceiro tipo de bactéria (Fig. 16C; 19B) é bastante comum, possui a forma de bastão e em alguns casos pode apresentar uma curvatura em uma das extremidades, e essas podem ser arredondadas ou pontiagudas. A parte interna da bactéria possui algumas partes mais escuras e outras partes mais claras com a parede espessa e bastante escurecida (0,9-2,0/0,1-0,2  $\mu\text{m}$ ). O quarto tipo de bactéria (Fig. 16D; 19C, D) também é bastante comum. Possui a forma esférica ou em forma de bastão, com as extremidades arredondadas. Podem apresentar uma das extremidades mais espessa que a outra, a parte mais interna com muitos grânulos escurecidos e a parede espessa (0,3-0,7-1,3/0,3-0,4  $\mu\text{m}$ ). O quinto tipo de bactéria (Fig. 16C, D) é bastante abundante dentro

do mesoílo e possui a forma esférica ou oval com a parte interna com muitos grânulos pequenos e claros e possui uma parede fina (0,2-0,4-0,8/0,2-0,6 µm).

#### Análise molecular

Para as análises moleculares foram obtidas seqüências de um espécime do morfotipo azul e um do morfotipo rosa para a Cox1 e três espécimes do morfotipo azul e três do morfotipo rosa. As seqüências obtidas dos dois espécimes para a Cox1 são diferentes e, em contrapartida, os seis espécimes utilizados para a CitB apresentaram a mesma seqüência. Esses espécimes sempre aparecem como monofiléticos nas análises e as seqüências obtidas apresentam uma maior similaridade a *P. kanaky*, *P. jani*, *P. jamaicensis* e a *P. coerulea* (Fig. 26, 27).

#### Comentários taxonômicos

*Plakina* sp. nov. 1 se assemelha na morfologia externa a outras espécies do gênero por apresentar a superfície lisa, mas difere destas na forma microlobada em *P. coerulea* e lobada em *P. trilopha*, *P. crypta*, *P. kanaky* e *P. jamaicensis* (Tab. 5) (Ruiz *et al.*, 2015; Muricy *et al.*, 1998). As únicas espécies conhecidas de *Plakina* compartilharem a cor azul com a *Plakina* sp. nov. 1 são *P. coerulea* e *P. kanaky*, entretanto, o azul de ambas as espécies é um azul-celeste, enquanto que o azul da espécie nova é um azul-escuro (Tab. 5) (Ruiz *et al.*, 2015; Muricy *et al.*, 1998). *Plakina* sp. nov. 1 possui um conjunto espicular e padrão de ramificação dos caltropos lofosos característicos. Algumas espécies como *P. jamaicensis*, *P. trilopha*, *P. jani* e *P. kanaky* se assemelham à espécie nova pela semelhança no conjunto espicular (Tab. 6). Entretanto, a espécie nova difere destas por apresentar um padrão de ramificação mais elaborado (Muricy *et al.*, 1998, Cedro *et al.*, 2013; Lehnert & van Soest, 1998).

#### 4.3.2 *Plakina* sp. nov. 2

##### Diagnose

*Plakina* sp. nov. 2 (Fig. 7; 8) possui cor creme ou laranja, sem espécimes em degradé. A superfície é bem verrucosa e o sistema aquífero é do tipo silêbide com câmaras de coanócito do tipo euripilas. As cavidades basais estão presentes. As espículas são dos tipos diodos, triodos, caltropos e caltropos monolofosos com padrão de ramificação simples. A espécie apresenta células vacuolares com vacúolos grandes e não apresenta esclerócitos. A espécie é a

única do gênero a apresentar células cinza e uma capa que envolve algumas espículas (somente no morfotipo laranja) e também apresenta somente um tipo de bactéria associada. A espécie foi reconhecida molecularmente pelos marcadores mitocondriais da Cox1 e da CitB como um grupo monofilético com altos valores de suporte em análises filogenéticas pela máxima verossimilhança e inferência Bayesiana.

#### Morfologia externa

*Plakina* sp. nov. 2 possui a forma incrustante, fina, irregular e com as bordas elevadas. A variação de tamanho encontrada entre os espécimes é de menos de 1 cm<sup>2</sup> à 10,0 x 10,0 cm. A cor da nova espécie em vida pode ser creme ou laranja. Sua superfície é sempre verrugosa e os ósculos não são visíveis. A consistência é macia, muito frágil.

#### Anatomia interna e organização geral

O sistema aquífero dessa espécie é do tipo *silêibide* e as câmaras de coanócitos são do tipo euripilasas. O esqueleto em corte tangencial é reticulado com mechas circulares de espículas (diâmetro: 12,3–26,7–64,2 µm). O ectossoma e o coanossoma não possuem diferenciação em corte transversal e o esqueleto transversal (Fig. 9G, F) possui uma reticulação do tipo alveolar bem evidente, com malhas circulares de espículas (diâmetro: 17,2–27,6–44,4 µm). As cavidades basais também estão presentes (altura: 9,8–10,3–37,0 µm).

#### Espículas

No morfotipo laranja estão presente, em algumas espículas, uma capa que envolve as espículas. Essa capa possui 0,1-0,2 µm de espessura e possui a cor laranja. Os diodos (Fig. 12A; 13A) são sinuosos, irregulares, possuem a torção central irregular e as pontas pouco afiadas ou arredondadas (comprimento: 20,0–53,3–74,0/2,0–2,5–4,3 µm). Os triodos (Fig. 12B; 13B) são sinuosos, irregulares, possuem a torção central irregular e as pontas pouco afiadas ou arredondadas (actina: 15,0–20,4–27,1/1,0–1,9–4,0 µm). Os caltropos (Fig. 12C; 13C) são sinuosos, irregulares, finos e com as pontas pouco afiadas ou arredondadas (actina: 6,0–11,5–25,0/1–1,9–4 µm). Os caltropos monolofosos (Fig. 12D; 13D) são pouco sinuosos, finos, com as pontas pouco afiadas e se ramificam em dois ou três raios. A ramificação é medial, normalmente sem espinhos terminais, mas estes podem estar presentes em algumas espícula (actina lofosa: 5,0–8,0–11,0/1,0–2,0 µm; actina não lofosa: 10,0–11,5–16,0/1,0–2,0 µm).

## Citologia

Os coanócitos (Fig. 20G, H; 22H) são piramidais ou arredondados (4-6-7/4,3-5,1-6,1  $\mu\text{m}$ ). Seu núcleo possui forma de pêra e fica localizado na parte medial a apical da célula (2,6-3,3-4,5/1,6-2,4-3,1  $\mu\text{m}$ ). O complexo de goldi foi visualizado próximo ao núcleo na porção apical da célula (0,7-1,7/0,2-0,6  $\mu\text{m}$ ). Possuem poucas inclusões, com ampla variação de tamanho, dispostos principalmente na porção basal do coanócito (0,7-1,2-1,8  $\mu\text{m}$ ). As mitocôndrias são pequenas e esféricas e estão dispersos por toda a célula (0,2-0,4  $\mu\text{m}$ ). O colar possui aproximadamente 20 microvilli e o flagelo mede 0,2-0,4  $\mu\text{m}$ . As células apopilares (Fig. 20A, B; 22A, B) são irregulares (3,2-11/3,2-4,7  $\mu\text{m}$ ). Possuem o núcleo arredondado (2,1-2,6/1,6-2,4  $\mu\text{m}$ ). O citoplasma é pouco denso, com 21 – 25 inclusões osmiofílicas homogêneas, essas inclusões podem ser esféricas, ovais ou saculiformes (0,2-0,8  $\mu\text{m}$ ). Algumas mitocôndrias saculiformes ou esféricas foram visualizadas na parte apical da célula (0,3-0,4  $\mu\text{m}$ ). Os arqueócitos (Fig. 20C, D; 22C, D) são irregulares (4,7-6,7/2,1-4,3  $\mu\text{m}$ ). Possuem o núcleo grande, arredondado ou irregular (2,3-2,4/1,6-2,1  $\mu\text{m}$ ). As mitocôndrias são esféricas ou ovais (0,3-0,4  $\mu\text{m}$ ). Alguns vacúolos bem grandes também foram visualizados (0,7-1,2  $\mu\text{m}$ ). O complexo de goldi foi visualizado próximo ao núcleo (1,2/0,2  $\mu\text{m}$ ). Os pinacócitos (Fig. 19A, B; 23A, B) são achatados (10-12/2,0-2,5  $\mu\text{m}$ ). O núcleo é oval e achatado (3,2-3,7/1,6-1,9  $\mu\text{m}$ ). Possuem projeções corporais irregulares. O citoplasma é pouco denso, possui algumas mitocôndrias pequenas (0,2-0,3  $\mu\text{m}$ ) e algumas poucas inclusões (0,2-0,6  $\mu\text{m}$ ). As células vacuolares (Fig. 21A, B; 23 A, B) são esféricas ou arredondadas (7-7,5/4,5-7  $\mu\text{m}$ ). O núcleo é pequeno, com forma oval (0,8-2,9/1,1-2  $\mu\text{m}$ ). O citoplasma é pouco denso, com poucas mitocôndrias pequenas e ovais ou esféricas (0,3-0,5  $\mu\text{m}$ ). O complexo de goldi foi visualizado próximo ao núcleo (1,5/0,2  $\mu\text{m}$ ). As células “cinza” (Fig. 23C, D) foram encontradas somente no morfotipo laranja. Possuem a forma arredondada a irregular (7,5-8,7/5,5-6,3  $\mu\text{m}$ ), com algumas pequenas projeções. Seu núcleo é esférico a irregular (2,0-3,0/1,7-2,4  $\mu\text{m}$ ). Possui pequenas mitocôndrias esféricas ou ovais (0,3-0,4  $\mu\text{m}$ ).

## Bactérias simbiotes

Essa espécie possui somente um tipo de bactérias simbiote (Fig.21C, D; 23E, F). Esta, possui forma de bastão (1,7-2,1/0,3-0,5  $\mu\text{m}$ ), com a parte interna pouco densa, com alguns filamentos que ligam a parte interna a parede externa. Esse tipo bacteriano apresenta uma

parede espessa e irregular.

#### Análise molecular

Para as análises moleculares foram obtidas seqüências de três espécimes do morfotipo creme e quatro espécimes do morfotipo laranja para a Cox1 e para a CitB. Todos os espécimes estudados apresentaram seqüências diferentes tanto para a Cox1 quanto para a CitB. Esses espécimes sempre aparecem como monofiléticos e as seqüências obtidas apresentam uma maior similaridade a *P. muricyae* e depois com *P. monolopha* (Fig. 26, 27).

#### Comentários taxonômicos

*Plakina muricyae* compartilha a *Plakina* sp. nov. 2 a sua forma incrustante, presença do mesmo conjunto de espículas e tamanho dos diodos, triodos e caltropos (Tab. 5; 6). Entretanto, *P. muricyae* difere da espécie nova por sua coloração amarelo esverdeada, consistência firme, tipo de ramificação e tamanho dos caltropos monolofoss, presença de cavidades subectossomais e ausência de cavidades basais (Cruz-Barraza *et al.*, 2014). *Plakina crypta* também se assemelha bastante a nova espécie, principalmente por compartilhar a composição espicular semelhante, coloração creme ou branca e consistência macia (Tab. 5; 6). Porém, *P. crypta* possui uma morfologia externa bastante característica, com filamentos que ligam a esponja ao substrato e uma superfície microlobada. As espículas de *P. crypta* também são bastantes características e diferentes de *Plakina* sp. nov. 2, a dobra central de todas as espículas é bem marcada, e os caltropos monolofosos possuem de 3-5 ramificações distais com 3 ramificações, também distais, com espinhos terminais e diferente da nova espécie, ela também apresenta caltropos dilofosos (Muricy *et al.*, 1998). *Plakina crypta* também difere da espécie nova por não apresentar células vacuolares e na quantidade de microvilosidades dos coanócitos (44-49 contra 25-30 da *Plakina* sp. nov. 2) e inclusões nas células apopilares (~40 contra 26-36 da *Plakina* sp. nov. 2) (Tab. 7).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Morfologia externa

Os morfotipos estudados nesse trabalho foram separados inicialmente pela cor (azul, rosa, creme e laranja). Entretanto, conforme mais espécimes foram sendo estudados, foi observado que os morfotipos azul e rosa possuíam muitos indivíduos com degradê de cor entre o azul e o rosa (Fig. 5B, C). O mesmo não aconteceu com os outros dois morfotipos. Os morfotipos creme e laranja apresentaram espécimes somente nessas cores. Variações de cor dentro de uma mesma espécie são comuns em diversos grupos de esponjas, como *Mycale angulosa* em Demospongiae, *Clathrina aphrodita* em Calcarea e *Plakina kanaky* em Homoscleromorpha (Azevedo *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2015) e pode ser explicada pela disponibilidade de luz, comunidade de bactérias, período reprodutivo e uma série de outros fatores (eg. Azevedo *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2015).

Os morfotipos azul e rosa, que se mostraram como uma só espécie em todas as análises, apresentaram uma superfície lisa, enquanto a outra espécie que abrange os morfotipos creme e laranja apresentou uma superfície verrucosa, bastante característica. Entretanto, o tipo de superfície não é uma característica que apresenta grande variação dentro do gênero *Plakina*, o tipo de superfície mais comum no gênero é lisa (*P. trilopha*, *P. jani*, *P. kanaky*, *P. muricyae*) (Cruz-Barraza *et al.*, 2014; Muricy *et al.*, 1998). Porém, outros tipos de superfície mais característicos também podem ser encontrados no gênero, como microtuberculada (*P. coerulea*) e microlobada (*P. crypta*) (Cedro *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2015).

Os caracteres menos informativos para delimitar os morfotipos foram a forma e o tamanho. Entretanto, a forma é um caráter importante para comparação com as espécies já existentes e algumas espécies como *P. kanaky* (forma lobada) e *P. crypta* (forma discoidal) possuem formas bastantes características e facilmente distinguíveis de outras espécies já conhecidas (Tab. 5) (Muricy *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2015).

### 5.2. Anatomia e organização geral

A organização do esqueleto no gênero *Plakina* não possui muita variação: todas as espécies apresentam uma reticulação transversal bem evidente com as espículas lofosas concentradas na superfície da esponja, nos canais internos e nas cavidades do mesoílo (Muricy & Díaz, 2002). Os caracteres que normalmente são mais informativos na anatomia interna são a presença ou ausência de cavidades no sistema aquífero (Muricy & Diaz, 2002;

Muricy *et al.*, 1998). Nas duas espécies estudadas a organização geral e anatômica é muito semelhante, com o mesmo tipo de sistema aquífero e presença de cavidades basais.

### 5.3. Espículas

Os caracteres mais importantes para diferenciação dos morfotipos e das espécies já conhecidas foram o conjunto espicular e o padrão de ramificação dos caltropos lofosos (Tab. 6). Os morfotipos azul e rosa apresentaram um conjunto espicular único e ramificações dos caltropos lofosos em padrões característicos. Já os morfotipos creme e laranja apresentaram um conjunto espicular semelhante a outras espécies já conhecidas (eg. *P. muricyae* e *P. monolopha*) e, mesmo possuindo as ramificações pouco elaboradas, o padrão de ramificação dos caltropos lofosos foi uma ferramenta importante para diferenciar a nova espécie das espécies já conhecidas (ver comentários taxonômicos). Desde a descrição original do gênero, a principal ferramenta para a delimitação de espécies de *Plakina* têm sido a composição espicular, principalmente a presença de diferentes tipos de caltropos lofosos (Schulze, 1880; Muricy & Diaz, 2002). A importância do padrão de ramificação para a taxonomia foi levantada por Muricy e colaboradores (1998) e corroborada por diversos autores (Ereskovsky *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2015; Cruz-Barraza *et al.*, 2014) e por este trabalho, visto que cada uma das duas novas espécies possuem composição e/ou padrão de ramificação característicos e distintos das espécies de *Plakina* já conhecidas.

### 5.4. Citologia

Os caracteres que foram mais informativos para a taxonomia na citologia foram a presença de células únicas (células cinzas, pinacócitos tipo “t”) e características (células vacuolares) e a quantidade de inclusões nas células apopilares (Tab. 7).

Somente no morfotipo laranja foram encontradas células cinza, esse tipo de célula só tinha sido encontrada antes em Demospongiae e alguns trabalhos associaram a presença desse tipo celular a intenso crescimento (eg. *Microciona prolifera*) (Simpson, 1963) e cicatrização e crescimento de papilas em *Polysmastia mamillares* (Boury-Esnault, 1976). Simpson (1963) também sugere que essa célula pode ter alguma função na reserva e/ou na síntese do glicogênio. Além dessa célula, outra estrutura foi encontrada somente nesse morfotipo, uma espécie de capa que envolve algumas espículas. Na microscopia eletrônica de transmissão essa capa aparece em volta de alguns “fantasmas de espículas”. Essa estrutura é bastante

eletrodensa e não apresenta nenhuma estrutura celular visível. Na microscopia ótica, em alguns cortes semifinos é possível visualizar essa capa como uma estrutura dourada/laranja que envolve algumas espículas.

O morfotipo azul também apresentou um tipo celular único, pinacocitos tipo “T”. No morfotipo rosa foi encontrado apenas uma célula com uma forma intermediária, onde o núcleo do pinacocito não está dentro do mesoílo, mas a célula possui uma projeção bem evidente para dentro do mesoílo. Essas células são bem conhecidas em diversos grupos de esponjas (Boury-Esnault, 1973b), porém é a primeira vez que ela foi encontrada em *Homoscleromorpha* (Boury-Esnault, 1973b; Simpson, 1984).

Somente uma espécie de *Plakina* e dois morfotipos estudados possuem células vacuolares: *P. jani* e os morfotipos creme e laranja (Muricy et al., 1999) e os esclerócitos não foram encontrados em *P. kanaky* e nos morfotipos creme e laranja (Ruiz et al., 2015). Entretanto, apenas cinco espécies de *Plakina* possuem descrição da citologia e essas variações na composição celular precisam ser avaliadas com prudência.

Apesar das espécies de *Plakina* apresentarem diferenças na composição celular, na morfologia e no tamanho de algumas estruturas, os caracteres celulares precisam ser utilizados com cautela, pois eles podem apresentar variações dependendo da demora entre a coleta e a fixação, tipo de fixador e preparação para a microscopia eletrônica de transmissão (Muricy & Pearse, 2004; Muricy et al., 1999). Por esses motivos, caracteres que apresentam variações, como presença dos tipos celulares específicos, tipos de inclusões, número de microvilosidades nos coanócitos são uma ferramenta mais confiável para a taxonomia do gênero *Plakina* (Muricy et al., 1999; Ruiz et al., 2015) e para a taxonomia de outros gêneros (eg. *Oscarella*) (Muricy et al., 1996; Boury-Esnault et al., 1992).

## 5.5. Comunidade de bactérias

A comunidade de bactérias é uma característica bastante informativa para a taxonomia de *Plakina*, visto que todas as espécies estudadas até o momento apresentam uma comunidade única e em vários casos, bactérias exclusivas de algumas espécies (*P. kanaky*, *P. crypta*, *P. jani*, *P. trilopha*) (Muricy et al., 1999; Ruiz et al., 2015).

Os morfotipos azul e rosa apresentam os mesmos cinco tipos de bactérias simbiotes. O primeiro tipo é bastante característico e muito diferente de todas as bactérias descritas para o gênero. Os outros tipos de bactérias são parecidos com outros tipos encontrados em *P.*

*endoumensis* e *P. crypta* (Muricy *et al.*, 1999). Os morfotipos creme e laranja apresentaram somente um tipo de bactéria associada e esse tipo é bastante característico e facilmente diferenciado das outras bactérias encontradas no gênero *Plakina*. O tipo que mais se assemelha a essa bactéria é o tipo “O”, encontrado em *P. crypta* (Muricy *et al.*, 1999). Entretanto, a bactéria encontrado nos morfotipos creme e laranja é facilmente distinguível da bactéria de *P. crypta* pela forma da membrana externa, quantidade de filamentos no interior e pela coloração mais escura.

A ocorrência de um grande número de bactérias associadas é comum em diversos grupos de esponjas (eg. Muricy *et al.*, 1999; Levi & Levi, 1965; Vacelet, 1975). Essas bactérias podem ocupar grande parte do volume da esponja apesar das bactérias de cada esponja apresentaram semelhanças, a comunidade de bactérias de cada espécie é característica (eg. *Agelas*, *Oscarella*, *Petrosia*) (Boury-Esnault *et al.*, 1992; Vacelet, 1975).

#### 5.6. Análises moleculares

Dados moleculares são frequentemente utilizados como ferramenta para delimitação de espécies (eg. Azevedo *et al.*, 2015; Muricy *et al.*, 1996; Ereskovsky *et al.*, 2013; Gazave *et al.*, 2013) e existem vários casos onde dados moleculares não são congruentes com outras fontes de dados, como os morfológicos (Sites & Marshall, 2004). Entretanto, no presente trabalho, os dois marcadores tiveram bons resultados para delimitação das espécies já conhecida e das novas espécies. As espécies já conhecidas de *Plakina*, as duas novas espécies e os espécimes de *P. coerulea* apresentaram bons valores de suporte de ramos. Esses resultados sugerem que os morfotipos estudados podem ser separados em duas novas espécies, a primeira com os morfotipos azul e rosa e a segunda com os morfotipos creme e laranja. Além disso, os resultados das análises moleculares, separando os quatro morfotipos em duas espécies, são respaldados pelos dados da morfologia, composição espicular, citologia e comunidade de bactérias.

A utilização da Cox1 e da CitB em *Homoscleromorpha* têm obtido bons resultados para delimitação de várias espécies nos últimos anos (Cruz-Barraza *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2015; Ereskovsky *et al.*, 2013) e as topologias encontradas com esses marcadores foram congruentes com outros trabalhos que utilizaram os mesmos marcadores (Cruz-Barraza *et al.*, 2010; Gazave *et al.*, 2010; 2013; Ivanišević *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2015). Esses trabalhos apresentam o gênero *Corticium* na base da família Plakinidae e o gênero *Plakina* como

parafilético, com dois clados. O primeiro clado contém *P. crypta*, *P. monolopha* e *P. muricyae* e o segundo clado com *P. coerulea*, *P. jamaicense*, *P. jani*, *P. kanaky*, *P. trilopha*, *Plakortis* e *Plakinastrella*.

#### 5.7. Congruência dos métodos

As ferramentas utilizadas no presente trabalho apresentaram resultados congruentes: os quatro morfotipos de *Plakina* encontrados na poça de maré do Carolina são duas espécies diferentes e novas para a ciência. Todas as ferramentas utilizadas neste trabalho apresentaram em maior ou menor grau diferenças entre as duas espécies novas e entre elas e as espécies já conhecidas.

Dentre os caracteres utilizados, os que apresentaram uma maior resolução na identificação das novas espécies foram a cor, o tipo de superfície, o conjunto espicular, o padrão de ramificação dos caltropos lofosos, os diferentes tipos de células, a comunidade de bactérias e as filogenias moleculares. Todavia, apesar desses caracteres isoladamente apresentarem bons resultados para a taxonomia de *Plakina*, a utilização de somente uma fonte de dados para delimitação de espécies têm sido duramente criticado (eg. Dayrat, 2005). Por esse motivo, a utilização desses caracteres de forma integrativa definitivamente conferem uma maior robustez e confiabilidade nas hipóteses das espécies aqui apresentadas.

## 6. CONCLUSÃO

- Os caracteres morfológicos que se mostraram mais informativos para delimitação das duas espécies novas de *Plakina* foram a superfície da esponja, a presença de cavidade basal e ausência de outras cavidades, a composição do conjunto espicular e o padrão de ramificação dos caltropos lofosos.
- As diferenças encontradas nos caracteres citológicos e na comunidade de bactérias corroboram a delimitação das duas espécies obtidas através do estudo morfológico.
- As análises moleculares usando os genes da Cox1 e da CitB corroboram os resultados obtidos com os caracteres morfológicos, citológicos e da comunidade de bactérias, sendo encontrado duas espécies novas com altos valores de suporte de ramo.
- As análises moleculares usando os genes da Cox1 e da CitB suportam que o holótipo de *Plakina coerulea* e os espécimes coletados em Cabo Frio e em Fernando de Noronha são pertencentes a mesma espécie.
- Todos os métodos utilizados no presente trabalho apresentaram resultados congruentes: que os quatro morfotipos encontrados na poça de maré do Carolina são duas novas espécies para a ciência.
- Apesar dos caracteres utilizados na taxonomia tradicional serem efetivos para a discriminação de espécies, essa abordagem integrativa proporcionou uma maior robustez à taxonomia das novas espécies de *Plakina*, e essas informações também podem ajudar a esclarecer questões no relacionamento filogenético entre as espécies do gênero, bem como da família Plakinidae.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackers, R.G.; Moss, D.; Picton, B. **Sponges of the British Isles (Sponge V): A Colour Guide and Working Document**. Marine Conservation Society. 1992. 175 p.

Azevedo, F.; Córdor-Luján, B.; Willenz, P.; Hajdu, E.; Hooker, Y.; Klautau, M. **Integrative taxonomy of calcareous sponges (subclass Calcinea) from the Peruvian coast: morphology, molecules, and biogeography**. Zoological Journal of the Linnean Society. 2015. vol. 173. 787-817 p.

Belmonte, T.; Alvim, J.; Padula, V.; Muricy, G. **Spongivory by nudibranchs on the coast of Rio de Janeiro state, southeastern Brazil (Mollusca, Gastropoda)**. Spixiana. 2015. vol. 38 (2). 187-195.

Boury-Esnault, N. **Morphogénèse expérimentale des papilles inhalantes de l'Eponge *Polymastia mamillaris* (Müller)**. Archives de Zoologie expérimentale et générale. 1976. vol. 117(2). 181-196 p.

Boury-Esnault, N. **Résultats Scientifiques des Campagnes de la "Calypso". Campagne de la Calypso au large des côtes atlantiques de l'Amérique du Sud (1961-1962). I. 29. Spongiaires**. Annales de l'Institut océanographique. 1973a. vol. 49 (Supplement 10). 263-295 p.

Boury-Esnault, N. **L'exopinacoderme des Spongiaires**. Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle. 1973b. vol. 178. 1193-1206 p.

Boury-Esnault, N.; Solé-Cava, A.M.; Thorpe, J.P. **Genetic divergence between morphs of the Mediterranean sponge *Oscarella lobularis* Schmidt (Porifera, Demospongiae, Oscarellidae)**. Journal of Natural History. 1992. vol. 26. 271-284 p.

Boury-Esnault, N.; Hajdu, E.; Klautau, M.; Custódio, M.; Borojevic, R. **The value of cytological criteria in distinguishing sponges at the species level: the example of the genus *Polymastia***. Canadian Journal of Zoology. 1994. vol. 72(5). 795-804 p.

Boury-Esnault, N.; Lavrov, D. V.; Ruiz, C. A.; Perez, T. **The Integrative Taxonomic Approach Applied to Porifera: A Case Study of the Homoscleromorpha.** Integrative and Comparative Biology. 2013. vol. 53(3). 416-427 p.

Boury-Esnault, N. & Rützler, K. **Thesaurus of Sponge Morphology.** Smithsonian Contributions to Zoology. 1997. vol. 596. 1-55 p.

Cedro, V.R.; Hajdu, E.; Correia, M.D. **Three new intertidal sponges (Porifera: Demospongiae) from Brazil's fringing urban reefs (Maceió, Alagoas, Brazil), and support for Rhabderemia 's exclusion from Poecilosclerida.** Journal of Natural History. 2013. vol. 47(33-34). 2151-2174 p.

Cruz-Barraza, J.A.; Vega, C.; Carballo, J.L. **Taxonomy of family Plakinidae (Porifera: Homoscleromorpha) from eastern Pacific coral reefs, through morphology and *cox1* and *cob* mtDNA data.** Zoological Journal of the Linnean Society. 2014. vol. 171. 254–276 p.

Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. **jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing.** Nature Methods 2012. vol. 9: 772 p.

Dayrat, B. – **Towards integrative taxonomy.** Biological Journal of the Linnean Society. 2005. vol. 85. 407-415 p.

Desqueyroux-Faúndez, R.; Van Soest, R.W.M. **Shallow water Demosponges of the Galápagos Islands.** Revue suisse de Zoologie. 1997. vol. 104 (2). 379-467 p.

Diaz, M.C. & Rützler, K. **Sponges: an essential component of Caribbean coral reefs.** Bulletin of Marine Science. 2001. vol. 69 (2). 535-546 p.

Ereskovsky, A.V.; Lavrov, D.V.; Willenz, P. **Five new species of Homoscleromorpha (Porifera) from the Caribbean Sea and re-description of *Plakina jamaicensis*.** Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 2013. vol. 94(02). 285-307 p.

Erpenbeck, D.; Hooper, J.N.A.; Worheide, G. **CO1 phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life'— are we sequencing a suboptimal partition?** *Molecular Ecology Notes*. 2005. vol. 6. 550–553 p.

Erpenbeck, D.; Voigt, O.; Gültas, M.; Wörheide, G. **The sponge genetree server – providing a phylogenetic backbone for poriferan evolutionary studies.** *Zootaxa*. 2008. vol. 1939. 58–60 p.

Fukami, H.; Budd, A.F.; Paulay, G.; Sole-Cava, A.; Chen, C.A.; Iwao, K.; Knowlton, N. **Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals.** *Nature*. 2004. vol. 427. 832–835 p.

Gazave, E.; Lapébie, P.; Renard, E.; Vacelet, J.; Rocher, C.V.; Ereskovsky, A.; Lavrov, D.; Borchellini, C. **Molecular Phylogeny Restores the Supra-Generic Subdivision of Homoscleromorph Sponges (Porifera, Homoscleromorpha).** *PLoS ONE*. 2010. vol. 5(12). e14290.

Gazave, E.; Lavrov, D.V.; Cabrol, J.; Renard, E.; Rocher, C.; Vacelet, J.; Adamska, M.; Borchellini, C.; Ereskovsky, A.V. **Systematics and Molecular Phylogeny of the Family Oscarellidae (Homoscleromorpha) with Description of Two New *Oscarella* Species.** *PLoS ONE*. 2013. vol. 8(5). 63976-10.

Gray, J.E. **Notes on the Arrangement of Sponges, with the Descriptions of some New Genera.** *Proceedings of the Zoological Society of London*. 1867. vol. 1867(2). 492-558 p. XXVII-XXVIII pls.

Green, K.D.; Bakus, G.D. **Taxonomic atlas of the benthic fauna of the Santa Maria Basin and Western Santa Barbara Channel: 2. The Porifera.** Santa Barbara Museum of Natural History: Santa Barbara, CA (USA). 1994. 1-82 p.

Guindon S.; Dufayard J.F.; Lefort V.; Anisimova M.; Hordijk W.; Gascuel O. **New**

**Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0.** *Systematic Biology*. 2010. vol. 59(3). 307-21 p.

Hajdu, E.; Peixinho, S.; Fernandez, J.C.C. **Esponjas Marinhas da Bahia - Guia de Campo e Laboratório.** Série Livros 45. Museu Nacional/UFRJ, Rio de Janeiro. 2011. 276 pp.

Hechtel, G.J. **A systematic study of the Demospongiae of Port Royal, Jamaica.** *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History* 1965. vol. 20. 1-103 p.

Hooper, J.N.A. & van Soest, R.W.M. **Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges.** *In*: Hooper, J.N.A. & van Soest, R.W.M. (Eds.) **Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges.** Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, NY (USA). 2002. vol. I. 1-3 p.

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. **MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees.** *Bioinformatics*. 2001. vol. 17. 754-755 p.

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

de Laubenfels, M.W. **A comparison of the shallow-water sponges near the Pacific end of the Panama Canal with those at the Caribbean end.** *Proceedings of the United States National Museum*. 1936. vol. 83 (2993). 441-466 p.

Lavrov, D.V.; Wang, X.; Kelly, M. **Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008. vol. 49. 111-124 p.

Lazoski, C.; Sole-Cava, A.M.; Boury-Esnault, N.; Klautau, M.; Russo, C.A.M. **Cryptic speciation in a high gene flow scenario in the oviparous marine sponge *Chondrosia reniformis*.** *Marine Biology*. 2001. vol. 139. 421–429 p.

Lehnert, H.; Stone, R.; Heimler, W. **Two new species of Plakina Schulze, 1880 (Porifera, Plakinidae) from the Aleutian Islands (Alaska, USA)**. Zootaxa. 2005. vol. 1068. 27-3 p.

Lévi, C. **Systématique de la classe des Demospongiaria (Démospouges)**. 577-631 p. In: Grassé, P.P. (Ed.). **Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Spongiaires**. Masson et Cie. Paris. 1973. vol. 3(1). 1-716 p.

Levi, C.; Levi, P. **Populations bactériennes dans les éponges**. Microscopie. 1965. vol. 4. 60 p.

Lévi, C.; Lévi, P. **Démospouges bathyales récoltées par le N/O 'Vauban' au sud de la Nouvelle-Calédonie**. Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle. 1983. vol. 5(4). 931-997 p.

Loh, T. & Pawlik, J. **Bitten down to size: fish predation determines growth form of the Caribbean reef sponge *Mycale leavis***. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2009. vol. 374. 45–50 p.

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

Maldonado, M.; Carmona, M.G.; Uriz, M.J.; Cruzado, A. **Decline in Mesozoic reef-building sponges explained by silicon limitation**. Nature. 1999. vol. 401(6755). 785-788 p.

Muricy, G.; Bézac, C.; Gallissian, M.F.; Boury-Esnault, N. **Anatomy, cytology and symbiotic bacteria of four Mediterranean species of Plakina (Demospongiae : Homosclerophorida)**. Journal of Natural History. 1999. vol. 33. 159-176 p.

Muricy, G.; Solé-Cava, A.M.; Thorpe, J.P.; Boury-Esnault, N. **Genetic evidence for extensive cryptic speciation in the subtidal sponge *Plakina trilopha* (Porifera: Demospongiae:**

**Homoscleromorpha) from the Western Mediterranean.** Marine Ecology Progress Series. 1996a. 181-187 p.

Muricy, G.; Boury-Esnault, N.; Bézac, C.; Vacelet, J. **Cytological evidence for cryptic speciation in Mediterranean *Oscarella* species (Porifera, Homoscleromorpha).** Canadian Journal of Zoology. 1996b. vol. 74. 881-896 p.

Muricy, G.; Boury-Esnault, N.; Bézac, C.; Vacelet, J. **Taxonomic revision of the Mediterranean *Plakina* Schulze (Porifera, Demospongiae, Homoscleromorpha).** Zoological Journal of the Linnean Society. 1998. vol. 124. 169-203 p.

Muricy, G. & Diaz, M.C. **Order Homosclerophorida Dendy, 1905. Family Plakinidae Schulze, 1880, in:** Hooper, J.N.A. & van Soest, R.W.M. (Ed.) (2002). **Systema porifera: a guide to the classification of sponges.** 2002. 71-82 p.

Muricy, G.; Lopes, D.A.; Hajdu, E; Carvalho, M.S.; Moraes, F.C.; Klautau, M.; Menegola, C.; Pinheiro, U. **Catalogue of Brazilian Porifera.** Museu Nacional, Série Livros. 2011. 300 p.

Muricy, G.; Pearse, J.S. **A new species of *Oscarella* (Demospongiae: Plakinidae) from California.** Proceedings of the California Academy of Sciences. 2004. vol. 55 (33). 598-612 p.

Padial, J.M.; Miralles, A.; De La Riva, I.; Vences, M. **The integrative future of taxonomy.** Frontiers in Zoology. 2010. vol. 7. 16 p.

Pansini M.; Manconi R.; Pronzato R. **Porifera I. Calcarea, Demospongiae (partim), Hexactinellida, Homoscleromorpha.** Fauna d'Italia, Bologna: Calderini-II Sole 24 Ore. eds. 2011.

Pouliquen, L. **Les spongiaires des grottes sous-marines de la région de Marseille: Ecologie et systématique.** Téthys. 1972. vol. 3(4). 717-758 p.

Pulitzer-Finali, G. **A collection of Mediterranean Demospongiae (Porifera) with, in appendix, a list of the Demospongiae hitherto recorded from the Mediterranean Sea.** Annali del Museo civico di storia naturale Giacomo Doria. 1983. vol. 84. 445-621 p.

Ribeiro, S.; Omena, E.P.; Muricy, G. **Macrofauna associated to *Mycale microsigmatosa* (Porifera, Demospongiae) in Rio de Janeiro State, SE Brazil.** Estuarine, Coastal and Shelf Science. 2003. vol. 57. 951-959 p.

Riesgo, A.; Novo, M.; Sharma, P.P.; Peterson, M.; Maldonado, M.; Giribet, G. **Inferring the ancestral sexuality and reproduction condition in sponges (Porifera).** Zoologica Scripta. 2013. vol. 43. 101–117 p.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** Bioinformatics. 2003. vol. 19. 1572-1574 p.

Ruiz, C.; Ivanišević, J.; Chevaldonné, P.; Ereskovsky, A.V.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J.; Thomas, O.P.; Pérez, T. **Integrative taxonomic description of *Plakina kanaky*, a new polychromatic sponge species from New Caledonia (Porifera: Homoscleromorpha).** Marine Ecology. 2015. vol. 36. 1129–1143 p.

Rützler, K.; Díaz, M.C.; van Soest, R.W.M.; Zea, S.; Smith, K.P.; Alvarez, B.; Wulff, J. **Diversity of sponge fauna in mangrove ponds, Pelican Cays, Belize.** Atoll Research Bulletin. 2000. vol. 476. 230-248 p.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977. vol. 74(12). 5463-5467 p.

Simpson, T.L. **The biology of the marine sponge *Microciona prolifera* (Ellis and Solander). I. A study of cellular function and differentiation.** Journal of Experimental Zoology. 1963. vol. 154. 135-147 p.

Sites, J.W.; J. C. Marshall. **Delimiting species: A renaissance issue in systematic biology.** Trends in Ecology & Evolution. 2004. vol. 18. 462–470 p.

Schulze, F.E. **Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Spongien. Neunte Mittheilung. Die Plakiniden.** Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie. 1880. vol. 34(2). 407-451 p.

van Soest, R.W.M. **Porifera**, in: Costello, M.J. et al. (Ed.) (2001). **European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification.** Collection Patrimoines Naturels. 2001. 85-103 p.

van Soest, R.W.M; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.N.A.; Rützler, K.; de Voogd, N.J.; Alvarez de Glasby, B.; Hajdu, E.; Pisera, A.B.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Janussen, D.; Tabachnick, K.R., Klautau, M.; Picton, B.; Kelly, M.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Díaz, M.-C.; Cárdenas, P.; Carballo, J. L. **World Porifera database.** 2016. Accessed at <http://www.marinespecies.org/porifera> on 2016-05-19.

Solé-Cava, A.M.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J.; Thorpe, J.P. **Biochemical genetic divergence and systematics in sponges of the genera Corticium and Oscarella (Demospongiae: Homoscleromorpha) in the Mediterranean Sea.** Marine Biology. 1992. vol. 113(2). 299-304 p.

Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipiski, A.; Kumar, S. **MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.** Molecular Biology and Evolution. 2013. vol. 30. 2725–2729 p.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** Nucleic Acids Research. 1994. vol. 22. 4673–4680 p.

Topsent, E. **Diagnoses d'Éponges nouvelles recueillies par le Prince Albert Ier de Monaco.**

Bulletin de l'Institut océanographique Monaco. 1927. vol. 502. 1-19 p.

Topsent, E. **Étude monographique des Spongiaires de France. II.Carnosa.** Archives de Zoologie expérimentale et générale. 1895. vol. (3) 3: 493-590, pls XXI-XXII.

Vacelet, J. **Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre Verongia(Dictyoceratida).** Journal de Microscopie et de Biologie cellulaire. 1975 vol.23. 271-288 p.

Vacelet, J.; Vasseur, P.; Lévi, C. **Spongiaires de la pente externe des récifs coralliens de Tuléar (Sud-Ouest de Madagascar).** Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle (A, Zoologie). 1976. vol. 49. 1-116 p. I-X pls.

Vargas, S.; Schuster, A.; Sacher, K.; Büttner, G.; Schätzle, S.; Läubli, B.; Hall, K.; Hooper, J.N.A.; Erpenbeck, D.; Wörheide, G. **Barcoding Sponges: An Overview Based on Comprehensive Sampling.** PLoS ONE. 2012. vol. 7(7). E39345.

Vethaak, A.D.; Cronie, R.J.A.; van Soest, R.W.M. **Ecology and distribution of two sympatric, closely-related sponge species, *Halichondria panacea* (Pallas, 1766) and *H. bowerbanki* Burton, 1930 (Porifera, Demospongiae), with remarks on their speciation.** Bijdragen tot de Dierkunde. 1982. vol. 52. 82–102 p.

Wang, X. & Lavrov, D.V. **Seventeen new complete mtDNA sequences reveal extensive mitochondrial genome evolution within the Demospongiae.** PLoS One. 2008. vol. 3. e2723.

Wulff, J.L. **Assessing and monitoring coral reef sponges: why and how?** Bulletin of Marine Science. 2001. vol. 69(2). 831-846 p.

Wulff, J.L. **Ecological interactions of marine sponges.** Canadian Journal of Zoology. 2006. vol. 84. 146-166 p.

Yeates, D.K.; Seago, A.; Nelson, L.; Cameron, S.L.; Joseph, L.; Trueman, J.W.H. **Integrative taxonomy, or iterative taxonomy?** *Systematic Entomology*. 2011. vol. 36(2). 209-2–17.